



Universidad de Córdoba
Departamento de Genética

**ANTICUERPOS MONOCLONALES
ESPECÍFICOS DE INMUNOGLOBULINA G
CANINA: CARACTERIZACIÓN Y
APLICACIÓN EN INMUNOENSAYOS**

Cristina Arce Jiménez

Tesis Doctoral

Córdoba, Junio de 2001

*Esta Tesis Doctoral ha sido realizada gracias a la financiación económica del Ministerio de Ciencia y Tecnología, por medio de una ayuda para el intercambio de personal investigador entre industrias (**BIOVET-UCO**) y centros públicos de investigación (**Universidad de Córdoba**) en una acción de formación de personal investigador. Convocatoria año 1992 (B.O.E. 20-11-95).*

Antes de empezar, me gustaría por medio de estas líneas mostrar mi más sincero agradecimiento a todas aquellas personas que de alguna manera han hecho posible la realización de este trabajo:

A Diego Llanes, por permitirme formar parte de su grupo de investigación y haber puesto su confianza en mi desde un primer momento. Por su ayuda, buenos y acertados consejos y por encontrar soluciones para todo. Por su optimismo y capacidad para encontrar información hasta “donde no la hay”.

A Ángela Moreno, por todo lo que me ha enseñado a lo largo de estos años, por su interés, dedicación y buena disposición en todo momento en lo relacionado con este trabajo. Por toda su ayuda, constancia, apoyo y sus buenos ánimos siempre que hicieron falta. Y sobre todo, y no menos importante, por los buenos momentos que hemos pasado juntas.

A Luis Morera, por sus buenos consejos, y en especial por su ayuda con las tablas, gráficos y estadísticas.

A Manolo Barbancho, por su interés en todo lo relacionado con este trabajo.

A Damián de Andrés, por estar siempre dispuesto a echar una mano y por tener siempre recursos para resolver hasta los problemas más imposibles.

A Juan José Garrido, por todos los buenos consejos desde su experiencia y por su ayuda siempre que hizo falta.

A Jose Pérez de la Lastra, a su vuelta de Gales, por ser el primero que me inició en el trabajo de laboratorio al dirigirme la Tesina, por su amistad y buen humor.

A María Friend, por enseñarme todo lo relacionado con el cultivo celular, por sus buenos consejos, su cariño y su ayuda con el manejo de los ratones y en la realización de este trabajo.

A Reyes Álvarez, por su ayuda y por tener siempre algo interesante que contar para levantar el ánimo en los momentos más bajos.

A Lola Galiani, por su interés siempre en este trabajo, por sus consejos y por haberse integrado tan bien en el grupo.

A Alicia Márquez, por enseñarme todas las “buenas prácticas de laboratorio”, por su ayuda y por ambientar el laboratorio como nadie.

A Eva Sarrión, por su ayuda y simpatía en el tiempo que estuvo trabajando con nosotros.

A Ángeles Jiménez, por los buenos ratos pasados juntas, por su apoyo, ayuda, y amistad; por su compañía y por hacer más amenas las comidas.

A Gonzalo Paños por estar siempre dispuesto a ayudar, sobre todo a sus buenas soluciones con los temas informáticos; a la objetividad de sus consejos y por tener una opinión coherente siempre que hizo falta.

A Yasser Ezzart Shahein, por poner el “punto internacional” en el grupo.

A Juana Martín de las Mulas, José Pérez y Yolanda Millán, del Departamento de Anatomía y Anatomía Patológica Comparadas, por suministrarme los órganos de perro y, sobre todo, por su inestimable ayuda con la inmunohistoquímica. Gracias a todos ellos por las buenas ideas que contribuyeron a completar este trabajo y por su disposición a prestarme sus consejos y conocimientos en cualquier momento.

A Pedro Ginél, del Departamento de Medicina y Cirugía Animal, y al Hospital Clínico Veterinario de la Universidad de Córdoba por facilitarme las muestras de sangre de perro usada en este trabajo y el suero anti-leishmania usado como control positivo.

A M^a Dolores Luque, Juan Manuel Fernández y Flori Delgado, del Departamento de Química Analítica y Ecología de la Universidad de Córdoba,

por su colaboración en la aplicación de los anticuerpos desarrollados en este trabajo.

A Cecilio Barba, al Club Nacional del Podenco Andaluz y a la Asociación de Criadores del Podenco Andaluz, por suministrarme la sangre de los cuarenta y cinco perros testados en este trabajo.

A Javier León, de la Clínica Veterinaria Mirabueno, por facilitarme la sangre de perros con leishmaniosis.

A Irene Cobacho, del Centro de Cálculo de la Universidad de Córdoba, por su ayuda en la impresión de este trabajo.

A mi familia Arce, por su apoyo, en especial a Lourdes, por todos los buenos consejos y su colaboración en el diseño y presentación de este trabajo; y a Vicente, por el diseño de la portada.

A mi familia Lenzano, por su apoyo y por permitir el uso de sus perros como principales “donantes” para el desarrollo de este trabajo.

A Ricardo, por todos sus consejos, comprensión, por soportarme con toda la paciencia del mundo en los peores momentos, por su apoyo y por entender y aceptar todo el tiempo que le he quitado.

*A todos los que hicieron
posible este trabajo*

ÍNDICE

ÍNDICE GENERAL

<u>OBJETIVOS</u>	1
<u>INTRODUCCIÓN</u>	3
DATOS SOBRE LA IMPORTANCIA DE LOS ESTUDIOS INMUNOLÓGICOS	3
- Importancia de los estudios inmunológicos en el perro	3
EL SISTEMA INMUNE	5
- Composición	5
- Funciones	6
- Características principales del sistema inmune canino	8
- Transferencia de la inmunidad pasiva	10
- Inmunidad no específica	11
ANTÍGENOS	12
- Epítomos	13
- Características que hacen a una molécula antigénica	14
- Reacciones cruzadas	16
ANTICUERPOS: GENERALIDADES	17
- Estructura primaria de las inmunoglobulinas	19
a) Unidad estructural básica: Cadenas ligeras y pesadas	19
b) Parte variable y constante de las cadenas ligeras y pesadas	20

c) Dominios moleculares en las cadenas ligeras y pesadas	21
d) Regiones hipervariables de las cadenas ligeras y pesadas	21
- Estructura espacial de las inmunoglobulinas	22
- Subclases de inmunoglobulinas: Isotipos	22
- Marcadores antigénicos de las inmunoglobulinas	25
a) Alotipos	25
b) Idiotipos	26
- Distribución de las inmunoglobulinas	28
- Función de las inmunoglobulinas: Unión antígeno-anticuerpo	29
- Tolerancia: Fallos en la respuesta inmune	32
ANTICUERPOS CANINOS	34
INMUNOGLOBULINA G (IgG)	35
- Aspectos generales	35
- La IgG canina	37
OBTENCIÓN Y PURIFICACIÓN DE LAS IgGs CANINAS	40
- Uso como inmunógeno	40
- Uso para el tratamiento de enfermedades	41
LOS ANTICUERPOS EN EL ESTUDIO DE LAS Igs	42
- Anticuerpos policlonales	42
- Anticuerpos monoclonales	43
a) Generalidades	43
b) Método de producción de anticuerpos monoclonales	45
c) Caracterización y utilidad de los anticuerpos monoclonales	47

- Anticuerpos poli y monoclonales como herramientas en inmunoensayos	49
a) Anticuerpos poli y monoclonales frente a IgE	51
b) Anticuerpos poli y monoclonales frente a otras inmunoglobulinas	52
MÉTODOS DIAGNÓSTICOS DE DISTINTAS ENFERMEDADES CANINAS	58
- Leishmaniosis	58
- Enfermedades autoinmunes: Pénfigo	60
<u>MATERIALES Y MÉTODOS</u>	65
ANIMALES, CÉLULAS Y PROTEÍNAS	65
- Animales	65
- Suero sanguíneo	65
- Órganos	65
- Leucocitos PBMC	66
- Suspensiones celulares	66
- Esplenocitos de ratón	66
- Células de mieloma	67
- Inmunoglobulina G de perro sano	67
- Inmunoglobulina G de perro con leishmaniosis	67
TAMPONES Y SOLUCIONES	68
PRODUCCIÓN DE HIBRIDOMAS	68
- Inmunización de los ratones	68
- Fusión	69

- ELISA indirecto (Procedimiento General)	69
- Clonaje de los hibridomas	71
- Detección del isotipo de inmunoglobulina	71
PRODUCCIÓN DE ASCITES	72
PURIFICACIÓN DE LOS ANTICUERPOS	72
- Purificación de anticuerpos en columna de Proteína A (Baja sal)	73
- Purificación de anticuerpos en columna de Proteína A (Alta sal)	73
- Electroforesis en mini-geles	74
MARCAJE DE LOS ANTICUERPOS CON BIOTINA	75
ELISA DIRECTO: USO DE LOS ANTICUERPOS BIOTINADOS	76
CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA DE LOS ANTICUERPOS	76
- Inmunoblotting	76
- Obtención de fragmentos Fab de la IgG canina	78
- Tratamiento de la IgG de perro con ácido y con calor	79
- Tratamiento de la IgG de perro con m-peryodato sódico	80
CITOMETRÍA DE FLUJO	80
REACCIÓN CRUZADA CON DISTINTAS ESPECIES	81
REACTIVIDAD FRENTE A UN PANEL DE Igs CANINAS	81
ELISA DE COMPETICIÓN: ENSAYOS DE INHIBICIÓN	82

	<i>Índice</i>
ELISA SANDWICH	83
- Procedimiento	83
- Elaboración de la recta de calibrado	83
- Optimización del ensayo	84
- Exactitud del ensayo	84
- Precisión del ensayo	85
INMUNOHISTOQUÍMICA	85
- Reactividad de los anticuerpos monoclonales anti-IgG canina con cortes de órganos linfoides de perro en estado fisiológico	85
- Reactividad de los anticuerpos monoclonales anti-IgG canina con cortes de bazo de perro con leishmaniosis	87
- Reactividad de los anticuerpos monoclonales anti-IgG canina con cortes de piel de perro con enfermedades autoinmunes (Pénfigo)	88
<u>RESULTADOS</u>	91
PURIFICACIÓN DE LA INMUNOGLOBULINA G (IgG) CANINA	91
FUSIÓN: OBTENCIÓN DE ANTICUERPOS MONOCLONALES ANTI-IgG DE PERRO	93
CARACTERIZACIÓN DE LOS ANTICUERPOS MONOCLONALES ANTI-IgG DE PERRO	94
- Purificación	94
- Marcaje con biotina	96
- Títulos	97
a) Titulación del sobrenadante de los anticuerpos	97
b) Titulación de los anticuerpos purificados	97

c) Titulación de los anticuerpos biotinados	98
d) Titulación de la IgG purificada	98
- Reactividad de los anticuerpos frente a distintas Igs caninas	99
- Inmunoblotting	99
- Niveles de IgG + IgM en sueros de perro	102
- Obtención de fragmentos Fab de la IgG canina	103
- Tratamiento de la IgG con ácido	103
- Tratamiento de la IgG con calor	104
- Tratamiento de la IgG con m-peryodato	105
- Reactividad con distintos tipos celulares: Citometría de flujo	106
- Reactividad de los anticuerpos frente a sueros de distintas especies	107
- Inmunohistoquímica	108
- ELISA de competición: Ensayos de inhibición	109
APLICACIONES DE LOS ANTICUERPOS MONOCLONALES	
ANTI-IgG DE PERRO	113
- Clasificación de la IgG + IgM en suero: ELISA sandwich	113
• Elección de la pareja	113
• Optimización del ensayo	115
• Exactitud del ensayo	115
• Precisión del ensayo	116
- Reactividad de los anticuerpos monoclonales anti-IgG canina y de la IgG anti-leishmania con cortes de bazo de perro con leishmaniosis	117
- Aplicación del anticuerpo monoclonal CA4E7 en el diagnóstico de enfermedades autoinmunes mediante inmunohistoquímica	119
- Determinación del anticuerpo monoclonal CA3H1 mediante un sistema inmunosensible de filtración/disolución continuo	120

- Uso de los anticuerpos monoclonales biotinados como secundarios en ELISA para la determinación de distintos estados patológicos en el perro	121
<u>DISCUSIÓN</u>	133
PURIFICACIÓN DE LA IgG CANINA	134
- Purificación de la IgG a partir de sueros de animales sanos	134
- Purificación de la IgG a partir de sueros de animales enfermos de leishmaniosis	136
FUSIÓN: OBTENCIÓN DE ANTICUERPOS MONOCLONALES ANTI-IgG DE PERRO	137
CARACTERIZACIÓN DE LOS ANTICUERPOS MONOCLONALES ANTI-IgG DE PERRO	138
- Isotipos	138
- Purificación	139
- Marcaje con biotina	139
- Títulos	140
a) Titulación de la IgG purificada	140
b) Titulación de los anticuerpos	140
- Reactividad de los anticuerpos frente a distintas Igs caninas	141
- Inmunoblotting	143
- Niveles de la IgG en suero de perro	145
- Obtención de fragmentos Fab de la IgG canina	146
- Tratamiento con ácido/calor	147
- Tratamiento con m-peryodato	148

- Reactividad con los distintos tipos celulares: Citometría de flujo	148
- Reactividad de los anticuerpos frente a sueros de distintas especies	149
- Inmunohistoquímica	151
- ELISA de competición: Ensayos de inhibición	152
APLICACIONES DE LOS ANTICUERPOS MONOCLONALES ANTI-IgG DE PERRO	154
- Cuantificación de la IgG + IgM en suero: ELISA sandwich	154
- Reactividad de los anticuerpos monoclonales anti-IgG canina y de la IgG anti-leishmania con cortes de bazo de perro con leishmaniosis	155
- Aplicación del anticuerpo monoclonal CA4E7 en el diagnóstico de enfermedades autoinmunes mediante inmunohistoquímica	157
- Determinaciones del anticuerpo monoclonal CA3H1 mediante un sistema inmunsensible de filtración/disolución continuo	158
- Uso de los anticuerpos biotinados como secundarios en ELISAs indirectos	158
<u>CONCLUSIONES</u>	161
<u>APÉNDICE</u>	163
TAMPONES Y SOLUCIONES	163
- Uso general	163

- Inmunoblotting	164
- Inmunoensayos (ELISA)	164
- Obtención de fragmentos Fab	164
- Citometría de flujo	165
- Electroforesis y electrotransferencia	165
- Tinción/Destinción de geles	166
MEDIOS DE CULTIVO	167
PROCEDIMIENTOS BÁSICOS	167
- Congelación de células	167
- Descongelación de células	168
- Preparación de geles de poliacrilamida	168
- Inmunoprecipitación con mini-geles	169
- Cuantificación de proteínas	169
<u>BIBLIOGRAFÍA</u>	171

ÍNDICE DE TABLAS

INTRODUCCIÓN

Tabla 1. Propiedades generales de las Igs de los animales domésticos	23
Tabla 2. Clases y subclases de las Igs en humano y animales domésticos	24
Tabla 3. Resumen de las variables de las Igs	27
Tabla 4. Propiedades biológicas de las clases principales de Igs en el hombre	29
Tabla 5. Propiedades de las Igs caninas	34
Tabla 6. Niveles séricos (mg/ml) de subclases de Igs en perro con distintos estados inmunológicos	40
Tabla 7. Técnicas inmunohistoquímicas: anticuerpos monoclonales <i>versus</i> anticuerpos policlonales	50
Tabla 8. Anticuerpos monoclonales frente a Igs de distintas especies animales	53

RESULTADOS

Tabla 1. Concentraciones (mg/ml) de los anticuerpos purificados y biotinados	96
Tabla 2. Titulaciones	98
Tabla 3. Reactividad de los anticuerpos frente a distintas Igs caninas	99

Tabla 4. Inmunoblotting frente a la IgG purificada y a suero de perro	101
Tabla 5. Concentraciones de IgG + IgM total en suero de 45 individuos	102
Tabla 6. Reactividad de los anticuerpos con diferentes tipos celulares determinados mediante citometría de flujo	107
Tabla 7. Crosreactividad de los anticuerpos frente a sueros de distintas especies	108
Tabla 8. Reactividad de los anticuerpos frente a cortes histológicos	109
Tabla 9. Representación de los resultados de los ensayos de competición	113
Tabla 10. Exactitud de las determinaciones de las concentraciones de IgG + IgM de suero de perro mediante ELISA sandwich	116
Tabla 11. Reproducibilidad de las determinaciones de las concentraciones de IgG + IgM del suero de perro mediante ELISA sandwich	116

ÍNDICE DE FIGURAS

INTRODUCCIÓN

Figura 1. Linfocito B activado	7
Figura 2. Especificidad de la unión antígeno-anticuerpo	13
Figura 3. Esquema general de la IgG	20
Figura 4. Diferencias isotípicas	23
Figura 5. Diferencias alotípicas	25
Figura 6. Diferencias idiotípicas	26
Figura 7. Esquema general de la producción de anticuerpos monoclonales	46

RESULTADOS

Figura 1. Electroforesis en gel SDS-PAGE de la IgG de perro comercial y de la purificada	91
Figura 2. Electroforesis en gel SDS-PAGE de los anticuerpos monoclonales anti-IgG purificados	95
Figura 3. Inmunoblotting de los anticuerpos monoclonales anti-IgG de perro frente a suero canino (3.1) y frente a IgG de perro purificada (3.2)	100
Figura 4. Representación gráfica de los resultados de medir la concentración de IgG + IgM en suero de 45 perros	102

Figura 5. Representación de los efectos del tratamiento de la IgG de perro con ácido sobre el reconocimiento de los anticuerpos monoclonales anti-IgG de perro	104
Figura 6. Representación de los efectos del tratamiento de la IgG de perro con calor sobre el reconocimiento de los anticuerpos monoclonales anti-IgG de perro	105
Figura 7. Efecto del tratamiento con m-peryodato sobre el reconocimiento de los anticuerpos anti-IgG canina frente a la IgG de perro	106
Figura 8. Inmunohistoquímica de tejidos de perro en estado fisiológico frente a distintos anticuerpos anti-IgG canina	122
Figura 9. Gráficos ELISA de competición	112
Figura 10. Inmunohistoquímica para el diagnóstico de leishmania en bazo de perro	122
Figura 11. Inmunohistoquímica para el diagnóstico de enfermedades autoinmunes en piel de perro	123

OBJETIVOS

- Producción de anticuerpos monoclonales anti-IgG canina.
- Caracterización de los anticuerpos monoclonales anti-IgG de perro producidos.
- Purificación de la Inmunoglobulina G (IgG) canina a partir de suero de perros.
- Aplicación en inmunoensayos de los anticuerpos producidos.
- Aplicación en inmunoensayos de las inmunoglobulinas aisladas a partir de sueros de perros sanos y enfermos.

INTRODUCCIÓN

DATOS SOBRE LA IMPORTANCIA DE LOS ESTUDIOS INMUNOLÓGICOS

Desde el inicio del estudio de la inmunología hasta la actualidad, el interés mostrado en su conocimiento ha ido avanzando de forma progresiva. En las últimas décadas se han conseguido los avances más importantes en el conocimiento de la inmunología en general y de la canina en particular. Tres han sido, fundamentalmente, los desarrollos que han favorecido al mejor conocimiento de los diferentes mecanismos inmunológicos en la especie canina: La inmunidad adquirida se induce como respuesta a un antígeno específico, tras la colaboración de células fagocíticas, linfocitos T y B y la producción de inmunoglobulinas (Ig) y linfocinas (IL).

La investigación inmunológica en animales de compañía es una fuente de incalculable valor que podría guiar al hombre en las soluciones terapéuticas a procesos patológicos en el área clínica y veterinaria (Cobbold et al, 1994).

- Importancia de los estudios inmunológicos en el perro

El perro ha sido un modelo importante en investigación en dos áreas principales. Ha jugado un papel de gran importancia en la

investigación de nuevos medicamentos ya que es uno de los modelos más usados en ensayos de toxicidad, incluidos los efectos de los nuevos fármacos sobre el sistema inmune. Históricamente, ha sido un modelo muy valioso en el trasplante de médula ósea, aplicándose directamente muchos de los avances conseguidos a los protocolos de trasplante de médula en humano. Recientemente, ha cobrado importancia en estudios de inmunodeficiencias primarias.

Ya que el perro desarrolla muchas de las enfermedades inmunológicas humanas, representa un modelo animal ideal en el cual estudiar la inmunología y patogénesis de dichas patologías. Anteriormente, la mayor limitación del uso del perro como modelo en investigación inmunológica ha sido la escasez de reactivos para el estudio del sistema inmune. En el transcurso de los últimos años, se han desarrollado grandes avances en relación con estos reactivos (Pastoret et al, 1998).

A pesar de que en los últimos años se han llevado a cabo considerables avances en el desarrollo de los reactivos inmunológicos y moleculares para el estudio del sistema inmune canino, la disponibilidad de dicho material aún no se encuentra a la altura de los desarrollados en otras especies. Este hecho hace que el perro no se use como animal prioritario en experimentación.

Puede que el mayor valor de la aplicación en humano de los estudios inmunológicos en perro sea su uso como modelo animal para las enfermedades humanas. Además, estos modelos, también tienen interés en medicina humana en el desarrollo de protocolos de terapia genética e inmunológica.

EL SISTEMA INMUNE

- Composición

El sistema inmune está constituido por dos sistemas celulares que implica a los linfocitos. Los linfocitos son células producidas por los órganos linfáticos primarios (médula ósea y timo) y secundarios (nódulos linfáticos y bazo). Son descendientes de un conjunto de células de la médula ósea, y producen dos tipos de respuesta inmune:

- 1.- humoral, derivada de las células B (médula ósea dependientes).
- 2.- celular, derivada de las células T (timo dependientes).

1.- Células B: Inmunidad humoral

Esta inmunidad incluye a los anticuerpos circulantes o inmunoglobulinas (Ig). Existen distintos tipos de Ig, que en el caso del perro son: IgM, IgG, IgE, e IgA. Estos anticuerpos proporcionan un mecanismo de defensa fundamental contra la enfermedad, aunque en ciertos casos se vuelven hiper o hipoactivos originando diversos estados patológicos.

Los niveles de Ig pueden aumentar de dos maneras:

- Aguda, como respuesta a una enfermedad o a un proceso inflamatorio.
- Crónica, como en el caso de las enfermedades autoinmunes o inmunomediadas, infecciones crónicas, y ciertos tipos de cánceres.

Los niveles de Ig pueden disminuir como resultado de enfermedades genéticas poco frecuentes basadas en estado de inmunodeficiencia, o de supresiones inmunes asociadas a infecciones virales, bacterianas o parasitarias crónicas, cáncer, malnutrición, medicamentos, toxinas, gestación, lactancia y estrés.

2.- Células T: Inmunidad celular

Este tipo de inmunidad actúa como coordinador y efector del sistema inmune. La inmunidad celular incluye a los nódulos linfáticos, timo, bazo, intestino y tonsilas.

Existen tres tipos principales de células T: helper
citotóxicas
supresoras

La cooperación entre las células B y las T es un aspecto fundamental de la respuesta inmune.

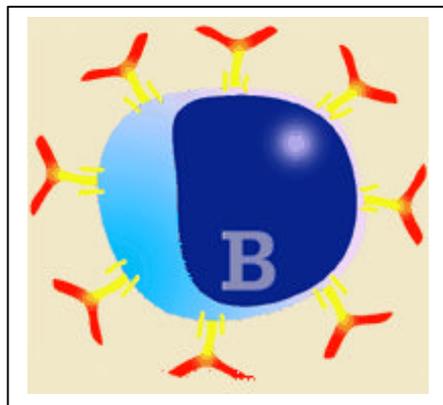
- **Funciones**

La función principal del sistema inmune es proteger a los animales de los organismos infecciosos y de sus productos tóxicos. Este hecho ha supuesto el desarrollo de un poderoso rango de mecanismos para localizar a los organismos extraños, virus o macromoléculas; para neutralizar a los invasores y para eliminarlos del cuerpo. Además de las barreras físicas (piel, secreciones de las mucosas, pH ácido del estomago, enzimas proteolíticas, etc.), de gran importancia en la lucha frente a los antígenos, los mamíferos disponen de unos mecanismos no específicos que componen lo que se denomina inmunidad natural. Este control es llevado a cabo por proteínas y células que circulan por el organismo y está constituida por diferentes mecanismos, que se pueden dividir en dos categorías principales: inmunidad natural e inmunidad adquirida.

La inmunidad natural es la primera barrera inmunológica no específica del perro frente a las infecciones a las que no estaba inmunizado previamente. Esta respuesta, se desencadena a los pocos minutos u horas de sufrir la agresión y está mediada fundamentalmente por células fagocíticas (macrófagos), células de citotoxicidad natural NK e

Interferón. Cuando esta primera barrera falla, se establece la infección y comienza a desarrollarse la inmunidad adquirida. Los mecanismos inmunitarios relacionados con la inmunidad natural están ligados a mecanismos no específicos, es decir, no están producidos por la presencia de un antígeno determinado. Este tipo de inmunidad no se mejora con exposiciones repetidas a los agentes extraños.

Figura 1. Linfocito B activado



La inmunidad adquirida es el resultado de la respuesta inmune frente a una molécula o agente extraño para el animal (antígeno) y está mediada por células denominadas linfocitos, los cuales sintetizan receptores de superficie celular (Fig. 1) o segregan proteínas denominadas anticuerpos. En este

caso se genera una respuesta específica frente a un estímulo ajeno. Tras el proceso de captación y reconocimiento de los antígenos se pondrán en marcha los mecanismos de presentación y activación de los linfocitos para la producción de anticuerpos y linfocinas. Cuando una molécula se usa para inducir una respuesta adquirida se denomina inmunógeno. Los términos antígeno e inmunógeno se usan para describir diferentes propiedades de una molécula. La inmunogeneidad no es una propiedad intrínseca de una molécula, pero únicamente se define por su habilidad de inducir una respuesta adaptativa. La antigenicidad, además, no es una propiedad intrínseca de una molécula, pero es definida por su habilidad de ser captada por un anticuerpo.

El término inmunoglobulina se usa frecuentemente intercambiado con el de anticuerpo. Formalmente, un anticuerpo es una molécula que se une a un antígeno conocido, mientras que la inmunoglobulina se refiere a

este grupo de proteínas independientemente de que su capacidad de unión sea conocida o no. En términos generales, ambos términos se usan indistintamente.

A medida que se asciende en la escala filogenética animal, el sistema inmune se va haciendo más complejo y diverso, adquiriendo más especificidad de acción y consolidando los mecanismos responsables de la memoria inmunológica.

- Características principales del sistema inmune canino

Las principales características del sistema inmune canino son:

- 1.- La capacidad para diferenciar lo propio de lo ajeno.
- 2.- La especificidad de la respuesta.
- 3.- La memoria.

- 1.- La capacidad para diferenciar lo propio de lo ajeno

El sistema inmune tiene la capacidad para diferenciar lo propio de lo ajeno, reaccionando contra todo lo extraño para él (antígenos). El sistema inmune tiene una capacidad extraordinaria de reaccionar frente a cualquier molécula distinta de su propia estructura por pequeña que esta sea. Sin embargo, no reacciona frente a sus propios componentes. Esta característica de diferenciar lo propio de lo ajeno, es una de las bases más importantes de la inmunología. En la fase embrionaria los linfocitos que pueden reaccionar con las moléculas propias del animal son eliminados mediante un mecanismo de apoptosis (muerte celular programada). Al sistema circulatorio solamente pasarán los clones celulares capaces de reaccionar contra antígenos extraños, así como los clones tolerantes a sus propias estructuras. En esta selección juegan un papel muy importante los antígenos de histocompatibilidad (SLA). A veces pueden ocurrir

errores en el sistema inmune para diferenciar lo propio de lo extraño. Así, puede ocurrir que el sistema inmune no responda a alguna partícula extraña. Este fenómeno se denomina tolerancia. Por el contrario, en algunas circunstancias, el sistema inmune puede reaccionar frente a sus propias estructuras. Estas reacciones se denominan autoinmunidad.

2.- La especificidad de la respuesta

La especificidad del sistema inmune se debe a que tanto los anticuerpos como los linfocitos sólo reconocen a un único epitopo o determinante antigénico. El sistema inmune puede reconocer miles de millones de antígenos diferentes, pero para cada determinante se inducirá un linfocito específico. Existen tantos linfocitos estimulados como determinantes formen el antígeno. Tras el reconocimiento hay una proliferación, por la cual unos linfocitos pasan a formar parte de los linfocitos memoria, y otros actuarán como células efectoras.

3.- La memoria

Cuando un antígeno se presenta por vez primera al sistema inmune se produce una respuesta primaria, quedando un linfocito memoria por cada uno de los epitopos del antígeno. Cuando ese antígeno vuelva a estar en contacto con el sistema inmune (respuesta secundaria), el linfocito memoria se estimulará para producir cuantos clones de linfocitos específicos sean necesarios (frente a ese determinado epitopo) de una manera más rápida y efectiva que en la respuesta primaria. En el timo se seleccionan los linfocitos para que sólo puedan reaccionar frente a las moléculas extrañas al organismo (selección positiva). Solamente estos linfocitos pasaran al torrente circulatorio. Por el contrario, se produce una

destrucción celular (apoptosis) de los linfocitos que pudieran reaccionar contra la propia estructura.

- Transferencia de la inmunidad pasiva

El tipo de placenta presente en el perro difiere de la humana (placenta hemocorial), en la cual la sangre de la madre está en contacto directo con los trofoblastos, permitiendo la entrada directa de la IgG materna en la circulación fetal. El perro tiene una placenta endoteliochorial en la cual existen cuatro estructuras que separan la sangre materna de la fetal: el endotelio de los vasos uterinos, el corion, el mesénquima (tejido conectivo), y el endotelio del tejido fetal. Estas cuatro capas de tejido limitan en el útero la transferencia de la IgG materna al feto. Así, sólo el 5-10% de los anticuerpos maternos en el perro se obtienen a nivel uterino a través de la placenta (Pastoret et al, 1998).

Ya que los cachorros recién nacidos dependen esencialmente de los anticuerpos maternos, las secreciones mamarias (calostros y leche) son esenciales en lo que se refiere a la protección inmune del individuo. La composición del calostro canino consiste en: IgG = 5-22 mg/ml; IgM = 0,7-3,7 mg/ml; IgA = 1,5-3,4 mg/ml (Reynolds & Johnson, 1970). Los niveles en suero de IgG de cachorros recién nacidos que reciben calostro alcanzan niveles cercanos a los de adulto. Como en otras especies, hay un periodo muy limitado de tiempo en el cual el recién nacido puede absorber la IgG intacta del intestino, usualmente 12-36 horas. A partir de este tiempo, ciertos fenómenos fisiológicos impiden la absorción de dichas proteínas.

El hecho de no recibir calostro en el perro no supone un gran problema como en el caso de otros animales domésticos, particularmente el caballo. Sin embargo, los cachorros que no lo reciben sufren una severa hipogamaglobulinemia durante las primeras semanas de vida hasta que

su propio sistema inmune tiene la oportunidad de crear una respuesta inmune primaria y secundaria como consecuencia de la exposición a los antígenos del medio.

- Inmunidad no específica

Las primeras líneas de defensa del perro frente a la infección son las barreras físicas y anatómicas, especialmente la piel y las mucosas. Las barreras fisiológicas incluyen la temperatura, pH, tensión superficial de oxígeno y varios factores químicos solubles. La piel y la superficie de las membranas mucosas proporcionan una barrera efectiva a la entrada de muchos microorganismos (Halliwell & Gordman, 1988; Tizard, 1989; Felsburg, 1994).

La inflamación es un componente importante del sistema inmune no específico (innato). Los leucocitos polimorfonucleares son los elementos celulares implicados en la respuesta inflamatoria aguda como reacción contra la infección o frente a los daños tisulares.

La mayor población celular implicada en una reacción inflamatoria crónica son los monocitos circulantes y varios macrófagos tisulares. Las funciones de los monocitos y macrófagos en el perro incluye la secreción de citoquinas inflamatorias (IL-1, IL-6 y TNF), secreción de citoquinas inhibitorias (IL-10), fagocitosis y destrucción de las bacterias, destrucción de células tumorales, reparación de los tejidos dañados, y presentación de antígenos (Tizard, 1989).

La eliminación de las bacterias y otras partículas de la sangre en el perro es similar a la observada en humano y predominantemente por medio de macrófagos en el hígado y bazo. Esto contrasta con la eliminación de las bacterias en otras especies de animales domésticos, en los cuales, aproximadamente el 90% de las partículas del torrente

sanguíneo son eliminadas por medio de macrófagos pulmonares intravasculares.

ANTIGENOS

No toda sustancia extraña es capaz de estimular una respuesta inmunitaria. Para desencadenar la respuesta inmune es fundamental superar dos limitaciones fundamentales: Primero, las restricciones fisicoquímicas acerca del tipo de molécula participante y segundo, la naturaleza de la sustancia exógena, que debe de ser tal que el organismo pueda reconocerla como sustancia extraña.

Las macromoléculas de estructura compleja como las proteínas, son considerablemente mejores como antígenos que los polímeros simples grandes, pero con subunidades idénticas que se repiten. Por esta razón, los lípidos, hidratos de carbono y ácidos nucleicos, así como los polímeros de un único aminoácido, son relativamente pobres como antígenos.

La especificidad de la respuesta inmune está controlada por un mecanismo sencillo -una célula reconoce un antígeno- (Fig. 2) ya que todos los receptores antigénicos de un linfocito sencillo son idénticos. Esto es cierto para los linfocitos B y T, aun cuando los tipos de respuestas desarrolladas por estas células son diferentes.

Todos los receptores antigénicos son glicoproteínas, encontradas en la superficie de los linfocitos maduros. Por medio de recombinaciones somáticas, mutaciones y otros mecanismos se generan más de 10^7 sitios de unión diferentes, y la especificidad antigénica se mantiene mediante procesos que aseguran que cada célula sintetice en su interior un único tipo de receptor. La producción de receptores antigénicos ocurre en la ausencia del antígeno. Sin embargo, se puede observar un amplio

repertorio de receptores antigénicos disponibles antes de que se detecte el antígeno.

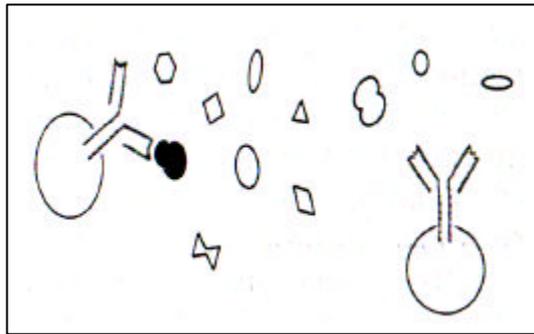


Figura 2. Especificidad de la unión antígeno-anticuerpo (Harlow & Lane, 1988)

- Epítopos

Las moléculas proteínicas aisladas no son, en sí mismas, antígenos únicos. Las macromoléculas tienen zonas de su superficie contra las cuales tiende a orientarse la respuesta inmunitaria y en las cuales se fijan los anticuerpos. Estas zonas se llaman epítopos o determinantes antigénicos. Los epítopos de las moléculas de proteínas suelen contener de cuatro a seis aminoácidos, y se localizan en zonas expuestas o prominentes en la superficie de la molécula. En general, el número de epítopos de una molécula está en relación directa con su tamaño. Existe alrededor de un epítipo por cada 5.000 daltons.

Cuando los animales encuentran una molécula grande compleja y antigénica, como una proteína, fabrican anticuerpos sólo contra los epítopos, siendo por lo tanto la mayor parte de la molécula no antigénica. Diferentes animales responden contra diferentes epítopos de la misma

molécula. Los epítomos se seleccionan también por la manera en que el antígeno se presenta a las células sensibles a los mismos. Los epítomos difieren en el tipo de respuesta inmunitaria que estimulan.

Algunos epítomos estimulan la formación de anticuerpos, otros las respuestas inmunitarias de tipo celular, y algunos provocan tolerancia estimulando a las células que suprimen la respuesta inmunitaria. En consecuencia, esta respuesta que estimula una molécula de gran tamaño es una mezcla compleja de respuestas. El resultado final depende de la naturaleza de todos los epítomos de la superficie de la molécula.

- Características que hacen a una molécula antigénica

Las proteínas, péptidos, carbohidratos, ácidos nucleicos, lípidos y otros productos naturales o sintéticos pueden actuar como un inmunógeno adecuado. En general, para que un componente produzca la respuesta primaria y una respuesta secundaria intensa de un anticuerpo, debe contener un epítomo que se una al anticuerpo de la superficie celular de una célula T virgen y debe promover una comunicación intercelular entre las células B y las células T helper.

La unión del antígeno al anticuerpo de superficie de una célula virgen B es un requerimiento imprescindible para la respuesta de los anticuerpos. Esta unión determina la especificidad de los anticuerpos resultantes, ya que el sitio de unión antigénico de la superficie del anticuerpo será idéntico al sitio de unión de los anticuerpos segregados. Un animal inmunocompetente puede producir anticuerpos contra 10^7 sitios antigénicos diferentes, y muchos componentes pueden unirse firmemente al menos a uno de esos anticuerpos superficiales.

La segunda propiedad de una molécula que la convierte en un buen inmunógeno, es que puede promover una comunicación intercelular entre las células T helper y las células B. Esto se consigue

proporcionando una unión física entre estas dos células. Cuando un inmunógeno entra en la célula B, este es parcialmente degradado, y sus fragmentos migran a la superficie, donde se unen a unos receptores conocidos como proteínas clase II. Este complejo formado por la proteína clase II y por el fragmento antigénico es unido por un receptor de las células T helper conocida como receptor de células T. La unión física (covalente o no covalente) entre estas dos células está formada por los fragmentos antigénicos y es un paso esencial en la diferenciación de las células B dentro de las células plasmáticas.

Un tipo similar de contacto intercelular es necesario en otros estadios de la respuesta celular, particularmente en la activación de las células T helper. Esta interacción ocurre entre las células T helper y un grupo de células como células presentadoras de antígenos. El requerimiento celular para esta interacción celular es idéntica a la producida en el caso de las células B y las células T helper, y por tanto, los inmunógenos que funcionan bien para un tipo de interacción funcionan también bien para el otro.

Los requerimientos para ambos tipos de interacciones se refieren a un tamaño mínimo del inmunógeno, y de esta manera, las moléculas de un tamaño menor de 3000-5000 daltons generalmente no son buenos inmunógenos. Los componentes menores a este tamaño pueden, no obstante, unirse a los anticuerpos de superficie de las células B, pero pueden no tener sitios disponibles para la unión simultánea a las proteínas de clase II y a los receptores de las células T. La unión física de las moléculas pequeñas a otras mayores más inmunogénicas solucionan este problema proporcionando los sitios de unión necesarios e induciendo una buena respuesta de anticuerpos contra la molécula pequeña. Estas moléculas de pequeño tamaño se conocen como haptenos, y las moléculas de mayor tamaño que las convierten en inmunógenas se las conoce como portadoras.

En resumen, un buen inmunógeno tiene tres características químicas:

1.- Deben de poseer un epítopo que pueda ser reconocido por los anticuerpos de superficie unidos a las células B.

2.- Deben de poseer al menos un sitio que pueda ser reconocido simultáneamente por una proteína de clase II y por un receptor de células T.

3.- Usualmente, debe de ser degradable.

Estas tres propiedades son las únicas características químicas indispensables para la producción de una respuesta inmune intensa. Sin embargo, para forzar a un animal a responder a un antígeno, han de considerarse otros factores. Entre estos se incluye la dosis y la forma del inmunógeno, el uso de adyuvantes y las modificaciones potenciales.

- Reacciones cruzadas

En diversas moléculas antigénicas distintas entre sí pueden encontrarse epítomos idénticos. Como resultado, los anticuerpos dirigidos contra un cierto antígeno reaccionan de manera inesperada con otro antígeno de una fuente aparentemente no relacionada. A este tipo de efecto se le denomina reacción cruzada.

El grado de reacción cruzada entre dos antígenos es reflejo de los epítomos que comparten ambos y de su similitud estructural. Este principio puede utilizarse para valorar las relaciones entre las moléculas o entre las especies animales o vegetales.

Los anticuerpos producidos contra un epítopo son muy específicos para ese único determinante antigénico, e implican que los lugares de unión de los anticuerpos deben tener una configuración altamente específica para la forma de un determinante antigénico

también específico. Los cambios puramente químicos, que no alteran la forma o distribución de las cargas en el hapteno, no influyen su capacidad para combinarse con un anticuerpo específico. Sin embargo, aun los cambios químicos muy pequeños causan alteraciones importantes en la forma molecular, y por eso afectan la capacidad de un anticuerpo para combinarse.

ANTICUERPOS: GENERALIDADES

Los anticuerpos son moléculas proteínicas producidas en respuesta a la presencia de una molécula extraña en el organismo. Son sintetizadas primariamente por las células plasmáticas (células de la estirpe de los linfocitos B), y circulan por la sangre y por la linfa donde se unen a los antígenos extraños. Tienen la capacidad de unirse de manera específica con el antígeno, y contribuyen a su destrucción o eliminación por medio de fagocitosis de los macrófagos.

Los anticuerpos constituyen una gran familia de glicoproteínas que comparten su estructura básica y sus características funcionales. Funcionalmente, pueden caracterizarse mediante su habilidad de unirse a los antígenos y a células especializadas del sistema inmune. Estructuralmente, los anticuerpos están compuestos por una o más copias de una unidad característica que puede describirse como una letra Y.

Muchas de las características estructurales principales de los anticuerpos se pueden describir con mayor facilidad considerando como modelo los anticuerpos IgG, los cuales contienen únicamente una unidad estructural Y y además son las más abundantes en el suero. Para simplificar en muchos estudios, se estudia las inmunoglobulinas del ratón, ya que sus propiedades son muy similares a las de otras especies.

Una manera simple de clasificar las proteínas de una solución es mediante precipitación con una solución de sulfato amónico. De esta manera, algunas proteínas permanecen en solución (albúminas), mientras que otras precipitan (globulinas). Mediante esta técnica se puede precipitar los anticuerpos a partir del suero, por lo que se les puede clasificar dentro del grupo de las globulinas.

Mediante electroforesis, se puede dividir las distintas proteínas del suero en función de su carga, quedando separadas las siguientes fracciones: albúmina sérica, α , β , y γ -globulinas. De ellas, son las γ -globulinas las proteínas séricas con mayor proporción de cargas positivas y las que contienen la mayor parte de los anticuerpos.

Dado que las moléculas de anticuerpos son globulinas, se les suele llamar inmunoglobulinas (Ig), recogándose bajo esta denominación todas las proteínas que presentan actividad como anticuerpos, así como algunas que tienen estructura molecular característica de estos últimos, pero a las que no se conoce actividad como anticuerpos. Estas últimas se engloban en la superfamilia de las Ig (IgSF), que comprende a un grupo de más de ochenta moléculas con características estructurales similares a las de la Ig pero con una función diferente; entre ellas se encuentran moléculas como el CD2, CD3, CD4, CD8, CD28...

Ya que las inmunoglobulinas son proteínas, son excelentes antígenos cuando se inyectan a especies distintas a la de origen. Como consecuencia, se pueden preparar antisueros que reaccionan con las moléculas de inmunoglobulinas. Usando estos antisueros, es posible demostrar que las inmunoglobulinas inmunes son heterogéneas, y pueden clasificarse en distintos isotipos o clases.

- Estructura primaria de las inmunoglobulinas

a) Unidad estructural básica: Cadenas ligeras y pesadas

Una inmunoglobulina (monómero), consta de cuatro cadenas polipeptídicas glicolisadas de las cuales, dos reciben el nombre de cadenas pesadas (H) y dos cadenas ligeras (L), iguales entre sí, unidas por puentes disulfuro que confieren estabilidad a la molécula, y siendo la longitud de las primeras aproximadamente el doble de las segundas (Fig. 3).

Tanto las cadenas pesadas como las ligeras, están formadas por unas estructuras proteicas conservadas denominadas “Dominio de Inmunoglobulinas”. Estos dominios están formados por aproximadamente 110 aminoácidos. Por otra parte, en la estructura de las inmunoglobulinas también juega un papel importante los hidratos de carbono, sobre todo en la región constante de las cadenas pesadas, y en particular en la zona CH₂ y en la región bisagra, aunque en las regiones variables de las cadenas pesadas sólo representa alrededor de un 15%. El papel de los azúcares no esta del todo claro, pero parece ligado a su catabolismo y también afecta a alguna de sus funciones, así se ha podido comprobar que las IgGs deglicosiladas pierden o disminuyen su capacidad para unirse a receptores celulares, así como para activar el complemento. La glicosilación del ratón y de todos los mamíferos, exceptuando al hombre, orangután y algunas especies de monos del viejo mundo, es realizada por la enzima α (1-3) galactosil transferasa (EC 2.4.1.1S1 o α GT). Ello tiene como consecuencia que los anticuerpos de la mayoría de los mamíferos presentan el epítipo α -Gal(1-3)Gal en sus azúcares. Este epítipo es objetivo de los xenoanticuerpos presentes en la especie humana, hecho de gran importancia cuando se emplean anticuerpos de ratón como agentes terapéuticos en el hombre.

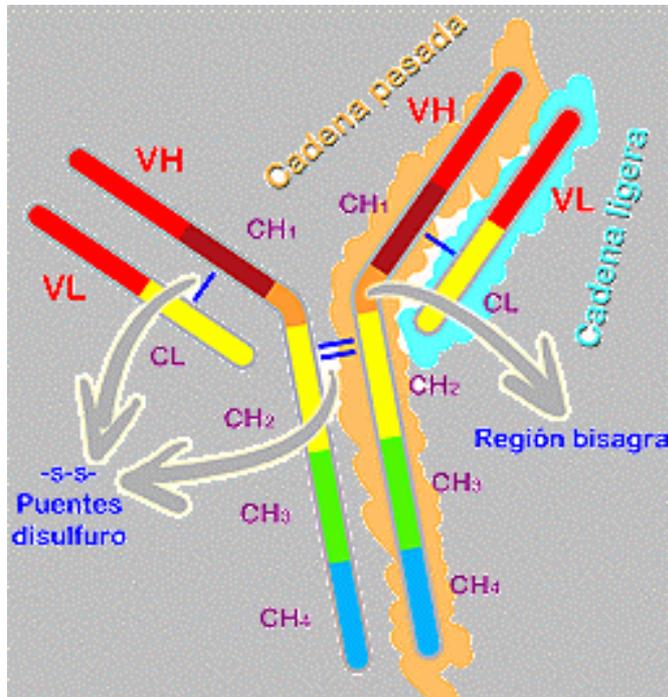


Figura 3. Esquema general de la inmunoglobulina G

b) Parte variable y constante de las cadenas ligeras y pesadas

Tanto la cadena H como la L de la inmunoglobulina están formadas por dos regiones, la primera de ellas compuesta por unos 110-120 aminoácidos terminales que definen la región variable (V), que representa la porción de la molécula de anticuerpo que se va a combinar con el antígeno. La segunda región la forman los extremos carboxi-terminales de ambas cadenas, que definen las diferentes clases de cadenas pesadas de las inmunoglobulinas o los tipos de cadena ligera (isotipos) y se denominan región constante (C). En estas regiones globulares hay zonas estabilizadas por uniones disulfuro intercadena, que se conocen como dominios. La porción variable recibe este nombre porque la secuencia de aminoácidos difiere de una Ig a otra en un mismo individuo, dependiendo del antígeno reconocido por la misma; por el contrario, la

secuencia de cambios en la porción constante es muy baja dentro de los individuos de una especie.

c) Dominios moleculares en las cadenas ligeras y pesadas

Los dominios de las Igs se denominan con dos letras seguidas de un número que indica su posición relativa en la molécula. La primera de ellas señala su pertenencia a la porción constante (C) o variable (V) de la misma, mientras que la segunda, indica si se trata de una cadena pesada (H) o ligera (L). La cadena pesada de una Ig consta de cinco dominios denominados VH, CH₁, CH₂, CH₃ y CH₄, mientras que la cadena ligera dispone sólo de dos, que se conoce como VL y CL (Fig. 3).

d) Regiones hipervariables

La variabilidad que se encuentra en los dominios V de las cadenas H y L de las Igs no está distribuida de modo uniforme en toda la longitud de estas regiones. Algunos segmentos polipeptídicos cortos muestran una gran variabilidad, y se les denominan regiones hipervariables o regiones determinantes de complementariedad (CDR). Estas regiones existen en número de tres en la porción variable de las cadenas ligeras y pesadas (CDR1, CDR2 y CDR3), y participan directamente en la formación de los sitios de combinación con el antígeno. Los estudios realizados sobre la estructura de las inmunoglobulinas revela un patrón común de estructura tridimensional, compartida por los dominios variables y constantes de las cadenas pesada y ligera, llamado patrón de plegamiento básico, en donde las regiones variables de ambas cadenas se encuentran plegadas; de esta forma, los CDRs se colocan juntos para crear una superficie de unión con el antígeno que se denomina paratopo.

Otra región de interés de la cadena pesada de las Igs es la llamada región bisagra, responsable de la flexibilidad de la molécula, y que permite que los dos lugares de unión al antígeno, que posee cada monómero, pueden operar independientemente. Esta región consiste en un segmento corto de aminoácido localizado entre los dominios CH₁ y CH₂ y es rico en prolina y cisteína.

- Estructura espacial de las inmunoglobulinas

Una vez conocida la secuencia primaria de los aminoácidos en las cadenas peptídicas de las inmunoglobulinas, la deducción de la estructura espacial permitió entender la forma en que millones de diferentes sitios de unión al antígeno son construidos sobre una estructura común.

Las inmunoglobulinas del hombre (Tabla 1) pueden estar constituidas por unidades básicas simples, como es el caso de la IgG, IgD e IgE, en forma de dímeros (dos unidades básicas unidas), como es el caso de la IgA o incluso por hasta cinco estructuras básicas unidas por sus extremos Fc como es el caso de la IgM. Esto se debe a la cualidad que tienen las cadenas μ y α de unirse entre sí. Esta unión se realiza a través de la cadena J (glicoproteína con Pm de 15 kD que une extremos Fc mediante puentes disulfuro en las IgA e IgM) y mediante puentes de hidrógeno.

- Subclases de inmunoglobulinas: Isotipos

No todas las inmunoglobulinas de una misma clase tienen idéntica estructura, sino que dentro de las clases se pueden establecer subclases considerando la secuencia de aminoácidos de la región constante de las cadenas H y el diferente número y situación de los

puentes disulfuro intercatenarios establecidos entre las cadenas pesadas (Fig. 4). Se pueden distinguir no sólo por sus secuencias sino también por su estructura antigénica a las que dan lugar estas secuencias.

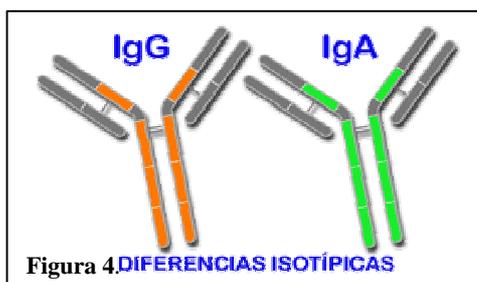


Tabla 1. Propiedades generales de las inmunoglobulinas humanas (Tizard, 1987; Harlow & Lane, 1988; Roitt, 1998)

Características	IgG	IgM	IgA	IgE	IgD
Cadena pesada	γ	μ	α	ϵ	δ
Cadena ligera	κ o λ	κ o λ	κ o λ	κ o λ	κ o λ
Coefficiente de sedimentación	7S	19S	7S, 9S, 11S ^a	8S	7S
Peso molecular	180.000	900.000	360.000	200.000	180.000
Fórmula molecular	$\gamma_2\kappa_2$ o $\gamma_2\lambda_2$	$(\mu_2\kappa_2)_5$ o $(\mu_2\lambda_2)_5$	$(\alpha_2\kappa_2)_n$ ^b o $(\alpha_2\lambda_2)_n$	$\epsilon_2\kappa_2$ o $\epsilon_2\lambda_2$	$\delta_2\kappa_2$ o $\delta_2\lambda_2$
Estructura Y					
Valencia^c	2	10	2, 4, o 6	2	2
Concentración en suero	8-16 mg/ml	0,5-2 mg/ml	1-4 mg/ml	10-400 ng/ml	0-0,4 mg/ml
% Igs totales	80	6	13	0,002	0-1
% contenido carbohidratos	3	12	8	12	13

^a El dímero en las secreciones externas acarrea componente secretor S

^b n= 1, 2, o 3

^c Sitios de unión al antígeno

Las regiones constantes de las cadenas pesadas de estas diferentes clases y subclases de inmunoglobulinas se conocen como variantes isotípicas (Tabla 3) y son las mismas en el suero de todos los individuos normales de la misma especie. Los determinantes isotípicos, por definición, son reconocidos por anticuerpos de una especie diferente (antisuero heterólogo). Existen cinco isotipos de cadena pesada (M, G, A, D y E) y dos de cadena ligera (κ y λ).

Los principales isotipos (IgM, IgG, IgA, IgE) han sido aislados y caracterizados en vaca (Fey et al, 1976; Butler, 1983, 1986; Besser et al, 1988), cerdo (Vaerman et al, 1971; Rapacz et al, 1982; Zikan et al, 1983) y caballo (Vaerman et al, 1971; Allen y Dalton, 1975; Suter y Fey, 1981) (Tabla 2).

En animales de interés veterinario, es de gran utilidad el estudio del isotipo predominante de Ig para combatir infecciones y otras enfermedades (Suter, 1992).

Tabla 2. Clases y subclases de las inmunoglobulinas en humano y animales domésticos (Halliwell, 1989; Roitt, 1998).

Especie	Subclases de IgG	Subclases de IgA	IgM	IgE	Otras
Hombre	IgG ₁ , IgG ₂ , IgG ₃ , IgG ₄	IgA ₁ , IgA ₂	IgM	IgE	
Perro	IgG ₁ , IgG ₂ [*] , IgG ₃ [*] , IgG ₄ [*]	IgA	IgM	IgE	¿IgD
Gato	IgG ₁ , IgG ₂	IgA	IgM	¿IgE	
Caballo	IgG _a , IgG _b , IgG _c , IgG(B)	IgA	IgM	IgE	Al
Vaca	IgG ₁ , IgG ₂	IgA	IgM	IgE	
Oveja	IgG ₁ , IgG ₂	IgA ₁ , IgA ₂	IgM	¿IgE	
Cerdo	IgG ₁ , IgG ₂	IgA ₁ , IgA ₂	IgM	¿IgE	¿5S IgG
Pollo	IgG ₁ , IgG ₂ , IgG ₃	IgA	IgM		

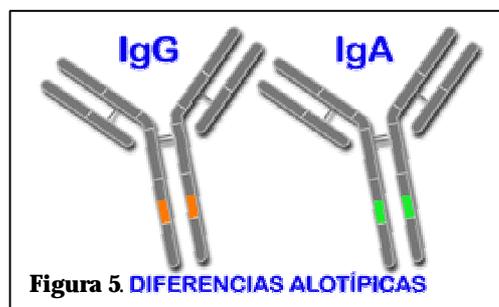
* Anteriormente denominadas IgG_{2a}, IgG_{2b} e IgG_{2c}

- Marcadores antigénicos de las inmunoglobulinas

Además de los determinantes antigénicos de las principales cadenas pesadas que determinan la clase y subclase de las inmunoglobulinas, existen otra serie de marcadores antigénicos de gran interés, que son los alotipos e idiotipos.

a) Alotipos

Este tipo de variación depende de la existencia de formas alélicas (codificadas por alelos o genes alternativos en un solo locus), que por tanto producen marcadores genéticos. De la misma manera que los hematíes pueden diferir en los individuos genéticamente distintos, respecto al sistema antigénico del grupo sanguíneo A, B, O, las cadenas pesadas Ig difieren en la expresión de sus grupos alotípicos.



Los alotipos (Tabla 3) reflejan pequeñas diferencias, constantes entre individuos de la misma especie, en la secuencia de aminoácidos de inmunoglobulinas que por lo demás son similares; estas diferencias están determinadas por varios alelos y se heredan según las leyes de Mendel. Por definición, son detectados por antisueros homólogos. Así, cuando se aísla una inmunoglobulina de un individuo y se inyecta a otro individuo

de la misma especie, este último produce anticuerpos frente a ella. Los determinantes alotípicos o alotipos se sitúan en la región constante de las cadenas pesadas y ligeras (Fig. 5).

En la especie humana, se han descrito tres tipos de alotipos:

Gm en las cadenas de las IgG

Am en las cadenas de las IgA

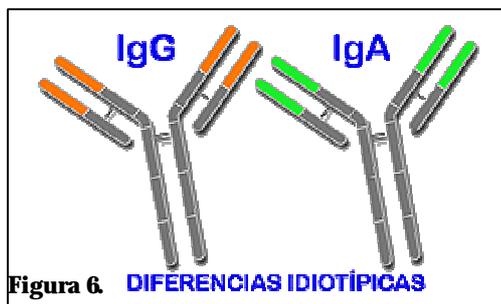
Km en las cadenas ligeras κ que dan lugar a tres alotipos:

Km (1,2), Km (1) y Km (3).

No se han descrito los alotipos de cadenas pesadas en todas las especies domésticas: sólo se conocen algunos en vaca, oveja, cerdo, conejo y ratón. No se hayan bien documentados los alotipos de cadenas ligeras en especies domésticas.

b) Idiotipos

La variantes idiotípicas (Tabla 3) se pueden encontrar en un solo individuo de una misma especie o en varios, dependiendo si estuvieron o no en contacto con el mismo antígeno. En este caso las diferencias entre las Igs se encuentran en la parte hipervariable de las cadenas H y/o L, y son exclusivos para las moléculas producidas por un clon determinado de células productoras de anticuerpos, y están formados por la estructura exclusiva de la porción fijadora de antígeno (Fig. 6).



Los idiotipos son usualmente específicos de un anticuerpo particular (idiotipos privados), pero son compartidos a menudo entre distintos anticuerpos (idiotipos públicos, crosreactivos o recurrentes).

Actualmente, se le atribuye gran importancia a los idiotipos de las inmunoglobulinas por su participación en la regulación del sistema inmune. Según la teoría de la red de Jerne, frente a los idiotipos se formarían anticuerpos que al unirse a los mismos formarían un entramado de anticuerpos unidos a otros anticuerpos que tendrían como acción final la regulación del proceso de síntesis de nuevas inmunoglobulinas.

Tabla 3. Resumen de las variables de las inmunoglobulinas (Roitt, 1980; Roitt, 1998)

Tipo de variación	Distribución	Variante	Localización	Ejemplos
ISOTÍPICA	Todas las variantes en suero de un individuo normal	Clases Subclases Tipos Subgrupos Subgrupos	C _H C _H C _L C _L V _H /V _L	IgM, IgE IgA1, IgA2 κ, λ λOz + λO-z V _{KI} V _{KII} V _{KIII} V _{HI} V _{HII} V _{HIII}
ALOTÍPICA	Formas alternativas: genéticamente controladas; por lo tanto no en todos los individuos. Implica diferentes alelos en un locus	Alotipos	Principalmente C _H C _L , a veces V _H /V _L	Grupos Gm (humano) b4, b5, b6, b9 (cadenas ligeras conejo) Igh-1 ^a , Igh- 1 ^b (cadenas pesadas γ _{2a} de ratón)
IDIOTÍPICA	Individualmente específicas a cada molécula de inmunoglobulina	Idiotipos	Regiones variables	Probablemente una o más regiones hipervariables que forman la zona de combinación con el antígeno

- Distribución de las inmunoglobulinas

Las inmunoglobulinas se encuentran distribuidas en todos los fluidos orgánicos de los vertebrados. Las cantidades relativas de cada una de las clases de inmunoglobulinas en los diferentes compartimentos del organismo son muy diferentes. Todas las inmunoglobulinas se encuentran en el torrente sanguíneo, en donde, sin embargo predomina la IgG. Por otra parte, en las secreciones (saliva, lágrimas, secreción bronquial, así como líquido cefalorraquídeo y mucosas) la IgA es la predominante (German et al, 1998; Ginel et al, 1993; Heddle et al, 1975).

Los niveles de inmunoglobulinas séricas fluctúan ampliamente en función de diversos aspectos, tales como el estado nutricional, la edad, etc.

Las inmunoglobulinas también pueden encontrarse insertas en la membrana de los linfocitos, en donde actúan como receptores de las señales de activación antigénicas por su capacidad de reconocimiento del antígeno (Sánchez et al, 1993).

- Función de las inmunoglobulinas: Union antígeno-anticuerpo

La función esencial de las inmunoglobulinas (Tabla 4) es la de unirse al antígeno que indujo su formación. De esta manera, las inmunoglobulinas actúan como receptoras de señales antigénicas o bien pueden colaborar en la destrucción antigénica. La primera función se presenta cuando las inmunoglobulinas se encuentran insertas en la membrana de los linfocitos B (inmunoglobulinas de membrana), y para la segunda requieren la colaboración del complemento, macrófagos, neutrófilos y células NK, que tienen la propiedad de unirse a las inmunoglobulinas (propiedades biológicas) por su extremo Fc.

La especificidad de las interacciones entre un anticuerpo y un epítipo, se explica porque las diversas secuencias de aminoácidos en las regiones hipervariables dan lugar a una cadena peptídica con una forma característica. Como consecuencia, existe una región en la superficie de una molécula de inmunoglobulina que tiene una conformación única. La molécula de anticuerpo se unirá sólo con los epítopos cuya forma corresponda exactamente a la conformación de su propio sitio de unión.

Tabla 4. Propiedades biológicas de las clases principales de inmunoglobulinas en el hombre (Roitt, 1980)

	IgG	IgA	IgM	IgE
Características principales	Ig más abundante de los líquidos corporales internos, particularmente extravasculares donde combate microorganismos y sus toxinas	Principal Ig en secreciones seromucosas en donde defiende las superficies corporales externas	Aglutinador muy eficaz, producción precoz en la respuesta inmunitaria	Protección de superficies externas del cuerpo. Recluta agentes antimicrobianos. Aumenta en infecciones parasitarias. Responsable de los fenómenos de alergia atópica
Fijación del complemento				
-Vía clásica	++	-	+++	
-Vía alternativa	-	±	-	
Atraviesa placenta	+	-	-	-
Fijación a mastocitos y basófilos	-	-	-	-
Unión a macrófagos y polimorfos	+	±	-	-

En una inmunoglobulina, el sitio de unión con los antígenos es bastante mayor que un epítipo único, y puede concebirse como formado por un cierto número de sitios de unión para antígenos diferentes, y no relacionados entre sí, que están unidos en forma muy estrecha. Cuando se desencadena una respuesta inmunitaria contra un único epítipo, se producen muchas moléculas diferentes de anticuerpos que tienen una característica común: la capacidad de unirse al epítipo inductor. Estas moléculas también serán capaces de unirse a otros epítipos no vinculados con el anterior pero, como la actividad contra cualesquiera de esos epítipos no vinculados sólo existirá en unas cuantas moléculas, permanecerán sin que se las detecte y el antisuero parecerá ser específico.

La unión antígeno-anticuerpo es semejante a la que se establece entre la enzima y su substrato, esto es, no covalente (puentes de hidrógeno, fuerzas de van der Waals y uniones hidrofóbicas) y débil, de manera que implica una gran proximidad entre el Ag y el Ac para que acontezca, y además es reversible.

La consecuencia final de la acción de las inmunoglobulinas es la de anular los efectos nocivos de los antígenos, así como destruir el antígeno que indujo su formación. La anulación de los efectos como la destrucción del antígeno, lo consiguen las inmunoglobulinas de muy diversas formas, dependiendo del tipo y manera de encontrarse el antígeno y también del tipo de inmunoglobulina que interviene. Tras la unión del antígeno y la inmunoglobulina, ésta puede anular la acción del antígeno por neutralización, precipitación o aglutinación del mismo.

A pesar de que comparten características estructurales similares, los anticuerpos de superficie de los receptores de las células B o T encontrados en las células T están codificados por familias de genes distintas; siendo su expresión específica del tipo celular. Los anticuerpos de superficie de las células B puede unirse a antígenos solubles, mientras

que los receptores de las células T reconocen antígenos únicamente cuando están expuestos en la superficie de otras células.

Dado que los anticuerpos y las células T citotóxicas son muy eficientes a la hora de eliminar antígenos, es muy importante que el sistema inmune sea capaz de distinguir las moléculas extrañas de los componentes normales del organismo. El organismo normalmente no produce respuesta inmune contra sus propias macromoléculas. Este tipo de respuesta es conocido como tolerancia. La tolerancia es establecida y mantenida mediante la constante eliminación de linfocitos producidos por los receptores celulares T o por anticuerpos que se unen a las moléculas extrañas. Si este proceso selectivo falla, el organismo produce una respuesta inmune contra sí mismo. Esta respuesta produce una serie de desórdenes denominados en conjunto enfermedades autoinmunes.

Cuando un animal entra en contacto por primera vez con un antígeno extraño, la respuesta inmune es baja. Gracias al desarrollo de la respuesta inmune, se produce la destrucción del antígeno extraño. Si el antígeno es un patógeno, esta respuesta tenue puede ser insuficiente para prevenir el desarrollo de la enfermedad. Una segunda exposición al mismo antígeno produce una respuesta inmune más rápida y de mayor intensidad, a menudo suficiente para eliminar el patógeno antes de que ocasione la enfermedad. Esta capacidad de provocar una respuesta inmunitaria intensa es denominada memoria inmunológica. La memoria inmunológica es específica; antes del contacto con un antígeno no podrá proteger contra el mismo. La memoria inmunológica puede permanecer durante toda la vida del individuo.

Ya que los receptores de cada linfocito se pueden unir únicamente a un antígeno, es fácil determinar cómo responde el sistema inmune específicamente contra un antígeno particular, activando un linfocito u otro. Cuando los anticuerpos de superficie de las células B se unen a un antígeno, los linfocitos B se activan para secretar anticuerpos y se

estimulan para proliferar. Las células T responden de un modo similar. Este aumento de la división celular incrementa el número de linfocitos antígeno-específicos, y esta expansión clonal es el primer paso en el desarrollo de una respuesta inmune efectiva. El lugar donde se inicia esta división celular son los órganos linfoides. Siempre y cuando los antígenos persistan en el organismo, la activación de los linfocitos continúa, incrementando así la intensidad de la respuesta inmune. Después de la eliminación de los antígenos, algunos de los linfocitos antígeno-específicos permanecen en la circulación. Estas células están encargadas de responder a cualquier futura exposición al mismo antígeno, proporcionando las bases celulares de la memoria inmunológica.

Un segundo tipo de selección clonal juega el papel para la tolerancia. En este caso, los linfocitos cuyos receptores de superficie celular se unen a los componentes del hospedador son eliminados del sistema inmune mediante un proceso conocido como supresión clonal. Los clones auto-reactivos se eliminan específicamente durante su diferenciación. Este proceso es particularmente activo mientras el sistema inmune se está desarrollando, pero ya que los nuevos linfocitos están siendo producidos constantemente, este proceso de selección puede continuar durante toda la vida.

- Tolerancia: Fallos en la respuesta inmune

Una razón bien documentada por la cual un animal puede fallar en su respuesta inmune hacia una molécula determinada es que las células B y/o T apropiadas han sido eliminadas durante el desarrollo de la auto-tolerancia. Un animal elimina la respuesta contra su propio organismo mediante la eliminación de las células B o T que se pueden unir a receptores de las células receptoras. Así mismo, si se inyecta un tipo de molécula idéntica o muy similar a las del hospedador, es ignorada por el

sistema inmune. Se puede inducir la tolerancia mediante la eliminación de un clon particular antígeno-específico de las células B o T, siendo las de estas últimas las más comunes. La tolerancia de las células B no puede superarse, mientras que la de células T si puede serlo mediante una modificación del antígeno.

Otra razón por la que el animal no puede responder a un componente particular es el fallo de las proteínas clase II que se unen al fragmento antigénico. Este fallo es poco usual. Sin embargo, como hay más de 40 clases distintas de proteínas sintetizadas por cada animal, algunos individuos podrían no responder a los mismos antígenos debido a la ausencia de moléculas clase II apropiadas. Este tipo de fallo en la inmunidad, es más frecuente en animales domésticos y en ciertas cepas de ratones de laboratorio que en otros animales silvestres, como es el caso del conejo. Muchos antígenos podrán tener al menos un fragmento que se pueda unir a las proteínas de clase II, y un fragmento por molécula inmunizante es todo lo que se necesita para permitir que todos los epítomos de un inmunógeno sean reconocidos.

Las inmunoglobulinas, al detectar a los antígenos y producir la subsiguiente unión a ellos, actúan como transductores de la información de la presencia de los mismos que serían destruidos por el complemento, macrófagos, los polimorfonucleares o las células NK.

Cuando se produce la unión de antígeno e inmunoglobulina IgG, se producen una serie de cambios alostéricos en el extremo Fc de la IgG que hacen que se una a receptores que se encuentran en la membrana de macrófagos y polimorfonucleares. A este fenómeno se le conoce como opsonización. Al producirse esta unión, los macrófagos se activan, iniciándose el fenómeno de fagocitosis de los complejos Ag-Ac y subsiguiente de destrucción de los mismos por procesos líticos intracelulares.

ANTICUERPOS CANINOS

Diversos análisis serológicos, bioquímicos y genéticos han mostrado que todas las especies de interés veterinario tienen clases y subclases de Ig similares a las de las especies más estudiadas (Suter, 1992), pudiéndose por tanto extrapolar los conocimientos sobre ciertas especies más estudiadas al resto.

La estructura básica de las inmunoglobulinas caninas ha sido definida a partir de la descrita en humano (Tabla 4) y ratón. Existen reglas generales que se aplican a la función biológica de las inmunoglobulinas de todas las especies.

Tabla 5. Propiedades de las inmunoglobulinas caninas (Pastoret et al, 1998)

Propiedad	IgG	IgM	IgA	IgE	IgD
Tamaño (kDa)	180.000	900.000	360.000	200.000	180.000
Concentración (mg/ml)					
Suero	7-20 IgG ₁ : 3-14 IgG ₂ : 3-14 IgG ₃ : < 0,01-2 IgG ₄ : < 0,04-2	0,7-2,7	0,2-1,5	0,007-0,72	?
Saliva	0,005-0,05	0,005-0,07	17-125		
Calostro	5-22	0,7-3,7	1,5-3,4		
Leche	0,1-0,3	0,1-0,54	1,1-6,2		
Extracto Fecal	0,9-10,7	0,5-1,6	0,8-5,4		
Transferencia placentaria	Si	No	No	No	No
Fijación del complemento	Si	Si	No	?	?
Opsonización	Si	Si	No	?	?
Neutralización	Si	Si	Si	?	?
Aglutinación	Si	Si	Si	?	?
Actividad reagénica	No	No	No	Si	No

En el perro se han caracterizado cuatro isotipos principales de inmunoglobulinas (Tabla 5) denominados IgM, IgA, IgG e IgE. En esta especie no se ha descrito la IgD, aunque si existen referencias sobre una molécula con características tales que la podrían identificar como este tipo de Ig. Se trata de una molécula con un peso molecular de 185 kDa en condiciones no reductoras (lo que indicó que se trataba de una inmunoglobulina que contenía cadena ligera). Bajo condiciones de reducción, el peso molecular de la cadena pesada fue de 55 kDa. Esta molécula no reaccionó con anticuerpos monoclonales anti-IgG, IgE, IgM e IgA, aunque si reaccionó con uno de los anticuerpo usados en este estudio. La inmunoglobulina reconocida por este anticuerpo se encontró por inmunofluorescencia en la superficie de los linfocitos caninos. Esta inmunoglobulina se unió a la proteína G y a la proteína A y su actividad frente al anticuerpo mencionado no disminuyó tras un tratamiento a 56°C durante 2 horas (Yang et al, 1995).

INMUNOGLOBULINA G (IgG)

- Aspectos generales

La inmunoglobulina G es la más abundante en todas las especies y representan entre un 65 y un 80% de las Igs totales; las diferentes subclases se presentan en proporciones muy diferentes. La principal función biológica de la IgG es el fenómeno de la eliminación de los microorganismos y la neutralización de las toxinas. La IgG se sintetiza de forma tardía tras un primer contacto con el antígeno; sin embargo, tras un segundo contacto, la mayoría de las Igs formadas pertenecen a esta clase (respuesta secundaria). Gracias a su capacidad de atravesar la placenta, proporciona una gran línea de defensa contra la infección durante las

primeras semanas de vida, que será reforzada posteriormente con la transferencia de IgG del calostro a través de la mucosa intestinal del neonato. La IgG difunde con más rapidez que las otras inmunoglobulinas en el interior de los espacios extravasculares del organismo, en donde, como especie predominante, lleva la carga mayor de neutralización de las toxinas bacterianas y de unión a los microorganismos para aumentar su fagocitosis. Los complejos de las bacterias con el anticuerpo IgG activan el complemento, atrayendo por lo tanto mediante quimiotaxis a las células polimorfonucleares fagocitarias que se adhieren a las bacterias a través de los receptores de superficie para el complemento y la porción Fc de la IgG (Fc γ); la unión al receptor Fc estimula entonces la ingestión de los microorganismos mediante la fagocitosis. De forma similar, la destrucción extracelular de las células diana recubiertas con IgG está mediada ampliamente por el reconocimiento del Fc γ por parte de las células NK que poseen los receptores adecuados. La interacción de los complejos IgG con los receptores Fc de las plaquetas conduce, presumiblemente, a la agregación y liberación de aminas vasoactivas, pero aún no está claro el significado fisiológico de las zonas Fc γ de unión en otros tipos de células, particularmente de los linfocitos. Estos procesos culminan en la lisis del microorganismo o de la célula infectada, lo que evita la unión específica de los virus a los receptores virales de la superficie celular y facilita la eliminación de los microorganismos y partículas recubiertos de IgG mediante las células portadoras del receptor Fc.

La hipótesis de que la individualidad biológica de las diferentes clases de inmunoglobulinas depende de las regiones constantes de las cadenas pesadas, particularmente de Fc, se confirma ampliamente en la relación de actividades discutidas anteriormente, como son el paso transplacentario, la fijación del complemento y la unión a diversos tipos

de células, en donde se muestra que la función está mediada por la parte Fc de la molécula.

Respecto a la regulación global de los niveles de IgG en el organismo, la velocidad catabólica parece depender directamente de la concentración total de IgG, mientras que la síntesis está ampliamente gobernada por la estimulación antigénica, de forma que en los animales sin gérmenes, por ejemplo, los niveles de IgG son extremadamente bajos, pero aumentan rápidamente al pasarlos a un medio ambiente normal.

Las subclases de IgG presentan diferencias en cuanto a antigenicidad, estructura, susceptibilidad a la digestión enzimática, genética, síntesis, catabolismo, niveles séricos y propiedades biológicas. La presencia de estas subclases han sido descritas en muchas especies, y han sido bien caracterizadas en humano, rumiantes, cobaya y ratón; hay algunas excepciones como es el caso del conejo, que no posee subclases de IgG bien definidas. En humano existen cuatro tipos de IgG: la IgG₁ es la subclase más frecuente (9mg/ml), seguida de la IgG₂ (3 mg/ml), mientras que la IgG₃ (3 mg/ml) y la IgG₄ (0,5 mg/ml) se encuentran en mucha menor proporción.

- La IgG canina

Los valores medios de IgG en suero de perro son de 9-15 mg/ml.

En el caso del perro, se reconocen cuatro subclases: IgG₁, IgG_{2a}, IgG_{2b}, e IgG_{2c} (Mazza et al., 1993). Actualmente, se ha redefinido el nombre de estas fracciones en base a su similitud con la concentración relativa y movilidad electroforética de las subclases de IgG humana. Se han denominado: IgG₁ (8,17±0,95 mg/ml), IgG₂ (8,15±3,16 mg/ml), IgG₃(0,36±0,43 mg/ml), e IgG₄ (0,95±0,45 mg/ml). Dados los experimentos realizados para el aislamiento de las cuatro subclases, se puede concluir que están presentes en todas las razas caninas. En suero

de perro normal, los subisotipos predominantes son el IgG₁ e IgG₂, seguidos de IgG₃ e IgG₄ (Mazza et al, 1994a). La preparación de anticuerpos monoclonales frente a las subclases de la IgG canina ha ayudado a separarlas e identificarlas (Mazza et al, 1993).

Existe dificultad para medir los niveles de las distintas subclases de IgG por la escasez de antisueros específicos: en humano se han descrito anticuerpos contra las subclases de IgG humanas (Lawe et al, 1982), lo que ha hecho posible el desarrollo de técnicas sensibles como el ELISA (Kemeney et al, 1987). En el caso del perro, sólo se han descrito unos anticuerpos específicos frente a los isotipos de la IgG (Mazza et al, 1994b).

En humano se ha probado que la deficiencia de una subclase de IgG en particular está asociado con infecciones recurrentes. Por ejemplo, existe una disminución o ausencia de IgG₂ en pacientes con enfermedad respiratoria superior recurrente e infecciones pulmonares debido a bacterias encapsuladas (Scott et al, 1990).

De acuerdo con lo que se da en humano, el análisis cuantitativo y cualitativo de las subclases de IgG en perro, podría ser de igual importancia en la patogénesis de cantidad de enfermedades clínicas. Este análisis en perro no ha tenido aplicación por la escasez de reactivos específicos (Mazza et al, 1994b), aunque se ha descrito distintos niveles de inmunoglobulinas en diversas enfermedades.

En una repuesta de anticuerpos existe la posibilidad de que estén representadas todas las subclases de IgG, aunque normalmente una será la predominante. Hay ejemplos en los que puede existir asociación de una subclase con un antígeno concreto: En general, en el caso de producirse la reacción por medio de antígenos de naturaleza proteica se observa un incremento en los niveles de IgG₁ e IgG₃ (Van der Giessen & Groeneboer-Kempers, 1976; Mortimer & Widdowson, 1979; Beck, 1981; Bird et al, 1984). En el caso de que el antígeno sea un hidrato de carbono, se produce

un aumento en los niveles de IgG₂ (Riesen et al, 1976; Siber et al, 1980; Stevens et al, 1983; Bird et al, 1984; Barret et al, 1986). Se han descrito algunos casos particulares de niveles de subtipos de IgG, como es el caso de: aumento de IgG₃ en ratón como respuesta a hidratos de carbono (Perlmutter et al, 1978; Slack et al, 1980) e IgG₂ en humano (Young et al, 1968; Riesen et al, 1976; Barret & Ayoub, 1986). En el caso de antígenos proteicos, domina los niveles de IgG₁ en ratón y en humano (Slack et al, 1980; Stevens et al, 1983; Seppala et al, 1984; Skavril & Schult, 1984). Con respecto a los anticuerpos IgG₄, parecen estar relacionados con las exposiciones crónicas a los antígenos, especialmente en aquellas situaciones en las que se encuentran implicadas también la IgE (Shakib et al, 1979; Iskander et al, 1981; Aalberse et al, 1983). Así mismo, se ha definido la presencia de subisotipos de la IgG en relación con el tipo de infección, encontrándose aumentada la concentración de IgG₁ en infecciones víricas, la IgG₂ en infecciones bacterianas, y la IgG₄ en parasitaciones (Dhandayuthapani et al, 1992). A pesar de todo esto, estudios clínicos sugieren que una subclase particular de IgG no tiene porqué jugar un papel único e indispensable. Por lo tanto, la evolución que determina la expresión de una subclase de IgG resulta un misterio (Mazza et al, 1993). Sería necesario continuar el estudio de dicha expresión específica para poder definir con mayor exactitud el papel de estas subclases.

La caracterización molecular de los genes de las inmunoglobulinas caninas está aún muy retrasada con respecto a otras especies. Solamente se han clonado los genes de dos de las inmunoglobulinas caninas: IgA e IgE (Patel et al, 1995).

Los mecanismos y moléculas implicadas en la activación y señal de las células B no han sido estudiados en el perro (Pastoret et al, 1998).

Tabla 6. Niveles séricos (mg/ml) de subclases de IgG en perro con distintos estados inmunológicos (Mazza et al, 1994)

	IgG₁	IgG₂	IgG₃	IgG₄	IgG total
Sano	8,17	8,15	0,36	0,95	17,63
Anemia hemolítica autoinmune	4,20	14,70	1,70	1,40	22,00
Forunculosis anal	2,80	16,90	0,36	3,80	23,86
Hipotiroidismo	2,30	16,70	2,90	2,30	24,20
Otitis externa	2,40	16,60	1,50	2,30	22,80

OBTENCIÓN Y PURIFICACIÓN DE LAS IgGs CANINAS

La capacidad de unión de la Fc de las inmunoglobulinas a la proteína A del *Staphylococcus aureus*, permite mediante un proceso sencillo, la obtención de grandes cantidades de dichas inmunoglobulinas (Reed et al, 1990).

Mediante la purificación de la IgG de perro se obtiene un reactivo de gran importancia, tanto a nivel clínico como científico. Esta importancia queda recogida en las siguientes aplicaciones:

- Uso como inmunógeno

En primer lugar, se obtiene una proteína purificada que se puede usar para inyectar ratones u otras especies y producir anticuerpos monoclonales o policlonales, tal y como se explica a continuación en el capítulo de “Materiales y Métodos”. Este hecho sería el paso inicial a seguir en la producción de los anticuerpos, tanto monoclonales como policlonales, su importancia se expondrá en apartados posteriores.

- Uso para el tratamiento de enfermedades

Mediante este mismo método de purificación, y obteniendo el suero de perros con distintas enfermedades, se puede aislar la IgG que en este caso será específica de esa enfermedad en concreto. Estas IgGs específicas podrán ser usadas en el tratamiento o prevención de dichas patologías.

Este elemento terapéutico está empezando a ser aplicado experimentalmente en la Facultad de Veterinaria de la Universidad de Auburn (Alabama), no habiéndose encontrado en la actualidad resultados publicados al respecto.

Dicho tratamiento lo han iniciado con la purificación de la IgG de perros recién recuperados de la infección por parvovirus. En ensayos clínicos, y tras la administración de esta IgG junto con el tratamiento tradicional (paliativo) se comprobó que los pacientes se recuperaban con mayor rapidez que aquellos que recibieron únicamente el tratamiento convencional. Ninguno de los individuos tratados con IgG necesitó alimentación parenteral ni transfusión sanguínea. Este tratamiento redujo la mortalidad de un 16 a un 10%, el tiempo necesitado para que el perro recuperara el apetito y su estado normal. Todo esto llevó a la reducción de los gastos debidos a hospitalización, tratamiento, cuidados, etc.

Unos resultados parecidos a estos se obtenían en el pasado inyectando al animal enfermo plasma de un donante que se había recuperado de la enfermedad. Se piensa que al inyectar la IgG purificada se conseguirán resultados más eficaces que con el plasma.

Este tratamiento no sirve para curar en si la enfermedad, pero consigue reducir la mortalidad, los costes, y los animales curados quedan inmunizados de por vida. Así mismo, el coste derivado de su uso parece que será razonable.

LOS ANTICUERPOS EN EL ESTUDIO DE LAS INMUNOGLOBULINAS

- Anticuerpos policlonales

La producción de anticuerpos es la culminación de una serie de interacciones entre los macrófagos, linfocitos T y linfocitos B, los cuales reaccionan frente a la presencia de un antígeno extraño. El producto final de esta respuesta es la producción de gran cantidad de anticuerpos que se unen específicamente al antígeno, retirándolo inmediatamente de la circulación del animal.

Un antisuero policlonal (Anticuerpo policlonal) es el suero producido de manera convencional por un animal inmunizado – usualmente conejo, oveja o cabra. Se denominaron así porque contienen una mezcla compleja de anticuerpos dirigidos frente a una gama de determinantes antigénicos localizados sobre un determinado antígeno. La mayor ventaja del suero policlonal radica en su capacidad de formar gran cantidad de inmunocomplejos insolubles con el antígeno. Este tipo de antisueros es excelente cuando se estudia el antígeno como un todo, así como proporcionan una amplia barrera de protección del organismo al formarse una gran variedad de anticuerpos. Sin embargo, como el antisuero contiene especificidades no deseadas, resulta pobre cuando se estudian determinantes antigénicos específicos. Por todo esto, el antisuero animal tiene ciertas limitaciones para su aplicación en inmunoensayos. La principal limitación radica en su escasa especificidad (incluso cuando reaccionan con antígenos pequeños) y su variabilidad entre animales y lotes.

Un antisuero es el producto de muchos clones de células y, en consecuencia, es heterogéneo a muchos niveles: en la clase y subclase (isotipos) del anticuerpo producido, su especificidad, título y afinidad. En

un suero puede haber anticuerpos frente a unos cuantos antígenos (multiespecífico o poliespecífico), a algunos antígenos (oligospecífico) o a un antígeno simple (uniespecífico), pero incluso en el último caso el reactivo no es homogéneo. El significado de la heterogeneidad entre anticuerpos policlonales en la práctica quiere decir que cada producto es único en una composición de anticuerpos específica, y requieren ser analizados por separado para determinar su capacidad en cada inmunoensayo particular. Un suero normal sin purificar suele contener un 20-30% de inmunoglobulinas: esto reduce su eficiencia en muchos procesos y puede producir gran ruido fondo en otros.

El uso de antisueros policlonales para medir la IgG total está limitado por el hecho de que este antisuero puede no ser específico frente a las cuatro subclases, como resultado de la técnica usado para su preparación (Mazza et al, 1994b). Esta teoría está apoyado por el hecho de que la cantidad total de IgG de cada suero, medida con un antisuero policlonal, fue significativamente menor que el total obtenido por la suma de las subclases individuales medidas con anticuerpos específicos de cada subclase. (Reynold & Johnson, 1970; Heddle & Rowley, 1975; Schultz, 1978).

Por todo esto, los anticuerpos policlonales no pueden ser preparados o usados rutinariamente en ocasiones en las que se necesite especificidad para determinar estructuras y diferencias antigénicas entre moléculas a nivel de epítomos individuales.

- Anticuerpos monoclonales

a) Generalidades

Los problemas originados por el uso de los anticuerpos policlonales han sido superados desde que Kohler y Milstein, en 1975,

consiguieron la producción de anticuerpos mono-específicos, conocidos como anticuerpos monoclonales. La producción de estos anticuerpos se basa en el hecho de que es posible fusionar linfocitos de bazo de ratones, adecuadamente inmunizados con un antígeno, con una línea celular de mieloma inmortal adaptada al cultivo celular. Este procedimiento genera diversos hibridomas, cada uno de los cuales tiene la capacidad de secretar anticuerpos frente a uno solo de los determinantes antigénicos. Así, la especificidad de las células B del bazo queda inmortalizada tras la fusión con las células de mieloma. Los hibridomas se seleccionan en busca de su unión con el antígeno mediante técnicas inmunológicas específicas y aquellos clones que resultan de interés son clonados para conseguir una línea celular estable capaz de crecer indefinidamente (Fig. 7).

El medio de cultivo celular en el que crecen estas células contiene grandes cantidades de anticuerpos monoclonales homogéneos (10 µg/ml). Sin embargo, existe la ventaja adicional de que las células del hibridoma pueden crecer como tumores ascíticos trasplantables en ratones histocompatibles, produciendo líquido ascítico con concentraciones muy altas del anticuerpo monoclonal (hasta 20 mg/ml). Es posible, por tanto, producir cantidades ilimitadas de anticuerpos específicos que reconozcan sólo a un determinante antigénico, incluso cuando el determinante antigénico presente en el inmunógeno sea débil o impuro.

El especial valor de los anticuerpos monoclonales radica en la capacidad de seleccionar una sola porción de un antígeno, que puede por tanto permitir la definición y separación de poblaciones celulares y el análisis de antígenos bacterianos.

El uso de anticuerpos monoclonales simplifica muchos estudios de difícil resolución con el uso de sueros policlonales, con lo que se puede incrementar la cantidad de moléculas disponibles para la investigación.

Con el desarrollo de los anticuerpos monoclonales se ha abierto un amplio campo en la inmunología y la biología molecular en general, puesto que estos anticuerpos son de una gran utilidad por cuanto reaccionan frente a un solo epítipo del antígeno y son entre sí homogéneos. Desde su aparición, se han producido anticuerpos monoclonales frente a un amplio rango de epítopos.

Los anticuerpos monoclonales han permitido disponer de unos reactivos de gran especificidad frente a las diferentes células del sistema inmune canino y comprender mejor su papel en los mecanismos de respuesta inmune. Gracias a estos anticuerpos también se han podido conocer mejor las diferentes clases y subclases de inmunoglobulinas caninas.

b) Método de producción de anticuerpos monoclonales

A principios de los 70, algunos grupos de investigación trabajaban en diferentes métodos para mantener y expandir *in vitro* células secretoras de anticuerpos. Para las células murinas, estos aspectos prácticos se resolvieron aplicando técnicas usadas en células somáticas. Mediante la fusión de dos células con capacidad para crear un hibridoma viable, Köhler y Milstein (1975) mostraron que se podía mantener líneas celulares secretoras de anticuerpos *in vitro*. Las dos células usadas comúnmente en las fusiones son células secretoras de anticuerpos aisladas de animales inmunizadas y células de mieloma. Las células de mieloma proporcionan los genes necesarios para continuar la división celular en cultivo celular, y las células secretoras de anticuerpo proporcionan los genes funcionales de inmunoglobulinas.

Trabajos más recientes han resuelto los tres problemas técnicos para realizar una fusión con éxito, que son:

- 1.- Encontrar patrones de fusión adecuados.
- 2.- Definir las condiciones para una fusión eficiente.
- 3.- Elegir un sistema apropiado para seleccionar los hibridomas celulares entre las células no fusionadas.

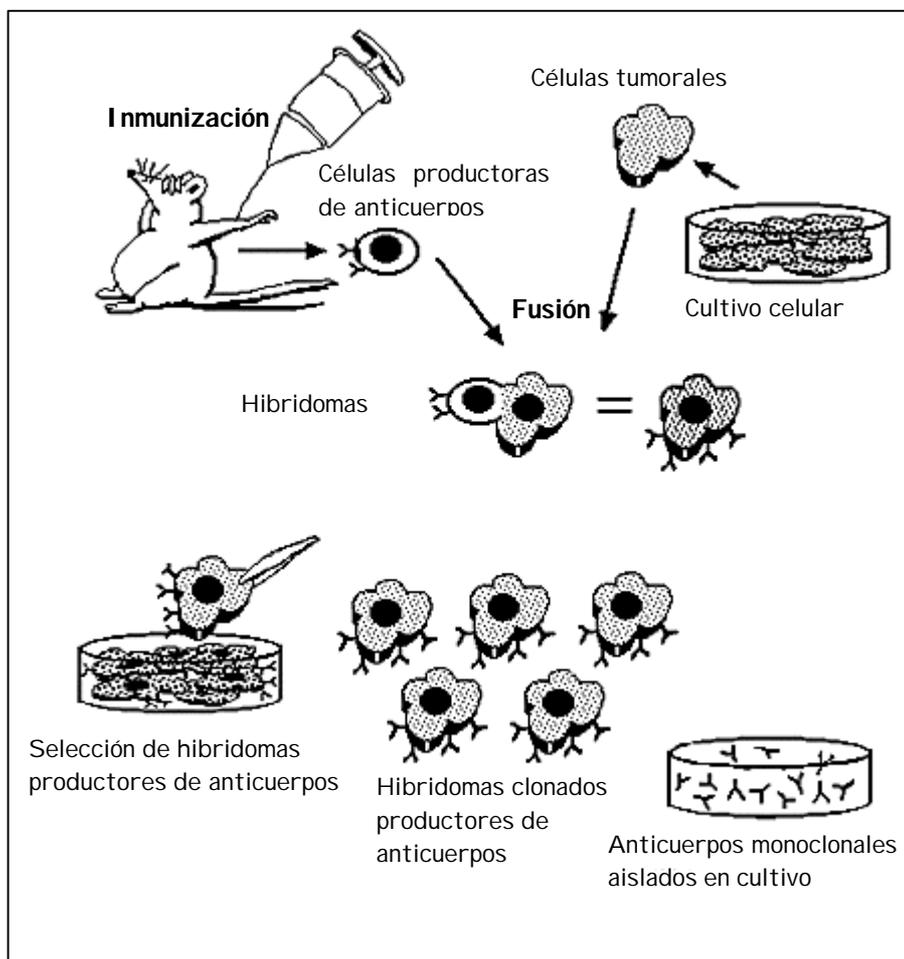


Figura 7. Esquema general de la producción de anticuerpos monoclonales

Una vez seleccionados los hibridomas positivos contra el inmunógeno utilizado, es fundamental el siguiente paso a realizar: la clonación, que tiene como objetivo aislar el hibridoma productor del anticuerpo deseado y que todas las células que lo constituyen procedan de la misma célula progenitora, dado que los hibridomas productores de anticuerpos se encuentran mezclados en cultivo con otros hibridomas que o bien no son productores o sintetizan anticuerpos que no interesan. Estos hibridomas, una vez clonados, constituyen una fuente inagotable del anticuerpo producido.

c) Características y utilidad de los anticuerpos monoclonales

La utilidad de los anticuerpos monoclonales se debe a tres características esenciales:

- 1.- Unión específica al antígeno contra el cual han sido producidos.
- 2.- Homogeneidad.
- 3.- Habilidad para ser producidos en cantidades ilimitadas.

La producción de anticuerpos monoclonales permite el aislamiento de reactivos con una especificidad única y selectiva. Ya que todos los anticuerpos producidos por los descendientes de un hibridoma celular son idénticos, los anticuerpos monoclonales son reactivos poderosos para detectar la presencia de un epítipo determinado. Los hibridomas celulares proporcionan igualmente una fuente ilimitada de anticuerpos. Así mismo, se ha comprobado que grandes lotes de antisuero pueden caducar. Los hibridomas superan este tipo de dificultades. Además, una ventaja única de la producción de hibridomas es que los antígenos impuros pueden usarse para producir anticuerpos específicos. Ya que los hibridomas son clonados antes de usarse, pueden

producirse anticuerpos monoespecíficos después de inmunizar con mezclas complejas de antígenos.

El uso más generalizado de los anticuerpos monoclonales se centra:

1.- En la caracterización y cuantificación de sustancias de interés biológico que se encuentran en cantidades muy pequeñas, tales como las hormonas, enzimas, interferones, etc.

2.- En la identificación de antígenos presentes en las membranas celulares, tales como las moléculas CD3, CD4, CD8 y otras muchas. Esto ha permitido no solo la cuantificación de subpoblaciones celulares, sino también su fraccionamiento y aislamiento.

3.- Como agente terapéutico. Hasta 1994 sólo un anticuerpo monoclonal (anti-CD3(OKT3)) había sido autorizado para uso clínico. En los últimos años, la situación ha cambiado drásticamente y ahora son los anticuerpos monoclonales el 25% de los productos sometidos a estudios clínicos (Glemmie & Johnson, 2000). La mayoría de ellos se emplean en las siguientes áreas:

- a) En trasplantes de órganos, administrándose a individuos trasplantados con amenaza de rechazo agudo: anti-CD25, anti-CD147, anti- integrina β_2 .
- b) En oncología para la localización de células tumorales y/o su destrucción: anti-CD125 en el tumor de ovario, anti-HER2/neu en el tumor de mama.
- c) En el tratamiento de enfermedades autoinmunes: anti-ICAM-3 en la psoriasis, anti-TNF en la enfermedad de Crohn.
- d) En el tratamiento de enfermedades virales: anti- proteína F, anti-gp120.
- e) En el tratamiento de enfermedades circulatoria: anti- integrina β_2 en la congestión circulatoria, anti-CD18 en el infarto de miocardio.

En ésta panorámica general de la utilización de los anticuerpos monoclonales asistimos hoy a una impresionante dispersión hacia otros muchos campos, lo cual permite vislumbrar horizontes esperanzadores a partir de una técnica que en principio surgió simplemente de la pretensión de desvelar la organización y expresión génica de las inmunoglobulinas, lo que acabó constituyendo un verdadero hito en la historia de la medicina y las ciencias biológicas.

- Anticuerpos policlonales y monoclonales como herramientas en los inmunoensayos

Es amplia la presencia en la bibliografía de referencias sobre el uso de anticuerpos policlonales. En todos los casos, se usa este tipo de anticuerpos como una herramienta para el diagnóstico tanto en medicina humana como veterinaria.

Dadas las características del material a usar, el uso señalado se ha limitado al empleo de dichos anticuerpos policlonales previamente marcados. Son estas mismas características ya mencionadas las que han impedido poder aplicarlos en campos más específicos como son el estudio de las inmunoglobulinas de distintas especies animales.

Desde que en 1975 Kohler y Milstein, describieran por primera vez la producción de anticuerpos monoclonales, han sido muchos los estudios realizados sobre los mismos, dados los beneficios que supone su uso, tal y como se ha señalado anteriormente.

Los anticuerpos monoclonales han permitido ampliar el número de herramientas disponibles en los diferentes inmunoensayos, sustituyendo en muchos casos a los anticuerpos policlonales que se empleaban hasta su desarrollo.

La mayor desventaja de los anticuerpos monoclonales es que, debido a su monoespecificidad, tienen escasas propiedades de

precipitación antigénica como reactivos simples. En consecuencia, los ensayos de antígenos en solución usando reactivos monoclonales están restringidos a aquellos que dependen de la medida indirecta de la unión antígeno-anticuerpo, que es el formato de los ensayos más sensibles. Además, la producción de anticuerpos monoclonales es más complicada y costosa que la de anticuerpos policlonales, y no son la mejor elección para el desarrollo de ciertas técnicas inmunoquímicas (Tabla 7).

Tabla 7. Técnicas inmunoquímicas: Anticuerpos monoclonales *versus* anticuerpos policlonales (Harlow & Lane, 1988)

Técnica	Anticuerpos policlonales	Anticuerpos monoclonales	Conjunto de anticuerpos monoclonales
Tinción celular	Normalmente buenos	Dependiente del anticuerpo	Excelente
Inmunoprecipitación	Normalmente buenos	Dependiente del anticuerpo	Excelente
Inmunoblots	Normalmente buenos	Dependiente del anticuerpo	Excelente
Purificación por inmuoafinidad	Pobre	Dependiente del anticuerpo	Pobre
Inmunoensayos			
Anticuerpo marcado	Difícil	Buena	Excelente
Antígeno marcado	Normalmente buenos	Dependiente del anticuerpo	Excelente

En años recientes, los anticuerpos monoclonales han sido la fuente preferida de anticuerpos para buena parte de la investigación inmunológica. Son absolutamente específicos para los epítomos individuales, y puede disponerse de ellos en grandes cantidades. Debido a su pureza, actúan como reactivos químicos estandarizados. Están siendo incorporados con rapidez a las técnicas de diagnóstico clínico, en

las cuales se necesitan grandes cantidades de anticuerpos de calidad consistente.

Paulatinamente, los anticuerpos monoclonales van sustituyendo a los antiseros convencionales en base a las ventajas que su uso conlleva y en tanto que pueden producirse industrialmente.

a) Anticuerpos poli y monoclonales frente a IgE

La disponibilidad de anticuerpos monoclonales frente a las inmunoglobulinas constituye la base de los análisis bioquímicos, serológicos y funcionales de dichas inmunoglobulinas (Suter et al, 1992).

Para isotipos presentes en baja concentración, como es el caso de la IgE, solamente se puede aislar cantidades mínimas en forma pura, por lo que es difícil desarrollar estudios funcionales. Por este mismo motivo, supone gran dificultad el definir isotipos en especies silvestres y obtener suficiente Ig para realizar estudios funcionales (Suter & Fey, 1983a, b).

En lo referente al campo de las inmunoglobulinas, los estudios encontrados en la bibliografía hacen especial referencia a los anticuerpos anti-IgE. El interés en este tipo específico de inmunoglobulina puede explicarse por la elevada incidencia de los procesos alérgicos, cada vez más prevalentes conforme mayor es el desarrollo de la sociedad. Es por esto por lo que en principio, los estudios de las inmunoglobulinas se han basado en esta subclase. Dada la incidencia comentada de los procesos alérgicos, se ha visto incrementada la necesidad del desarrollo de reactivos que permitan, por un lado estudiar más a fondo dichos procesos, y por otro, el desarrollar métodos diagnósticos que faciliten su diagnóstico (Halpern, 1989). Destacan en los últimos años la producción de anticuerpos policlonales desarrollados en conejo frente a IgE canina (Halliwell et al, 1985) e IgE equina (Halliwell et al, 1993). Antes de estos, el uso de anticuerpos policlonales anti-IgE canina estaba limitado a

ciertos laboratorios comerciales y a algunos investigadores (Schwartzman et al, 1971; Halliwell et al, 1972; Peters et al, 1982; Schultz & Halliwell, 1985; Kleinberk et al, 1989). También se han descrito anticuerpos anti-IgE, pero en este caso monoclonales frente a diversas especies, incluidos humano (Chandler et al, 1983; Sánchez-Madrid et al, 1984), ratón (Baniyash & Eshhar, 1984; Hirano et al, 1988), rata (Conrad et al, 1983; Rup, 1989), vaca (Thatcher & Gershwin, 1988), oveja (Shaw et al, 1996), gato (De Boer et al, 1992) y perro (De Boer et al, 1993).

b) Anticuerpos poli y monoclonales frente a otras inmunoglobulinas

Además de los anticuerpos monoclonales anti-IgE, también se han desarrollado, aunque en menor medida, anticuerpos frente a otras inmunoglobulinas de distintas especies en las que el hombre tiene un interés económico o social.

Algunos ejemplos de estos casos serían los de la producción de anticuerpos monoclonales frente a las inmunoglobulinas de distintas especies: vaca (Srikumaran et al, 1983; Srikumaran et al, 1987; Goldsby et al, 1987; Thatcher & Gershwin, 1988; Estes et al, 1990), cerdo (Hollinshead et al, 1985; Van Zaane et al, 1987; Paul et al, 1989; Bianchi et al, 1995), caballo (McGuire et al, 1983; Suter & Fey, 1983a,b; Lunn et al, 1995, Agarwal & Holmes, 2000), oveja (Chin et al, 1986; Beh et al, 1987; Beh et al, 1998; Bird et al, 1995; Shaw et al, 1996), camello (Azwai et al, 1995), ciervo (Hibma et al, 1992), mono rhesus (Ward et al, 1995), mandril (Shearer et al, 1994), tejón (Goodger, 1994), tortuga verde (Herbs et al, 1995), pollo (Van Nerom et al, 1997) anguila europea (Van der Heijden et al, 1995), pez de colores (Siwicki et al, 1994) y trucha (Sánchez et al, 1992; Estévez et al, 1993).

En resumen, toda esta información se podría esquematizar en una tabla en la que se pretende recoger los datos existentes más significativos en relación a los anticuerpos monoclonales frente a inmunoglobulinas de distintas especies animales (Tabla 8).

Tabla 8. Anticuerpos monoclonales frente a inmunoglobulinas de distintas especies animales.

Especie	Isotipos	Autor*	Año	Comentarios
Vaca	IgG ₁ , IgG ₂ , IgM	Srikumaran	1983	Produc. y Caracteriz.
	Igs	Srikumaran	1987	Determin. concentración
	Igs	Goldsby	1987	Panel Igs y mAb
	IgE	Thatcher	1988	Produc. y Caracteriz.
	IgG ₁ , IgG _{2a} , IgG _{2b}	Estes	1990	Niveles en suero
Cerdo	Ig	Hollinshead	1985	Produc. y Caracteriz.
	Ig	Van Zaane	1987	Determin. concentración
	IgG, IgA, c. ligera	Paul	1989	Produc. y Caracteriz.
Caballo	IgM, IgG, IgA	Bianchi	1995	Determin. concentración
	IgM	McGuire	1983	Inmunodeficiencia
	IgE	Suter	1983a,b	Produc. y Caracteriz.
	IgG	Lunn	1995	Ac que reconoce linf.B
	IgM, IgG	Wagner	1995	Heterohibridomas
Oveja	IgG	Aggarwal	2000	Produc. y Caracteriz.
	IgA	Chin	1986	De lavados alveolares
	IgG ₁ , IgG ₂	Beh	1987	Produc. y Caracteriz.
	IgM, IgA, c. ligera	Beh	1998	Produc. y Caracteriz.
	Ig	Bird	1995	Expresión en cel. B
Camello	IgE	Shaw	1996	Cuantificación IgE total animales parasitados
	IgG, IgM, cadena ligera	Azwai	1995	Caracterización
Ciervo	IgG, IgM, cadena ligera	Hibma	1992	Control enfermedades animales cautividad
Mono rhesus	IgA	Ward	1995	Producción
Mandrill	IgG, cadena ligera	Sheared	1994	Caracterización
Tejón	IgG	Goodger	1994	Estudio <i>M. bovis</i>
Tortuga verde	Ig	Herbs	1995	Estudio respuesta Ac-específica
Pollo	Ig G, IgM, IgA	Van Nerom	1997	Crosreacción Ig tortuga
Anguila	Ig	Van d. Heijden	1995	Caracterización
Pez de colores	Ig	Siwicki	1994	Caracterización
Trucha	Ig	Sánchez	1992	Control salud. Estudios
		Estévez	1993	efecto medioambiental

* En la tabla figura el nombre del primer autor, pudiéndose consultar el resto (así como otros datos) en la bibliografía

En todos los casos, lo que se pretende con el desarrollo de estos anticuerpos es el disponer de unos reactivos específicos y eficaces que permitan el diagnóstico de enfermedades que afectan a la producción y desarrollo de los individuos. En la bibliografía existe gran cantidad de referencias en relación de anticuerpos mono y policlonales en el estudio de distintas enfermedades, tanto en humano como en animales domésticos y silvestres. Algunos de los ejemplos encontrados son los que se recogen a continuación: Producción de anticuerpos monoclonales anti-IgG de tejón y su uso en el estudio de individuos infectados con *Mycobacterium bovis* (Goodger et al, 1994); necesidad de un método rápido de diagnóstico (ELISA) para el control de enfermedades de ciervo en cautividad (Griffin & Buchan, 1989; Hibma & Griffin, 1992); anticuerpos policlonales en pollo para el diagnóstico de la enfermedad de Newcastle (Kuiken et al, 1998); anticuerpos anti-Ig de trucha, para la determinación de la Ig total, de interés para su uso como medida general de salud en estudios de efectos medioambientales o durante enfermedades (Sánchez et al, 1991; Sánchez et al, 1993; Estévez et al, 1994); anticuerpos monoclonales para el estudio de una respuesta anticuerpo-específica en la tortuga verde (Herbs et al, 1995); uso de anticuerpos monoclonales en ELISA para diagnóstico de la diarrea viral bovina (Juntti et al, 1987); anticuerpos monoclonales específicos de subclases de IgG humanas para el diagnóstico de la malaria (Salimonu et al, 1982); aplicación de anticuerpos policlonales anti-IgG de perro en el estudio de infecciones por *Neospora caninum* y *Toxoplasma gondii* en zorro rojo belga (Buxton et al, 1997); anticuerpo policlonal anti-IgG de vaca para el estudio mediante ELISA de infecciones por *Neospora* sp. en el ganado (Pare´ et al, 1995); uso de anticuerpos policlonales específicos de las subclases de IgG humana en el estudio de pacientes con onchocerciasis (Dafa'alla et al, 1992); uso de anticuerpos mono y policlonales anti-IgG en el estudio de la schistosomiasis humana (Jassim et al, 1987).

c) Anticuerpos poli y monoclonales anti-IgG de perro

El perro es uno de los animales usado con más frecuencia en los experimentos de trasplantes y la clasificación de las inmunoglobulinas caninas y su adecuada detección es esencial para el estudio de los procesos llevados a cabo durante el desarrollo de dichos procedimientos (Mazza et al, 1993).

Se ha demostrado que el perro desarrolla ciertos síndromes mimetizando enfermedades humanas en las cuales la respuesta inmune humoral es de interés, incluyendo la artritis reumatoide (Newton et al, 1976), lupus eritematoso sistémico (Lewis et al, 1965) y enfermedad hemolítica autoinmune (Lewis et al, 1963).

Uno de los mayores problemas encontrados para desarrollar investigaciones relacionadas con la clínica canina es la inexistencia de reactivos inmunológicos bien caracterizados específicos de los componentes principales del sistema inmune, incluyendo las inmunoglobulinas principales, sus isotipos y subisotipos.

En el caso de los anticuerpos policlonales frente a la IgG canina, son muchas las aplicaciones descritas, entre las que se encuentran las siguientes: detección de *Dirofilaria immitis* mediante inmunohistoquímica (Molina et al, 1997); determinación del índice IgG, útil para diferenciar entre enfermedades inflamatorias y no inflamatorias (Tipold et al, 1993); determinación de IgG en líquido cerebroespinal y suero en el transcurso de enfermedades neurológicas (Bichsel et al, 1984); detección de IgG en inmunohistoquímica en la forunculosis anal canina (Day, 1993). También se ha descrito la producción de anticuerpos policlonales usando otras especies distintas del conejo, como por ejemplo el caso de la cabra: usando esta especie, se han desarrollado anticuerpos policlonales para el estudio de la respuesta específica de perros frente a *Leishmania infantum* y otros parásitos (Deplazes et al, 1995).

Con respecto a los anticuerpos monoclonales anti-IgG de perro, la información encontrada en la bibliografía se reduce a lo siguiente:

- Producción de anticuerpos monoclonales específicos de IgE e IgG canina (DeBoer et al, 1993). Los anticuerpos fueron producidos mediante inmunización intraperitoneal de ratones Balb/c con fracciones ricas en IgE e IgG aisladas a partir de un conjunto de sueros de perros parasitados con *Sarcoptes scabies* y *Dirofilaria immitis*. Dichas inmunoglobulinas fueron aisladas mediante un proceso cromatográfico similar a uno descrito anteriormente (Halliwell et al, 1972). El tratamiento con ácido y calor de la IgE canina eliminó gran parte (pero no toda) de la reactividad con los anticuerpos. Algunos de los anticuerpo producidos fueron específicos de la IgE canina, mientras que otros reaccionaron además con la IgG y otros de ellos reconocieron la IgG y la IgM. Los anticuerpos monoclonales producidos se usaron para inducir reacción de analilaxis cutánea reversa en piel canina; para neutralizar la reactividad Prausnitz-Küstner en suero de perro atópico; para servir como ligando en cromatografía de inmunoafinidad; y para unirse a la IgE y otras subclases de Igs en varios ELISAs (indirecto, de competición, sandwich).

- Aislamiento de cuatro fracciones de IgG a partir de suero normal de perro (Mazza et al, 1993) mediante filtración en gel seguido de cromatografía de afinidad con proteína A y G usando un sistema de cromatografía líquida (FPLC). Las preparaciones de IgG se usaron para inmunizar intraperitonealmente a ratones Balb/c con el fin de producir anticuerpos monoclonales contra las subclases de la IgG canina. Este paso fue difícil dada la gran homología entre la secuencia de las subclases. Todos los anticuerpos producidos reaccionaron con un mínimo de dos fracciones de una manera exclusiva.

- Preparación de anticuerpos monoclonales específicos de determinantes de la IgG₂, IgG₃ e IgG₄ canina. Unos de ellos fueron específicos de la IgG₁ e IgG₃, y otros de la IgG₂ e IgG₄. La especificidad

frente a la IgG₂ resultó de un protocolo convencional de inmunización. Los anticuerpos frente a la IgG₃ fueron resultado de una inmunización con IgG₃ combinado con la supresión de la respuesta inmune de la IgG₁ mediante administración pasiva de anticuerpos anti-IgG₁. Los anticuerpos monoclonales anti-IgG₄ resultaron de la inmunización de ratones con fracciones Fab o Fc que fueron obtenidas del tratamiento de la molécula IgG₄ con papaína. La especificidad de cada anticuerpo se estableció usando un ELISA que mostró que cada clon específico reconoció un determinante en la región CH₂ de la cadena pesada de la molécula de Ig canina. A pesar de la presencia de reacciones cruzadas, estos reactivos producidos se usaron en ELISA, haciendo posible la medida de la concentración de las subclases de la IgG en perros normales y enfermos (Mazza et al, 1994). Sin embargo, estos estudios darían mejor resultado con el uso de anticuerpos específicos de una sola subclase.

Existen estudios que han definido los niveles de inmunoglobulinas en perros normales y en perros con una variedad de condiciones clínicas, como son: deficiencia selectiva de IgA, enfermedades neoplásicas, fistula perianal y desórdenes alérgicos (Madewell et al, 1980; Sorjonen et al, 1981; Felsburg et al, 1985; Killingsworth et al, 1988; Day & Penhale, 1988; Ginel et al, 1993 a, b; Peng et al, 1993). En todos estos casos, la concentración de IgG, IgA e IgM se midió mediante inmunodifusión simple radial (Mancini et al, 1965; Faley & McKelvey, 1965) usando suero policlonal producido en distintas especies.

De acuerdo con DeBoer (1993) y Mazza (1994), la disponibilidad de un panel de anticuerpos monoclonales específicos de la IgG resultaría de incalculable valor para estudios de la inmunidad humoral en enfermedades caninas; podría aplicarse en ensayos serológicos específicos y podría ayudar en el entendimiento de la respuesta inmune canina frente a la infección, alergia o autoinmunidad.

Por todo lo anterior, se considera necesario la disponibilidad de reactivos capaces de reconocer específicamente la IgG de perro con vistas a su aplicación en dos campos: Profundización en el estudio de la inmunología canina, y uso de los reactivos como herramientas para el diagnóstico de distintas enfermedades de interés en el perro.

MÉTODOS DIAGNÓSTICOS DE DISTINTAS ENFERMEDADES CANINAS

- Leishmaniosis

Los parásitos del género *Leishmania* son protozoos intracelulares que infectan los macrófagos de los mamíferos, incluido el hombre. Se estima que un tercio de la población mundial vive en áreas endémicas. En el área Mediterránea, la leishmaniosis visceral causada por *Leishmania infantum*, es una enfermedad endémica que afecta al hombre y al perro. Este parásito se transmite por medio de un mosquito del género *Phlebotomus* (Nieto et al, 1999). Se ha definido que el perro y los cánidos salvajes son unos de los principales reservorios de la enfermedad humana (Mansueto et al, 1983; Abranches et al, 1991). La prevalencia de la leishmaniosis visceral canina, representa un gran riesgo en la infección de pacientes humanos, particularmente aquellos individuos inmunodeprimidos (Badaro et al, 1986).

Dado que la leishmaniosis humana y la canina comparten síntomas similares, incluidos la fiebre, hiperganmaglobulinemia, hepatoesplenomegalia y anemia, el perro representa un modelo animal adecuado para el estudio de la enfermedad humana (Bettini & Gradoni, 1986; Peters & Killick-Kendrick, 1987). La única diferencia en cuanto a sintomatología, está en la presencia de depilación, hiperqueratosis

emaciación y aumento del tamaño de los nódulos linfáticos, típico de la leishmaniosis visceral canina (Adler, 1936). Además, el estudio de la leishmaniosis canina está justificado por si misma considerando la prevalencia de la enfermedad entre la población canina.

Los perros infectados presentan dos tipos de patrones de la enfermedad (Pinelli et al, 1994): Aquella en la que se da una evolución progresiva, y en ocasiones fatal, caracterizada por un elevado título de anticuerpos específicos anti-leishmania (perros susceptibles); y aquella en la que se observa una resistencia aparente, con escasos niveles (si es que existen algunos) de anticuerpos específicos circulantes y una respuesta linfoproliferativa (perros asintomáticos).

Se ha comprobado que los pacientes enfermos de leishmaniosis presentan un incremento en los niveles de IgG unidos a los parásitos. En el caso de la IgA y de la IgM, los valores encontrados fueron iguales a los de los controles (el Amin et al, 1986a). En el caso del perro, el análisis de los niveles de IgG en animales parasitados ha puesto de manifiesto que la IgG₂ está asociada con la infección asintomática, mientras que los anticuerpos IgG₁ están desarrollados con el desarrollo de la enfermedad (Deplazes et al, 1995).

El test diagnóstico de elección para la leishmaniosis visceral humana ha sido durante mucho tiempo la aspiración esplénica (Ho et al, 1948; Kager & Rees, 1982). En manos expertas, este test proporciona una información definitiva de la presencia de infección por *Leishmania donovani*. Sin embargo, no es frecuente encontrar expertos en la realización e interpretación de dicha prueba. El procedimiento puede llegar a ser muy dañino cuando es realizado por personal inexperto.

Otros tests que se han realizado para el diagnóstico de la leishmaniosis visceral han sido el test de gel de formol y el test de fijación del complemento. El test de gel de formol tiene la desventaja de desarrollar los resultados de manera tardía, y el ser inespecífico en

aquellas áreas donde son frecuentes otras patologías asociadas con la esplenomegalia y la hiperganmaglobulinemia. El test de fijación del complemento no es sensible, y no es operativo para los casos en los que se maneja gran número de muestras.

Todos estos resultados sugieren que el ELISA es una excelente alternativa a la aspiración esplénica para un diagnóstico fiable de la leishmaniosis visceral en humano (Ho et al, 1983).

Apoyando esta última hipótesis, se han encontrado diversos estudios que confirman el ELISA como técnica de elección para el diagnóstico de la leishmaniosis visceral en humano (Hommel et al, 1978; Edrissian et al, 1979; Bandaro et al, 1986; el Amin et al, 1986b; el Safi et al, 1989).

La habilidad de la proteína A y la proteína G para unirse a la Ig de diversas especies es una propiedad de especial interés (Lindmark et al, 1983). En aquellas enfermedades en las que existen diferentes reservorios mamíferos, se da a menudo la dificultad de desarrollar ensayos específicos y sensibles para los anticuerpos anti-leishmania, en especial en aquellos casos en los que las anti-Ig de dichas especies no están disponibles. El uso de conjugados de proteína A o de proteína G podría permitir desarrollar el ELISA con el suero de múltiples especies reservorias (Reed et al, 1990).

- Enfermedades autoinmunes: Pénfigo

Se ha descrito la presencia de enfermedades autoinmunes en perro, gato y caballo (Halliwell, 1982; Day & Penhale, 1986; Halliwell et al, 1989).

Las enfermedades atópicas se definen como una hipersensibilidad hereditaria, IgE mediada a alergenios medioambientales (Halliwell & Gorman, 1989).

El pénfigo es un grupo de enfermedades autoinmunes cutáneas ocasionadas por la producción de autoanticuerpos contra el cemento intercelular de la piel. Este grupo de enfermedades recoge a cuatro procesos (Pénfigo vulgaris, Pénfigo foliáceo, Pénfigo eritematoso y Pénfigo bullosos) bien documentados tanto en perro como en humano. El pénfigo está caracterizado por la formación de bullas (vesículas) entre la epidermis. Mediante inmunofluorescencia directa de la piel lesionada se han puesto en evidencia depósitos lineales de inmunoglobulina alrededor de las células epidérmicas dando una apariencia de panal de abeja (Pastoret et al, 1998).

El criterio generalizado aceptado para el diagnóstico de estas patologías incluye la presencia de una historia compatible y de signos clínicos, junto a la evidencia de IgE específica de los alérgenos puestos en evidencia mediante test serológicos o intradérmicos (Halliwell, 1990).

Los tests intradérmicos han sido considerados el mejor método para confirmar el diagnóstico de la atopia canina. Sin embargo, hay que indicar varias desventajas con respecto a esta técnica:

- a) Los fármacos antiinflamatorios han de ser eliminados completamente antes de realizar el test para evitar los falsos negativos.
- b) El test no se puede realizar a aquellos perros con dermatitis generalizada.
- c) Los test intradérmicos se realizan usualmente en centros dermatológicos de referencia, ya que el proceso es largo de realizar y no es rentable cuando no se realiza con frecuencia.

Los tests alérgicos *in vitro*, basados en la medida de la concentración en suero de la IgE específica de distintos alérgenos, podrían eliminar las desventajas asociadas a los tests intradérmicos. (Codner and Lessard, 1993).

Los tests *in vitro* podrían ser de utilidad en el diagnóstico de la atopia, especialmente en aquellos individuos con signos clínicos de atopia

y que dan resultados negativos en los resultados de los tests intradérmicos (Willemse et al, 1985; Kleinbeck et al, 1989). Con respecto a este tipo de ensayos, y después de diversos estudios, se han encontrado aspectos negativos que los hace no ser adecuados para el diagnóstico de la atopia canina:

a) Presencia de falsos positivos, atribuibles a componentes antigénicos crosreactivos con la IgE absorbidos a la placa de poliestireno usada para el ensayo (Longbottom, 1983).

b) Una elevada concentración en el suero de IgE total ha sido así mismo asociada a la presencia de falsos positivos a causa de uniones inespecíficas (Caprio et al, 1983; Ownby, 1988; Griffin et al, 1990).

c) El perro presenta una mayor concentración de IgE que el hombre, lo que parece que es debido a la exposición de los primeros a mayor cantidad de parásitos internos y externos (Halliwell & Kunkle, 1978).

d) Otros estudios han sugerido una relación entre los falsos positivos e infección por áscaris, o por filaria (Griffin et al, 1990; Sousa & Norton, 1990).

e) Se ha postulado que los problemas de algunos de estos ELISAs pueden estar en el uso de anticuerpos policlonales anti-IgE canina, que crosreaccionarían con anticuerpos de otras clases. Para resolver este posible problema se propuso el uso de anticuerpos monoclonales anti-IgE canina, de mayor especificidad que los policlonales (Bigler et al, 1993).

La existencia de falsos positivos en los resultados de estos tests puede conducir a diagnósticos incorrectos y a inmunoterapias inapropiadas en perros con enfermedades dérmicas distintas de la atopia (Bond et al, 1994).

Finalmente, con respecto a los tests in vitro en general, y al ELISA en particular, se ha determinado que los perros atópicos o sospechosos de atopia no pueden ser distinguidos de los perros clínicamente normales o

de los perros alérgicos a las pulgas en base a la concentración en suero de IgE específica de un determinado alérgeno mediante esta técnica (Codner & Lessard, 1993). Sin embargo, un resultado negativo en este test si podría ser útil para descartar una posible atopia en un animal enfermo. Otros estudios sobre el diagnóstico de la atopia canina mediante ELISA han determinado que la pobre especificidad y los falsos positivos obtenidos han hecho rechazar este método para el diagnóstico de dicha enfermedad (Bond et al, 1994).

**MATERIALES
Y MÉTODOS**

ANIMALES, CÉLULAS Y PROTEÍNAS

- Animales

Los ratones empleados para la generación de hibridomas y la producción de fluido ascítico fueron hembras de la cepa BALB/c, de 6 semanas de edad aproximadamente.

- Suero sanguíneo

La sangre fue obtenida de perros adultos de distintas razas. Fueron facilitados por el Hospital Clínico Veterinario de la Universidad de Córdoba; por un particular; por el Club Nacional del Podenco Andaluz y por la Asociación de Criadores del Podenco Andaluz. Ninguno estaba sometido a medicación o alimentación especial. Tampoco se apreció en ninguno de ellos signos externos de enfermedad. La sangre se obtuvo mediante punción de la vena braquial con tubos tipo Vacutainer (Becton Dickinson) de 3,15 ml con citrato sódico 0,129 M y silicona en una proporción 1-10.

- Órganos

Los órganos (bazo, timo, tonsilas, intestino y ganglio) fueron facilitados por el Departamento de Anatomía y Anatomía Patológica Comparadas de la Facultad de Veterinaria de la Universidad de Córdoba, dónde los extrajeron de perros de la sala de necropsias que no presentaban daños en dichos órganos.

- Leucocitos PBMC

La sangre extraída, fue diluida 1/2 en PBS (Apéndice, 1.1.1) y se depositó en tubos de 50 ml sobre 15-20 ml de una disolución de Ficoll-diatrizoato sódico, de densidad 1,08 g/cm³ (Apéndice 1.1.4). Se centrifugó a 3000 rpm durante 30 minutos en centrífuga Heraeus-Sepatech Megafuge 1.0 (Heraeus Instruments). Seguidamente se recogieron los leucocitos mononucleares (PBMC), que se encuentran formando un halo en la interfase entre el Ficoll y el plasma, con ayuda de una pipeta Pasteur, y se depositaron en tubos de cristal. Los leucocitos PBMC así obtenidos se lavaron 3 veces con PBS centrifugando a 1800 rpm durante 10 minutos. En aquellos casos en los que después del primer lavado se observaron eritrocitos residuales, se trataron con 2 ml de agua destilada, en agitación, durante 10-15 segundos e, inmediatamente, se añadieron 0,5 ml de solución salina (Apéndice 1.1.3), que restauró la isotonicidad, completándose el resto con PBS. Finalmente, tras centrifugar de nuevo, los leucocitos se resuspendieron en 1 ml de PBS y se contaron en cámara de Neubauer, usando solución de eosina (Apéndice 1.1.2) para determinar la viabilidad de los PBMC obtenidos

- Suspensiones celulares

Las células de los distintos órganos fueron obtenidas mediante la perfusión del bazo, ganglio, tonsilas y el timo canino, respectivamente, con medio HY (Apéndice 2.1).

- Esplenocitos de ratón

Los ratones, fueron sacrificados mediante dislocación cervical y, una vez empapados en etanol, se practicó una apertura en la región

abdominal y se le extrajo el bazo. Este fue depositado en medio HY (Apéndice 2.1) y se perfundió varias veces, inyectándole medio en el interior con el fin de liberar los esplenocitos. Posteriormente, con un émbolo de jeringa estéril, se presionó el bazo hasta disgregar el órgano. Tras retirar los restos de estroma, la suspensión celular se centrifugó a 1800 rpm durante 10 minutos. Los esplenocitos fueron lavados nuevamente en medio HY y finalmente, se resuspendieron en 1 ml de medio de cultivo suplementado (Apéndice 2.2).

- Células de mieloma

La línea de células utilizada para la fusión fue la Sp2/O-Ag14. Las células, conservadas en nitrógeno líquido, fueron descongeladas (Apéndice 3.2) 10 días antes de realizar la fusión, y cultivadas hasta alcanzar el estado de confluencia.

- Inmunoglobulina G de perro sano

Para la inmunización de los ratones se utilizó inmunoglobulina G comercial (Sigma). Dado que este reactivo fue descatalogado por la casa, se procedió a aislarla como se indica a continuación.

La inmunoglobulina G de perro (IgG) fue purificada a partir de suero de perros (Ver apartado “Animales”) siguiendo el método de purificación en columnas de proteína A, en la modalidad de baja sal, según se describe más adelante en el apartado de “Purificación de anticuerpos”. Esta inmunoglobulina purificada se utilizó en todos los experimentos en los que se describe el uso de inmunoglobulina G de perro.

- Inmunoglobulina G de perro con leishmaniosis

En este caso, el procedimiento seguido para aislar la IgG de perro con leishmaniosis fue el mismo que el utilizado para aislar la IgG de perro normal especificada en el apartado anterior.

La única variación en este caso fue el empleo de suero de perro parasitado con leishmania obtenido de una clínica veterinaria privada.

Esta IgG se utilizó para ensayos en inmunohistoquímica.

TAMPONES Y SOLUCIONES

Véase Apéndice.

PRODUCCIÓN DE HIBRIDOMAS

- Inmunización de los ratones

Los ratones fueron inmunizados intraperitonealmente con 50 µg de IgG de perro comercial (Sigma), molécula completa en tres ocasiones, en los días 0, 30 y 45. Tres días antes de la fusión se inyectó la misma cantidad vía intravenosa. En la primera de las inoculaciones, la IgG se administró homogeneizada en adyuvante completo de Freund. En el resto de las ocasiones se homogeneizó en adyuvante incompleto de Freund.

- Fusión

Los esplenocitos, procedentes del bazo del ratón inmunizado, se añadieron a las células de mieloma en tubo de centrifuga de 50 ml en una proporción de 2 esplenocitos por cada célula de mieloma. Se completó el tubo con medio HY y se centrifugaron las células a 1800 rpm durante 10 minutos. Seguidamente, se prepararon 2,5 ml de una solución 80% de polietilenglicol (PEG) 4.000 (Merck) disuelto en medio HY y calentado a 65°C, al que se añadió 0,4 ml de DMSO (Merck). Esta solución fue esterilizada por filtración y se mantuvo a 37°C hasta su uso. Un ml de esta solución fue depositado gota a gota sobre los esplenocitos y las células de mieloma, procurando que estas gotas rompieran el pellet. Seguidamente, se agitó el tubo para terminar de resuspender las células y éstas se dejaron reposar durante 2 minutos. A continuación se añadió sobre las células el medio de cultivo suplementado (Apéndice 2.2) como sigue: 2 ml durante 2 minutos, después 8 ml durante 2 minutos y, finalmente, 40 ml durante 5 minutos. Posteriormente, las células se lavaron 50 ml de medio suplementado, centrifugando a 1800 rpm, 10 minutos. Finalmente, las células fueron resuspendidas en el volumen adecuado de medio suplementado para depositar una cantidad de alrededor de 150.000-200.000 células por cada pocillo de una placa de cultivo p96 (Greiner), en un volumen de 100 µl de medio por pocillo. Al día siguiente, se añadieron 100 µl por pocillo de medio selectivo HAT (Apéndice 2.3). Una semana después, se sustituyó todo el medio por HAT.

- ELISA indirecto (Procedimiento General)

Mediante este procedimiento, se detectaron los clones positivos frente a la IgG de perro usada como inmunógeno, rechazándose los que resultaron negativos.

Los pasos señalados a continuación son los que se usaron en el resto de los ELISAs, a no ser que se especifique alguna variación.

En una placa microtest p96 (Greiner) se añadieron 7 µg por pocillo de IgG de perro (Sigma) o IgG purificada con proteína A diluido en tampón carbonato (Apéndice 1.3.1) y se dejó incubar durante toda la noche a 4°C. Tras este tiempo, se procedió a lavar la placa tres veces con 100 µl por pocillo de PBS (Apéndice 1.1.1).

Tras bloquear los sitios de unión de la placa con albúmina sérica bovina (BSA) (Boehringer Mannheim) (Apéndice 1.1.5) durante 1 hora a temperatura ambiente (TA), se retiró el líquido de los pocillos y éstos fueron lavados tres veces con PBS. Se añadieron 100 µl por pocillo de sobrenadante de los hibridomas, o PBS como control negativo, y se dejaron incubar durante al menos una hora a TA. Como control positivo se empleó el suero diluido de la sangre de ratón inmunizado. Tras lavar tres veces con PBST, se añadieron 50 µl por pocillo de una solución 1/300 de anticuerpo anti-inmunoglobulina de ratón, conjugado con peroxidasa (Sigma) en PBS y se mantuvo a TA de 45 minutos a 1 hora.

Tras efectuar otros tres lavados con PBST, se añadieron 100 µl por pocillo de una solución reveladora de ELISA (Apéndice 1.3.2). Transcurridos 5-15 minutos, se evaluó la reacción positiva por la aparición de color verde. La reacción se detuvo añadiendo 100 µl por pocillo de NaF 0,5M (Panreac) en PBS.

En todos los casos, se han considerado como positivos aquellos valores de absorbancias (a 405 nm) como mínimo doble del control negativo. La medida de la absorbancia se realizó con un lector de placas de ELISA (Microplate Reader. Model 550. BIO-RAD).

- Clonaje de los hibridomas

Mediante la clonación de los hibridomas se pretende asegurar que el clon elegido proceda de una sola célula positiva frente al inmunógeno empleado. La clonación de los hibridomas seleccionados se efectuó por el método de la dilución límite. Para ello se contaron las células de una suspensión de hibridomas en cámara de Neubauer y se efectuaron las diluciones necesarias para alcanzar una concentración celular aproximada de 3 millones de células por ml. De esta suspensión se tomaron 5 μ l y se llevaron a 1 ml de medio completo. De esta última se tomaron 10 μ l y se diluyeron en 10 ml de medio completo que se distribuyeron en una placa de cultivo p96 depositando 100 μ l por pocillo (aproximadamente 1 célula por pocillo). Los hibridomas fueron reclonados posteriormente para asegurar su estabilidad y monoclonalidad.

- Detección del isotipo de inmunoglobulina

La determinación del isotipo es fundamental a la hora de la elección del método de purificación de los anticuerpos.

20 μ l de una solución 1/100 (0,5 μ g/pocillo) de los anticuerpos anti-diferentes isotipos murinos (Sigma) se depositaron en los pocillos de una placa microtest (Greiner) y se dejaron toda la noche a 4°C. Tras 24 horas, se añadieron 200 μ l por pocillo de solución de bloqueo (Apéndice 1.1.5) y se dejó incubar a temperatura ambiente (TA) durante, al menos, 1 hora. Tras efectuar tres lavados con PBS, se añadieron 100 μ l por pocillo de sobrenadante de los hibridomas, o PBS como control negativo, por cada anticuerpo anti-isotipo. Después de incubar la placa 1 hora a TA, los pocillos se lavaron dos veces con PBST. Se añadieron entonces 50 μ l de anti-inmunoglobulina de ratón conjugada con peroxidasa (Sigma)

diluidos 1/300 en PBS y la reacción fue revelada por el mismo procedimiento empleado para el ELISA indirecto.

PRODUCCION DE ASCITES

Previo a la purificación de los anticuerpos, se procedió a la producción de ascites de cada uno de ellos, pretendiendo así obtener una mayor concentración de inmunoglobulina.

Se emplearon ratones Balb/c a los que se les inyectó 0,5 ml de pristano (Sigma) intraperitoneal. De 10 a 14 días después, se le inyectó por la misma vía a cada ratón de 10^6 a 10^7 células de hibridoma de cada clon. Unos 10-14 días después, se procedió al sacrificio de los ratones mediante dislocación cervical y se obtuvo la totalidad del fluido ascítico. Una vez obtenido el ascites, se procedió a centrifugarlo a 12.000 rpm durante 5 minutos con el fin de retirar los restos celulares y se conservó a -20°C hasta su purificación.

Este y todos los procedimientos llevados a cabo con ratones a lo largo de este trabajo, se realizaron de acuerdo con la normativa europea de manejo de animales de experimentación, siendo los animales tratados en todo momento por personal cualificado y autorizado para este fin.

PURIFICACIÓN DE LOS ANTICUERPOS

Mediante este proceso, se eliminaron todos los componentes del ascites distintos a los buscados (anti-IgG de perro), consiguiéndose en todos los casos, y tal y como se demostró mediante electroforesis en mini-geles (Apéndice 3.4), una eficacia de un 90-95%.

- Purificación de anticuerpos en columnas de proteína A (Baja sal)

Mediante este método únicamente se pueden purificar aquellos anticuerpos con gran afinidad por la proteína A. Entre ellos se incluye los anticuerpos policlonales de humano, caballo, vaca, burro, conejo, ratón, perro, cerdo y guinea pigs. Los anticuerpos monoclonales de ratón de los isotipos IgG_{2a} e IgG_{2b} se unen bien a la proteína A, los del isotipo IgG₃ tienen baja afinidad y los de IgG₁ muy baja afinidad.

En este caso, se procedió a purificar por este método los anticuerpos de gran afinidad por la proteína A (isotipo IgG_{2b} e IgG canina a partir de suero de perro), siguiendo el siguiente método:

Se ajustó el pH de la preparación de anticuerpo (suero o ascites) a 8.0 añadiendo 1/10 de volumen de Tris 1.0 M (pH 8.0) y se pasó esta solución a través de una columna de proteína A. A continuación se lavó la columna con 10 volúmenes de Tris 100 mM (pH 8.0) y con 10 volúmenes de Tris 10 mM (pH 8.0). Se eluyó la columna con glicina 100 mM (pH 3.0) y se recogieron 15 fracciones de un volumen aproximado de 1 ml, a las que se les ajustó el pH, próximo a la neutralidad, con dos gotas de Tris 1 M (pH 8.0). Finalmente, se identificaron las fracciones que contenían proteína en un espectrofotómetro (SmartSpec™ 300. BIO-RAD) a una longitud de onda de 280 nm. Para terminar, se lavó la columna con 10 volúmenes de glicina 100 mM (pH 3.0) y 10 volúmenes de PBS.

- Purificación de anticuerpos en columnas de proteína A (Alta sal)

Este procedimiento se siguió para purificar los anticuerpos de baja afinidad por la proteína A, como es el caso de los de isotipo IgG₁. El fundamento de la técnica es el mismo que en el caso anterior (Baja sal), pero en este, se consigue incrementar considerablemente la eficacia de la

purificación ajustando los pH y las concentraciones de sales de las soluciones usadas.

Se partió de ascites de cada uno de los anticuerpos y se añadió NaCl hasta conseguir una concentración final de 3.3 M. Se añadió 1/10 de volumen de borato sódico 1.0 M (pH 8.9), para ajustar el pH a este valor. Se pasó la disolución de ascites a través de la columna de proteína A y a continuación se lavó con 10 volúmenes de NaCl 3.0 M, borato sódico 50 mM (pH 8.9) y 10 volúmenes de NaCl 3.0 M, borato sódico 10 mM (pH 8.9). La columna se eluyó con glicina 100 mM (pH 3.0) y se recogieron 15 fracciones de un volumen aproximado de 1 ml, a las que se les ajustó el pH a la neutralidad con dos gotas de Tris 1 M (pH 8.0). Finalmente, se identificaron las fracciones que contenían proteína leyéndolas a una longitud de onda de 280 nm. Para terminar, se lavó la columna con 10 volúmenes de glicina 100 mM (pH 3.0) y 10 volúmenes de PBS.

Una vez purificados los anticuerpos se cuantificó la proteína mediante un kit de Bio-Rad (Apéndice 3.5) siguiendo las instrucciones del fabricante y usando como patrón para la recta de calibrado una IgG aportada por el mismo.

- Electroforesis en mini-geles

Mediante esta técnica se comprobó la pureza de los anticuerpos purificados.

Para la preparación de la muestra, se tomó 10 µl del anticuerpo purificado y se le añadió 30 µl de tampón de tratamiento de muestras (Apéndice 1.6.8), con 2-mercaptoetanol. Los 40 µl por muestra se cargaron en el gel junto con 10 µl de los patrones de pesos moleculares (Sigma).

La electroforesis se realizó en geles de poliacrilamida de 10% (Apéndice 3.4) de 1,5 mm de grosor. Una vez colocado el mini-gel en el soporte de electroforesis (Mighty Small II, SE 250, Hoffer Scientific

Instrument), se cargaron las muestras y se recubrieron con tampón puente (Apéndice 1.6.6) y fue conectado a un amperaje de 20 mA por gel. La electroforesis se realizó en un tiempo de 2 horas.

Una vez finalizada la electroforesis, se retiró el gel del soporte y se introdujo en colorante azul Commassie (Apéndice 1.7.1) donde se mantuvo un mínimo de 6 horas. Transcurrido este tiempo, el gel se decoloró con una solución de desteñir geles (Apéndice 1.7.2) y finalmente, fue lavada con agua destilada y se dejó secar entre láminas de film transparente.

MARCAJE DE LOS ANTICUERPOS CON BIOTINA

Este es un paso imprescindible para obtener los anticuerpos marcados necesarios para el desarrollo de los ELISA sandwich y ELISA de competición (ver más adelante). Así mismo, se comprobó su uso en ELISA directo (ver apartado “ELISA directo”).

Para llevar a cabo el marcaje de los anticuerpos con Sulfo-NSH-biotina (Pierce), se partió de una cantidad inicial mínima de 0,5 mg/ml de anticuerpo.

La cantidad de anticuerpo a marcar se llevó a un volumen de 1 ml y se le ajustó el pH a 8,5 con una solución de bicarbonato sódico 50 mM.

A continuación, se añadió una cantidad de 0,32 mg de sulfobiotina por cada 20 mg de anticuerpo y se incubó en oscuridad durante 30 minutos a temperatura ambiente o 2 horas a 4°C.

Los restos de sulfobiotina se eliminaron realizando lavados con tampón fosfato 0,1M pH 7.0. Los lavados se realizaron utilizando concentradores de centrifuga Macrosep™ (Pall Filtron) y realizando cuatro lavados de 1 hora cada uno a 3000 rpm.

Se obtuvo un volumen final de 0,5 ml y se mantuvo a -20°C hasta el momento de su uso.

ELISA DIRECTO: USO DE LOS ANTICUERPOS BIOTINADOS

Una vez marcados los anticuerpos, se probó su uso en ELISA directo con el objetivo de eliminar el paso de la incubación con el anticuerpo secundario anti-ratón biotinado.

El proceso realizado fue siguiendo las condiciones especificadas anteriormente en el apartado “ELISA indirecto: Procedimiento General”.

En resumen, el procedimiento seguido fue:

- Incubación de la placa con la IgG de perro purificada.
- Bloqueo con BSA.
- Incubación con el anticuerpo anti-IgG de perro biotinado.
- Incubación con un conjugado de estreptavidina-peroxidasa.
- Revelado.

CARACTERIZACION BIOQUIMICA DE LOS ANTICUERPOS

- Immunoblotting

Mediante este procedimiento se obtuvo la especificidad de cada uno de los anticuerpos producidos hacia las cadenas de la IgG canina.

Para la preparación de la muestra, se tomó 2 μl de suero de perro en condiciones fisiológicas o 5 μl (10 μg) de IgG de perro. Se completó el volumen hasta 10 μl con PBS. A continuación, se añadió igual volumen que el anterior de tampón de tratamiento de muestras (Apéndice 1.6.8),

con 2-mercaptoetanol. Los 20 μ l por muestra se cargaron en el gel paralelamente con 10 μ l de los patrones de pesos moleculares (Sigma).

La electroforesis se realizó en geles de poliacrilamida de 5-15% (Apéndice 3.3) de 1,5 mm de grosor. Una vez cargadas las muestras, el gel se sumergió en el tanque de electroforesis con tampón puente (Apéndice 1.6.6) y fue conectado a un amperaje de 10-35 mA por gel.

Una vez transcurrida la electroforesis, el gel fue incubado en tampón de transferencia (Apéndice 1.6.9), durante 20 minutos, en agitación suave y a temperatura ambiente. Por otro lado, también fue incubada una membrana de PVDF, Inmobilon P (Millipore), del mismo tamaño, previamente activada con metanol durante unos segundos, y posteriormente se incubó en tampón de transferencia durante 20 minutos. La transferencia se realizó en el dispositivo Modelo Semi-dry (Millipore). El gel fue colocado sobre la membrana de PVDF y entre 4 trozos de papel Whatman 3MM (Whatman), por encima y por debajo de ellos, también previamente sumergidos en tampón de transferencia. Se hizo rodar una varilla de vidrio por encima para eliminar las burbujas que pudieran existir y el aparato fue conectado a la fuente de alimentación a un amperaje de 2,5 multiplicado por la superficie de la membrana en cm^2 , durante 50 minutos.

Una vez finalizada la transferencia, se cortó la tira de membrana de Immobilon™-P (Millipore) correspondiente a los patrones de pesos moleculares, y seis tiras más, correspondientes a cada uno de los anticuerpos. La tira de pesos moleculares fue contrastada con una solución de Negro amido en PBS (Apéndice 1.6.7), durante 5-10 minutos en agitación suave y a temperatura ambiente. Transcurrido este tiempo, la membrana fue desteñida con una solución de desteñir geles (Apéndice 1.7.2) y finalmente, fue lavada con agua destilada y se dejó secar.

El resto de las tiras, una vez recortadas y marcadas, fueron incubadas con solución de bloqueo (Apéndice 1.1.5) durante 1 hora, a

temperatura ambiente y en agitación suave. Posteriormente, se lavaron tres veces con PBST en agitación suave durante 10 minutos cada vez.

Las tiras se introdujeron entonces en tubos de ensayo, junto con 4 ml por tubo de sobrenadante de los hibridomas, o PBS como control negativo. Fueron incubadas en agitación suave a 4°C durante toda la noche, o a temperatura ambiente durante tres hora. A continuación, se lavaron las tiras con PBST tres veces y se le añadieron 3 ml por tubo de anticuerpo anti-IgG conjugado con peroxidasa (Sigma), diluido en PBS según las condiciones del fabricante. Tras la incubación en agitación suave y durante una hora a temperatura ambiente, se efectuaron otros tres lavados con PBST y finalmente, las tiras fueron reveladas por el método del cloronaftol, mezclando las dos soluciones sustrato de peroxidasa (Apéndice 1.2.1). Se mantuvieron en esta solución, en agitación suave, hasta la aparición de bandas de color azul oscuro en las tiras. La reacción se detuvo sumergiendo éstas rápidamente en agua destilada. Las tiras fueron secadas y fotografiadas junto con los patrones de pesos moleculares.

En otros casos, se empleó el sistema de detección del luminol, con las soluciones comerciales de ECL™ (Amersham) siguiendo las indicaciones del fabricante. Brevemente, las tiras fueron incubadas con igual volumen de las soluciones comerciales durante 1 minuto aproximadamente. Las tiras se secaron y se envolvieron en plástico transparente sobre el que se colocó una película radiográfica (Kodak) durante varios tiempos de exposición, de algunos segundos a varios minutos.

- Obtención de fragmentos Fab de la IgG canina

Mediante este ensayo se probó la reactividad de los anticuerpos anti-IgG de perro frente a los fragmentos Fab de dicha inmunoglobulina.

En primer lugar, y como paso inicial del experimento, se procedió a la obtención de los fragmentos Fab de la inmunoglobulina siguiendo los siguientes pasos:

Se partió de un volumen de IgG (100 μ l) de concentración conocida (7,4 mg/ml). A dicha IgG se le añadió las siguientes soluciones (Apéndice 1.4): Tampón fosfato 10X 1:10/V:V; Cisteína (Sigma) 1:20/V:V; EDTA (Merck) 1:20/V:V; Papaína (Roche) 1:100/P:P. Se mezcló bien pero con cuidado para evitar la desnaturalización de la proteína. Se incubó durante toda la noche en baño a 37°C. Pasado este tiempo se añadió I-acetamida (Sigma) 1:20/V:V para finalizar la reacción y se mantuvo durante 30 minutos a temperatura ambiente hasta completar la alquilación. A continuación se añadió proteína A y se mantuvo dos horas a temperatura ambiente agitando suavemente de vez en cuando. Finalmente se centrifugó a 1200 rpm durante 2 minutos y se recogió el sobrenadante que contenía las cadenas Fab desechando las cadenas Fc retiradas por la proteína A.

La eficacia del proceso se comprobó por medio de un gel de poliacrilamida.

Tras la obtención de los fragmentos Fab se utilizó para tapizar una placa de ELISA a razón de 1 μ g/pocillo. El procedimiento empleado en este caso fue el indicado en el apartado de ELISA indirecto.

- Tratamiento de la IgG de perro con ácido y con calor

Mediante esta prueba y la siguiente se determinó la sensibilidad de los epítomos reconocidos por los anticuerpos a diversos tratamientos.

Esta prueba se realizó siguiendo los pasos especificados en el apartado donde se describe la realización del ELISA indirecto. La única modificación realizada se encuentra a la hora del antígeno de la placa. En este caso, se utiliza como antígeno la IgG de perro, pero sometida a un

tratamiento con ácido o calor previo al antígeno de la placa. El tratamiento con calor se realizó tratando la IgG a 56°C durante 4 horas, y el tratamiento con ácido diluyendo la IgG en tampón Glicina (ICN Biochemicals, Inc.) 0,1 M pH 2.3 durante 4 horas.

- Tratamiento de la IgG de perro con m-peryodato sodico

En este caso se utilizó el procedimiento general del ELISA indirecto con la siguiente modificación:

Se tapizó la placa con la IgG de perro durante toda la noche a 4°C. Pasado este tiempo, se realizaron tres lavados con acetato sódico (Merck) 50 mM pH 4.5. A continuación, se añadió 100 µl por pocillo de m-peryodato sódico (Sigma) 20 mM en tampón acetato y se incubó durante 1 hora en oscuridad a temperatura ambiente. Después de tres nuevos lavados con tampón acetato, se incubó la placa durante 30 minutos con Glicina (INC Biomedicals, Inc.) 1% en PBS y se continuó el ELISA como se especificó anteriormente, obviando el paso del antígeno de la placa.

CITOMETRIA DE FLUJO

En unos tubos de cristal de 5 ml se repartieron 100 µl por tubo de una suspensión celular de 10^6 - 10^7 células/ml. Se añadió igual volumen por tubo de sobrenadante de hibridoma, o PBS como control negativo, y se dejaron incubar durante 30 minutos a 4°C. Transcurrido este tiempo, se añadieron 100 µl por pocillo de solución de lavado FCM (Apéndice 1.5.1). Los tubos fueron centrifugados a 1800 rpm durante 10 minutos, y se realizaron dos lavados más. Posteriormente, las células fueron resuspendidas en 50 µl de una solución 1/500 de anticuerpo anti-inmunoglobulina de ratón conjugado con FITC (Sigma) en PBS y se

volvieron a incubar a 4°C durante 30 minutos en oscuridad. De nuevo, tras efectuar tres lavados como anteriormente, las células fueron resuspendidas en solución fijadora FCM (Apéndice 1.5.2). Finalmente, el contenido de los pocillos se pasó a un tubo de 5 ml (Falcon[®], Becton Dickinson) y se completó con esta solución hasta un volumen de 0,5-1 ml. La muestra fue analizada inmediatamente o fue conservada a 4°C y en oscuridad durante varios días.

La adquisición de muestras se efectuó en un citómetro de flujo FACsort[®] (Becton Dickinson) equipado con el software CellQuest[®] v 1.2. Se adquirieron 10.000 eventos en 256 canales de resolución. El análisis de los datos recogidos fue realizado con el programa CellQuest[®].

REACCIÓN CRUZADA CON DISTINTAS ESPECIES

Mediante esta prueba, se comprobó el grado de conservación entre especies del epítipo reconocido por los anticuerpos.

Esta prueba se realizó siguiendo los pasos especificados en el apartado donde se describe la realización del ELISA indirecto. La única modificación realizada se encuentra a la hora del antigenado de la placa. En este caso, se utiliza como antígeno para tapizar la placa el suero de distintas especies (caballo, cabra, cerdo, conejo, gato, hámster, humano, oveja, rata, ratón y vaca) a una dilución 1/50.

REACTIVIDAD FRENTE A UN PANEL DE Igs CANINAS

Los anticuerpos obtenidos frente a la IgG canina fueron testados con un panel (Bethyl laboratories) que contenía las siguientes inmunoglobulinas caninas: IgG₁, IgG₂, IgA e IgM.

El proceso se llevó a cabo mediante ELISA indirecto, según el método estándar descrito anteriormente. La placa se tapizó con 0,5 µg por pocillo de cada una de las Igs.

ELISA DE COMPETICIÓN: ENSAYOS DE INHIBICIÓN

Los ensayos de competición fueron desarrollados para determinar si los anticuerpos reconocen epítomos distintos de la IgG canina.

Se usó la IgG canina para antigenar las placas (0,7 µg/pocillo) bloqueándose al día siguiente con BSA al 2%. A continuación, se añadió diluciones dobles del anticuerpo sin marcar partiendo de una concentración de 25 µg y llegando hasta 20 ng aproximadamente manteniendo en cada pocillo un volumen de 100 µl. Seguidamente, se añadieron entre 100-200 ng/pocillo del anticuerpo marcado en un volumen de 10 µl por pocillo. Se dejó incubar durante 1'30 horas a temperatura ambiente. Pasado este tiempo se lavó tres veces con PBST y se incubó con una solución de Streptavidina-Peroxidasa (Amersham) 1/500 en PBS durante 45 minutos- 1 hora. Finalmente, se realizaron tres lavados con PBST y se procedió a revelar como se indica en el apartado del ELISA indirecto.

En uno de los pocillos se puso solamente el anticuerpo marcado, y no el anticuerpo sin marcar. De esta manera, una vez revelada la placa, se pudieron obtener los porcentajes de inhibición aplicando la siguiente fórmula:

$$\%I = [(A-B)/A] \times 100$$

Siendo A el valor de absorbancia del pocillo que contiene únicamente el anticuerpo marcado, y B la absorbancia de cada pocillo. A cada uno de los

valores previamente se le restó el valor obtenido en el control negativo (se consigue añadiendo PBS en lugar del anticuerpo marcado).

ELISA SANDWICH

Este experimento condujo a la estandarización de un procedimiento con la finalidad de cuantificar la IgG canina presente en el suero de perro a partir de la recta de calibrado obtenida con distintas concentraciones conocidas de IgG purificada.

- Procedimiento

Se tapizó la placa de ELISA con el anticuerpo sin marcar (500 ng/pocillo) y se incubó durante toda la noche a 4°C. Al día siguiente se lavó tres veces con PBST y se bloqueó con BSA al 2%. A continuación se añadió el antígeno a distintas diluciones: IgG purificada a partir de 25 µg y suero de perro a partir de una dilución 1/50. Tras una incubación de 1 hora a temperatura ambiente, se añadió el anticuerpo biotinado (200 ng/pocillo) y se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente. Tras tres lavados con PBST se incubó con una solución de Streptavidina-Peroxidasa (Amersham) 1/500 en PBS durante 45 minutos- 1 hora. Finalmente, se realizaron tres lavados con PBST y se procedió al revelado y lectura de los resultados como se indica en el apartado del ELISA indirecto.

- Elaboración de la recta de calibrado

A partir de los valores de absorbancia obtenidos con la IgG purificada, se elaboró una recta de calibrado. Para la construcción de

dicha recta, se enfrentaron dos conjuntos de valores: por un lado, las concentraciones de IgG purificada utilizada en el ELISA (25, 12.5, 6.25, 3.125, 1.56 μ g), y por otro, las absorbancias (a 405 nm) obtenidas de cada una de las concentraciones indicadas anteriormente. Enfrentando cada par de valores (concentración, absorbancia), se pudo construir la recta de calibrado, elemento clave para la realización de este estudio.

Una vez representada la recta de calibrado estándar, se pudo determinar la concentración de la IgG contenida en el suero de perro interpolando los valores de absorbancia obtenidos en la realización del ELISA sandwich.

- Optimización del ensayo

Los valores de anticuerpos usados (500 ng/200 ng) para la determinación de IgG a partir de suero de perro se estandarizaron por medio de pruebas con diversas concentraciones de los anticuerpos. Del anticuerpo sin marcar se probó con 2 μ g, 1 μ g, 500 ng y 250 ng mientras que del anticuerpo marcado se usaron 200, 100, 50 y 25 ng.

Para esta estandarización, se fijó en primer lugar una cantidad intermedia del anticuerpo marcado y se probaron las distintas concentraciones del anticuerpo sin marcar. Una vez determinado el mejor valor del anticuerpo sin marcar (500 ng), se procedió a variar las concentraciones del anticuerpo marcado manteniendo constante la concentración fijada para el anticuerpo sin marcar.

- Exactitud del ensayo

Con el fin de analizar la exactitud del ensayo (conformidad de los resultados obtenidos con los valores teóricos) se ha comparado los niveles de Ig determinados en el ensayo con los aportados por el fabricante del

suero comercial estándar (Bethyl Laboratories). Para ello, se procedió a calcular una media de los resultados obtenidos en ocho de los ELISAs sandwich realizados con la pareja seleccionada y compararlos con los valores correspondientes de concentración especificados por el fabricante.

- Precisión del ensayo

Para determinar la precisión del ensayo (término indicador del grado de dispersión de los resultados), se ha calculado los coeficientes de variación (CV) intraensayo e interensayo. Para ello, se procedió a repetir el ELISA varias veces en placas distintas (variabilidad interensayo) y en la misma placa varias veces (variabilidad intraensayo).

INMUNOHISTOQUIMICA

- Reactividad de los anticuerpos monoclonales anti-IgG canina con cortes de órganos linfoides de perro en estado fisiológico

Tras un examen del estado general del animal, se procedió a la recogida de ganglios linfáticos, intestino (Placas de Peyer), bazo, timo, tonsilas y médula ósea. Se trocearon los órganos en piezas de aproximadamente 1 cm de grosor que fueron fijados en formaldehído tamponado al 10% (Merck), durante 18 horas. Posteriormente, las muestras fueron procesadas de forma rutinaria en un procesador automático Shandon Hypercentra XP, e incluidas en parafina donde se conservaron hasta su uso.

Las muestras fueron seccionadas en un microtomo Reicher-Jung, modelo 1130 Biocut, en cortes de 5 μm de grosor y, posteriormente, fueron desparafinados mediante tres baños, de 10 minutos cada uno, en

xilol (Panreac) y dos baños en etanol absoluto (Panreac), de 10 minutos cada uno. La inhibición de la actividad peroxidasa endógena se realizó mediante la incubación de los cortes con peróxido de hidrógeno (Merck) al 3% en metanol durante 30 minutos, en agitación suave y a temperatura ambiente.

La hidratación de los cortes se realizó mediante incubaciones sucesivas, de 5 minutos cada una, en etanol de 96°, y de 70° y, por último, agua destilada. Tras lavar los cortes en PBS (tres veces, 5 minutos cada una), los cortes fueron incubados en suero normal de cabra (Vector Laboratories), diluido al 10% en PBS, durante 30 minutos a temperatura ambiente. Seguidamente, se añadieron los sobrenadantes de los distintos anticuerpos (y PBS como control negativo) y se mantuvieron en incubación en cámara húmeda durante 18 horas a 4°C. Pasado este tiempo, se dejaron los cortes atemperar durante 1 hora, tiempo tras el cual se realizaron tres lavados de 5 minutos cada uno con PBS. Se añadió a continuación una antiinmunoglobulina de ratón, desarrollada en cabra, y conjugada con biotina (Dako) diluida 1/50 en PBS, y se incubó durante 30 minutos a temperatura ambiente. Tras lavar de nuevo tres veces con PBS, los cortes fueron incubados con complejo ABC (avidina-biotina peroxidasa) (Sigma) diluido 1/50 en PBS durante 1 hora a temperatura ambiente y en oscuridad.

Finalmente, los cortes se lavaron tres veces con PBS, y se incubaron durante 1 minuto con el cromógeno 3, 3'-diaminobenzidina tetrahidrocloruro (Sigma) diluido al 0,035% en PBS. Los cortes se lavaron en agua corriente durante 10 minutos y fueron contrastados con hematoxilina de Mayer durante 1 minuto. Tras un lavado de 5 minutos en agua para eliminar los restos de colorante, se procedió a deshidratar los cortes para su conservación como sigue: Se sumergieron unos segundos en alcohol de 70° y de 96°, 2 incubaciones cada una de 1 minuto en etanol absoluto y otras dos de 1 minuto en xilol. Finalmente, los cortes

histológicos se montaron con Eukitt y fueron fotografiados en un fotomicroscopio Zeiss, modelo Axyophot.

- Reactividad de los anticuerpos monoclonales anti-IgG canina con cortes de bazo de perro con leishmaniosis

Para llevar a cabo esta prueba se utilizó la misma técnica especificada en el caso anterior. La diferencia en este caso fue el uso de cortes de bazo de perro parasitado con leishmania.

Como única modificación del protocolo general, se realizó un paso adicional en el proceso de hidratación de los cortes, añadiendo después del lavado en agua pronasa al 0.2% durante 10 minutos.

Se emplearon en el experimento los siguientes tipos de muestras:

a) Corte de bazo de perro con leishmania

Anticuerpo primario anti-leishmania control positivo (Cedido por el departamento de Medicina y Cirugía Animal de la Universidad de Córdoba).

Anticuerpo secundario anti-IgG canina biotinado control positivo (Sigma).

b) Corte de bazo de perro con leishmania

Anticuerpo primario anti-leishmania control positivo.

Anticuerpo secundario anti-IgG canina problema(**CA3H1**).

Anticuerpo terciario anti-IgG murino biotinado (Dako).

c) Corte de bazo de perro con leishmania

Anticuerpo primario anti-leishmania problema.

Anticuerpo secundario anti-IgG canina problema (**CA3H1**).

Anticuerpo terciario anti-IgG murino biotinado.

d) Corte de bazo de perro con leishmania

PBS control negativo.

Anticuerpo secundario anti-IgG canina problema (**CA3H1**).

Anticuerpo terciario anti-IgG murino biotinado.

Con la muestra a) se establece un control positivo, ya que la efectividad de todos los elementos empleados ha sido previamente testada. En la muestra b) se cambia el anticuerpo anti-IgG biotinado comercial por el **CA3H1**, y por un secundario de ratón marcado con biotina, para comprobar la posibilidad de uso del anticuerpo en este tipo de ensayo. La muestra c) varía con respecto a la anterior en la introducción de la IgG aislada a partir de suero de perro de leishmania (ver “Inmunoglobulina G de perro con leishmaniosis”), pretendiéndose con este paso el comprobar su especificidad frente a este tipo de tejidos. Por último, en la muestra d) se sustituyó el anticuerpo anti-leishmania por PBS como control negativo, para comprobar si hay reacción de los anticuerpos secundarios con otras estructuras tisulares.

- Reactividad de los anticuerpos monoclonales anti-IgG canina con cortes de piel de perro con enfermedades autoinmunes (pénfigo)

Por medio de esta prueba se comprobó la utilidad del anticuerpo monoclonal **CA4E7** en el diagnóstico de enfermedades autoinmunes, comparándolo con un anticuerpo policlonal (ICN) usado normalmente

Para llevar a cabo esta prueba se utilizó la misma técnica especificada en el primer punto de este apartado. La diferencia en este caso fue el uso de cortes de piel de perro afectado por enfermedades autoinmunes (pénfigo).

Como única modificación del protocolo general, se realizó un paso adicional en el proceso de hidratación de los cortes, añadiendo después del lavado en agua pronasa al 0.2% durante 10 minutos.

En este caso, frente al anticuerpo policlonal (ICN) usado normalmente en este tipo de pruebas, se testó el **CA4E7**, y PBS como control negativo.

RESULTADOS

PURIFICACIÓN DE LA INMUNOGLOBULINA G (IgG) CANINA

Mediante la purificación del suero de perro utilizando cromatografía de afinidad en columna de proteína A, se ha conseguido aislar la IgG de perro. La concentración de la proteína obtenida, determinada mediante recta de calibrado con un kit de Bio-Rad, fue de 7,4 mg por cada ml de suero obtenido a partir de perro sano. En el caso de la IgG aislada a partir de suero de perro con leishmania, la concentración obtenida a partir de 1 ml de suero fue de 7,8 mg, determinada igualmente mediante recta de calibrado. Teniendo en cuenta que las concentraciones de IgG en suero de perro varían entre 9 y 15 mg/ml, se puede afirmar que la fracción de IgG retenida por la proteína A es superior al 50%.

La pureza de la inmunoglobulina se determinó mediante un gel de acrilamida (SDS-PAGE), donde se pudo comprobar que la proteína purificada estaba formada por dos cadenas: la ligera y la pesada, de pesos moleculares aproximados de 25 kDa y 50 kDa respectivamente. Esta distribución coincide con la definida para las IgGs, por lo que se pudo confirmar que la proteína purificada era la IgG de perro. En este mismo gel se comprobó la presencia en un porcentaje de

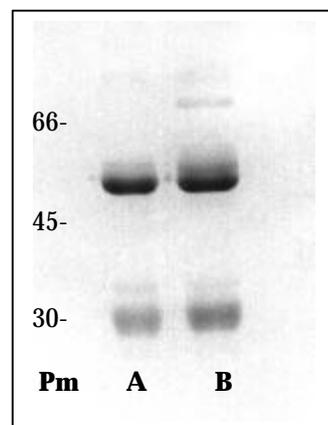


Figura.1. Electroforesis en gel SDS-PAGE de la IgG de perro comercial (A) y de la purificada (B). Los valores estándares de los pesos moleculares se indican a la izquierda

un 5-10% de otra banda de peso molecular aproximado de 70kDa distinta de la cadena de la IgG. Dicha banda no se consiguió retirar en el proceso de la purificación, y se atribuyó, dadas sus características a la cadena pesada de la IgM. Para comprobar este último dato se repitió otro gel, pero en esta ocasión en condiciones reductoras y no reductoras (resultados no mostrados). Una vez realizado el gel se pudo comprobar que, en condiciones no reductoras no aparecía la banda de 70 kDa, por lo que se descartó la hipótesis de que pudiera ser albúmina (en este caso hubiera permanecido en el gel). Ya que únicamente en este gel apareció una banda de peso molecular aproximado de 150 kDa (correspondiente a la IgG sin reducir), y no apareció ninguna banda más se pudo concluir que la banda de 70 kDa correspondía a la IgM. La IgM sin reducir presenta un peso molecular aproximado de 900 kDa por lo que, al no entrar en el gel no pudo apreciarse.

Comparando la IgG purificada con una comercial (Sigma), se comprobó que ambas proteínas se distribuían según un patrón idéntico (coincidencia de las cadenas ligeras y pesadas de ambas) (Fig. 1). Sin embargo, en la IgG comercial no apareció la cadena correspondiente a la pesada de la IgM.

Dado que la IgG utilizada para la obtención de los anticuerpos monoclonales anti-IgG canina fue la comercial, una vez descatalogada esta, lo que se pretendió con la purificación fue la obtención de un material adecuado para la continuación de los experimentos encaminados a la caracterización de los anticuerpos. Una vez comprobada la igual reacción de los anticuerpos frente a la IgG comercial y a la IgG purificada, se consideró como correcto el proceso de purificación llevado a cabo, considerando como irrelevante la presencia de la IgM en la correcta realización del resto de los experimentos.

Según estos resultados, se considera que el método usado es correcto, rápido y viable para el aislamiento de la IgG de perro.

La IgG purificada se utilizó siguiendo dos objetivos:

1.- La obtenida a partir de animales sanos para continuar con la caracterización de los anticuerpos monoclonales producidos y su posterior aplicación en inmunoensayos.

2.- La obtenida a partir de animales con leishmaniosis, para ser usada en técnicas de inmunohistoquímica como un marcador específico de dicha patología, y por tanto útil en el diagnóstico de la misma.

FUSIÓN: OBTENCIÓN DE ANTICUERPOS MONOCLONALES ANTI-IgG DE PERRO

El objetivo de este apartado es conseguir un panel de anticuerpos monoclonales frente a la IgG canina para ser utilizados en el estudio del sistema inmune del perro, así como en el diagnóstico de enfermedades relacionadas con el mismo.

La fusión se realizó con células de bazo de ratón inmunizado con la IgG comercial (Sigma) y células de mieloma sp2/0-Ag14. Mediante este proceso se obtuvieron anticuerpos monoclonales anti-IgG de perro.

En dicha fusión se usaron 6×10^7 esplenocitos de ratón en proporción 1:2 con las células de mieloma. Resultaron un total de 411 clones viables, lo que se traduce en una eficacia de $6,85 \times 10^{-6}$. De ellos, se seleccionaron 11 por su reacción positiva en ELISA indirecto frente a la IgG de perro utilizada en la inmunización. De estos clones, se escogieron finalmente 6, siguiendo como criterio de selección la estabilidad en su crecimiento y presentar el isotipo IgG. Estos clones se denominaron como sigue: **CA2E9, CA3B8, CA3H1, CA4E7, CA4F1, y CA5B2.**

CARACTERIZACIÓN DE LOS ANTICUERPOS MONOCLONALES ANTI-IgG DE PERRO

- Isotipos

Como primer paso en la caracterización de los anticuerpos producidos se determinó su isotipo, al ser ésta una característica fundamental a la hora de la elección del método de purificación de los mismos.

De los seis anticuerpos obtenidos, el **CA2E9** fue del isotipo IgG_{2b}, y el resto, **CA3B8**, **CA3H1**, **CA4E7**, **CA4F1**, y **CA5B2**, del IgG₁.

Coincidió el hecho de que los 5 anticuerpos no utilizados de los 11 iniciales por su falta de estabilidad fueron del isotipo IgM.

- Purificación

La purificación de los anticuerpos se realizó para conseguir dos objetivos: Por un lado, aislar la IgG del resto de los elementos del medio de cultivo que pueden interferir en los inmunoensayos, originando reacciones inespecíficas; y por otro lado, para determinar la concentración exacta de los anticuerpos, fundamental a la hora de desarrollar gran parte de los inmunoensayos.

Para llevar a cabo este procedimiento fue necesario, en primer lugar, la producción de ascites. Cada clon se inyectó a dos lotes, separados en el tiempo, de tres ratones cada uno. La concentración exacta de cada anticuerpo purificado (Tabla 1) se determinó mediante recta de calibrado con un kit de Bio-Rad (Bio-Rad Protein Assay).

Las concentraciones obtenidas de los anticuerpos se ajustaron a unos valores medios de 1-1,5 mg/ml. Se obtuvo una concentración menor en el caso del **CA2E9** del Lote 1 (0,5 mg/ml), no atribuyéndose este bajo

resultado a una propiedad intrínseca del anticuerpo, ya que en el lote 2 la concentración corresponde a los límites mencionados. La mayor concentración obtenida fue la del **CA3B8** para el Lote 2, con un valor de 3,57 mg/ml.

La eficacia de la purificación se comprobó visualizando las muestras en un gel de acrilamida (SDS-PAGE), en el cual se pudo apreciar la práctica ausencia de bandas diferentes a las cadenas de la IgG (Fig. 2).

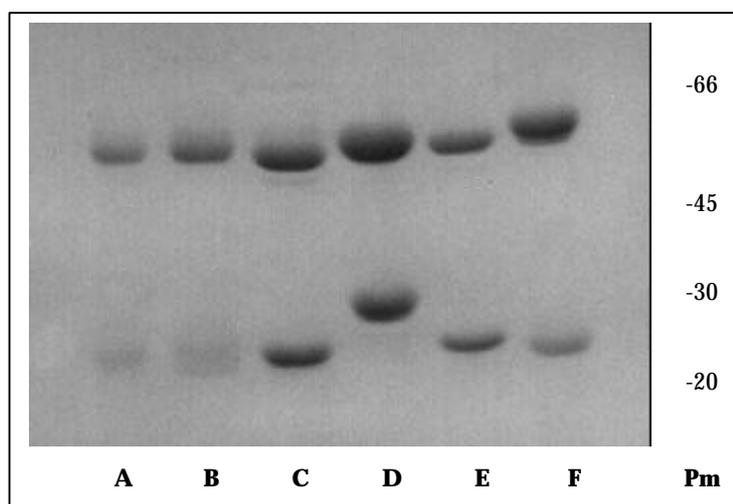


Figura 2. Electroforesis en gel SDS-PAGE de los anticuerpos monoclonales anti-IgG de perro purificados. (A) **CA2E9**; (B) **CA3B8**; (C) **CA3H1**; (D) **CA4E7**; (E) **CA4F1**; (F) **CA5B2**. Los valores estándares de los pesos moleculares se recogen a la derecha

En los seis anticuerpos se comprobó que se trataban de IgGs de ratón por la distribución de las cadenas ligeras y pesadas. En todos los casos, la cadena superior mostró un peso molecular correspondiente al descrito para la cadena pesada de la IgG (50kDa).

Uno de los anticuerpos, el **CA4E7**, resultó tener la cadena ligera λ de la IgG, al tener un peso aproximado de 27,5 kDa. Los otros cinco anticuerpos, mostraron la cadena ligera κ , con un peso molecular aproximado de 26 kDa.

Tabla 1. Concentraciones (mg/ml) de los anticuerpos purificados y biotinados

ANTICUERPO	LOTE 1	LOTE 2	BIOTIN.
CA2E9	0,5	1,21	0,1
CA3B8	0,9	3,57	-
CA3H1	1,6	0,96	0,7
CA4E7	2,13	1,74	1,8
CA4F1	1,06	1,4	0,56
CA5B2	1,5	1,37	0,66

- Marcaje con biotina

Parte de los anticuerpos purificados se usaron para marcarlos con biotina, con el fin de usarlos en posteriores inmunoensayos.

La eficacia del marcaje se comprobó mediante ELISA indirecto usando como sustrato estreptavidina conjugada con peroxidasa, que al unirse a la biotina hicieron posible el revelado. Todos los anticuerpos dieron reacción positiva mediante este método descrito, a excepción del **CA3B8**. Esto significó que la biotina se había fijado a todos los anticuerpos menos a uno. El **CA3B8** no se marcó, incluso cuando se repitió el proceso de marcaje a concentraciones dos veces superiores a las utilizadas con el resto de los anticuerpos (Jeanson et al, 1988).

La concentración de los anticuerpos marcados (Tabla 1), al igual que se hizo con los no marcados, se determinó mediante recta de calibrado con un kit de Bio-Rad (Bio-Rad Protein Assay).

- Títulos

Mediante los ensayos que se describen a continuación, se determinaron las concentraciones óptimas de trabajo del sobrenadante, anticuerpos purificados, anticuerpos marcados e IgG purificada; con el fin de poder utilizar dichos reactivos lo suficientemente diluidos como para evitar reacciones inespecíficas y para economizar en su uso.

a) Titulación del sobrenadante de los anticuerpos

El sobrenadante de cada uno de los clones productores de anticuerpos se tituló, mediante ELISA indirecto, con el fin de conocer a que mínima concentración podían ser usados. Dicho sobrenadante se uso en aquellos ensayos en los que no fue necesario obtener una respuesta cuantitativa, siendo suficiente una respuesta cualitativa.

Los resultados de la titulación variaron entre 1/16 para el **CA3B8** y 1/128 para el **CA4F1** (tabla 2⁽¹⁾).

Se considera como título la mayor dilución del sobrenadante que conduce a una absorbancia doble a la del control negativo. Este criterio se siguió en todas las titulaciones posteriores.

b) Titulación de los anticuerpos purificados

Los anticuerpos purificados se titularon, mediante ELISA indirecto, con el fin de conocer a que mínima concentración podían ser usados. Los anticuerpos purificados se usaron en aquellos ensayos en los que fue necesario cuantificar la respuesta.

Los resultados de la titulación variaron entre 2 µg para el **CA3B8** y 0,128 ng para el **CA4F1** (tabla 2⁽²⁾).

c) Titulación de los anticuerpos biotinados

Los anticuerpos biotinados se titularon, mediante ELISA indirecto, con el fin de conocer a que mínima concentración podían ser usados.

Los resultados de la titulación varían entre 0,4 µg para el **CA2E9** y el **CA3H1**, y 16 ng para el **CA5B2** (la tabla 2⁽³⁾).

d) Titulación de la IgG purificada

Mediante esta titulación, se calculó la concentración mínima de IgG purificada reconocida por cada uno de los anticuerpos.

Los resultados obtenidos variaron entre 11,72 ng para el **CA2E9** y 62,5 ng para el **CA3B8** (tabla 2⁽⁴⁾).

Tabla 2. Titulaciones (claves en el texto)

Anticuerpo	Sobrenad⁽¹⁾	Purific⁽²⁾	Biotin⁽³⁾	IgG⁽⁴⁾
CA2E9	1/46	80 ng	0,4 µg	11,72 ng
CA3B8	1/16	2 µg	-	62,5 ng
CA3H1	1/64	16 ng	0,4 µg	15,63 ng
CA4E7	1/64	16 ng	80 ng	31,25 ng
CA4F1	1/128	0,128 ng	0,4 µg	15,63 ng
CA5B2	1/64	2 µg	16 ng	31,25 ng

Comparando las columnas (1) y (2), se comprobó que los resultados coincidieron en todos los casos: los anticuerpos que funcionaron a mayores diluciones del sobrenadante, lo hicieron a bajas concentraciones una vez purificados, y viceversa. También se comprobó que los anticuerpos detectaban en todos los casos bajas concentraciones de inmunoglobulina, lo que puede ser importante a la hora de detectar pequeñas variaciones de las concentraciones en el suero.

- Reactividad de los anticuerpos frente a distintas Igs caninas

Mediante el uso del único panel disponible de inmunoglobulinas caninas (Bethyl Laboratories), se comprobó la reactividad de los anticuerpos producidos frente a la IgG de perro con los distintos isotipos de Igs caninas.

De los seis anticuerpos, solamente tres fueron específicos de la IgG: el **CA3B8** reaccionó con el IgG₁ y el IgG₂, mientras que el **CA3H1** y el **CA4F1** fueron específicos de la IgG₂. En cuanto a los resultados obtenidos con el resto de los anticuerpos, el **CA2E9** reaccionó con la IgG₂ y con la IgM; el **CA4E7** reaccionó con la IgG₁, IgG₂, IgA e IgM; y el **CA5B2** reaccionó con la IgG₁, IgG₂ e IgM (tabla 3).

	IgG ₁	IgG ₂	IgA	IgM
CA2E9		+		+
CA3B8	+	+		
CA3H1		+		
CA4E7	+	+	+	+
CA4F1		+		
CA5B2	+	+		+

Tabla 3. Reactividad de los anticuerpos frente a distintas Igs caninas

- Inmunoblotting

Mediante este procedimiento se obtuvo la especificidad de cada uno de los anticuerpos producidos hacia las cadenas de la IgG canina. El experimento se realizó probando los anticuerpos frente el suero de perro (Fig. 3.1) y frente a la IgG purificada (Fig. 3.2).

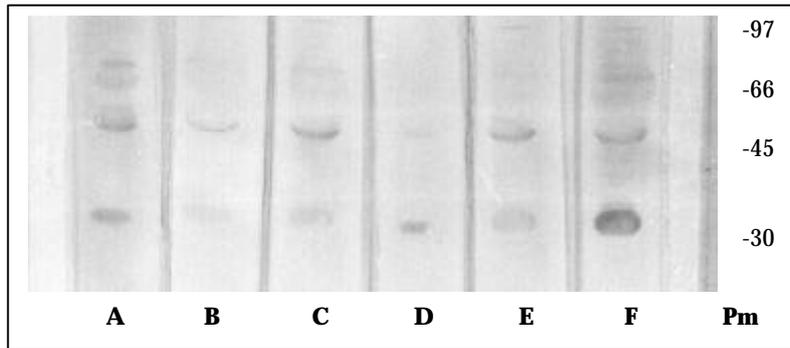
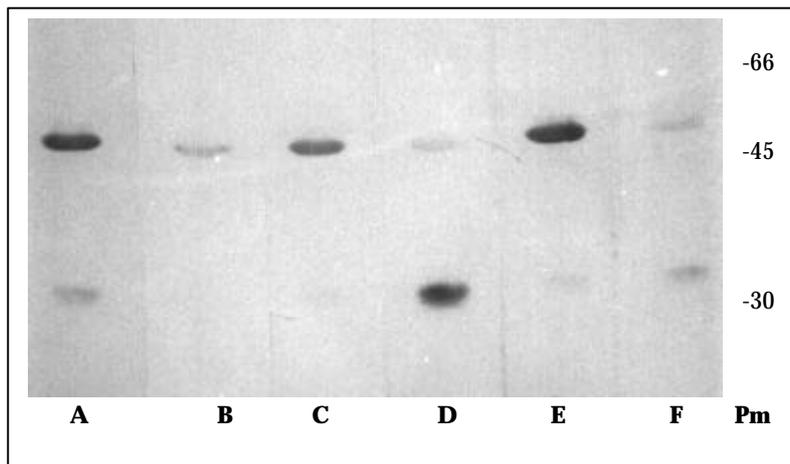
Fig. 3.1**Fig.3.2**

Figura 3. Inmunoblotting de los anticuerpos monoclonales anti-IgG de perro frente a suero canino (3.1) y frente a IgG de perro purificada (3.2). (A) CA2E9; (B) CA3B8; (C) CA3H1; (D) CA4E7; (E) CA4F1; (F) CA5B2. Los valores estándares de los pesos moleculares se recogen a la derecha

En todos los casos, los resultados obtenidos al enfrentar los anticuerpos a la IgG purificada fueron los mismos que los obtenidos en el caso del suero de perro. El **CA2E9**, además de reaccionar con la cadena ligera y pesada, cuando se enfrentó al suero también reaccionó con una banda de peso molecular aproximado de 70-75 kDa, que podría corresponder a la IgM canina. El **CA5B2** también dio una reacción similar a este último, aunque la reacción con la banda de 70-75 kDa fue algo menor. Tres de los anticuerpos (**CA3B8**, **CA3H1** y **CA4F1**) reaccionaron con mayor especificidad frente a la cadena pesada de la IgG canina. Uno de ellos, el **CA4E7**, reaccionó específicamente con la cadena ligera. El **CA5B2** reaccionó con igual intensidad frente al cadena ligera y la pesada (Tabla 4).

Estos resultados se corresponden a los obtenidos anteriormente en la reacción de los anticuerpos frente a los distintos isotipos de las Igs, en los cuales el **CA2E9**, **CA4E7** y **CA5B2** reaccionaban con la IgM. El caso del **CA4E7** se puede explicar pues reconoce la cadena ligera, común a todas las Igs. El caso del **CA2E9** y del **CA5B2**, se explicó por la cadena aparecida en el inmunoblotting explicada anteriormente.

Tabla 4. Inmunoblotting frente a IgG purificada y a suero de perro

Anticuerpo	IgG purificada	Suero de perro
CA2E9	Cadena ligera y pesada	Cadena ligera/cadena pesada IgG e IgM
CA3B8	Cadena pesada	Cadena pesada
CA3H1	Cadena pesada	Cadena pesada
CA4E7	Cadena ligera	Cadena ligera
CA4F1	Cadena pesada	Cadena pesada
CA5B2	Cadena ligera y pesada	Cadena ligera/cadena pesada IgG e IgM

- Niveles de IgG + IgM en sueros de perro

Mediante ELISA sandwich usando la pareja **CA4E7 sin marcar/CA5B2 biotinado** se testaron 45 sueros de perros de ambos sexos, diversas razas y diferentes edades.

De los 45 sueros testados, los valores recogidos se agruparon en 4 intervalos (tabla 5), recogiéndose una representación esquemática en la Figura 4.

Tabla 5. Concentraciones de IgG + IgM total en el suero de 45 individuos

mg/ml	nº individuos
3-7	9
7-16	31
16-20	3
≥ 20	2

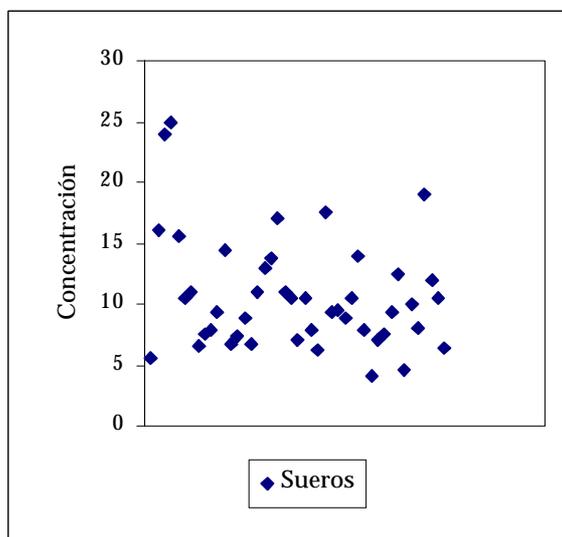


Figura 4. Representación gráfica de los resultados de medir la concentración de IgG + IgM en sueros de 45 perros

De los resultados obtenidos, se compro que el 68,9% de los individuos se encontraban dentro de los valores normales de IgG. Los 2 individuos con valores superiores a 20 mg/ml resultaron estar afectados de leishmaniosis, por lo que el aumento en la concentración de IgG se atribuyó a este proceso patológico. El resto de valores distintos de los normales se explicarían por posibles estados patológicos o de inmunosupresión.

- Obtención de fragmentos Fab de la IgG canina

Los fragmentos Fab de la IgG se obtuvieron mediante el tratamiento de la inmunoglobulina con papaína. Una vez obtenidos los Fab se enfrentaron en ELISA indirecto a los sobrenadantes de los anticuerpos anti-IgG de perro. Tres de los anticuerpos dieron negativos frente al Fab: **CA2E9**, **CA3B8**, **CA3H1**; mientras que los tres restantes: **CA4E7**, **CA4F1** y **CA5B2** reconocieron el fragmento Fab de la IgG canina.

- Tratamiento de la IgG con ácido

Una vez tratada la IgG purificada con ácido (Glicina 0,1M pH 2.3), se comprobó mediante ELISA indirecto que todos los anticuerpos la seguían reconociendo en unos porcentajes similares a los obtenidos frente a la IgG sin tratar (Fig. 5). Dados estos resultados se puede concluir que los anticuerpos reconocen epítomos de la IgG resistentes al tratamiento realizado con ácido.

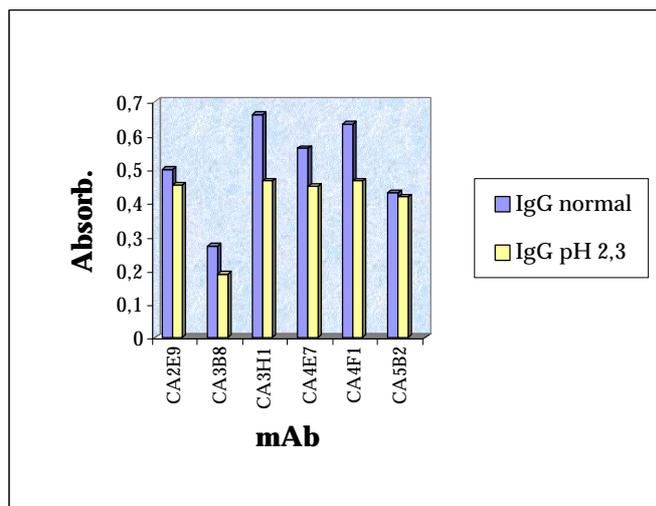


Figura.5. Representación de los efectos del tratamiento de la IgG de perro con ácido sobre el reconocimiento de los anticuerpos monoclonales anti-IgG de perro

- Tratamiento de la IgG con calor

Una vez tratada la IgG purificada con calor (56°C), se comprobó mediante ELISA indirecto que todos los anticuerpos la seguían reconociendo en unos porcentajes similares a los obtenidos frente a la IgG sin tratar (Fig. 6). A la vista de estos resultados, se puede concluir que los anticuerpos reconocen epítomos de la IgG resistentes al tratamiento realizado con calor.

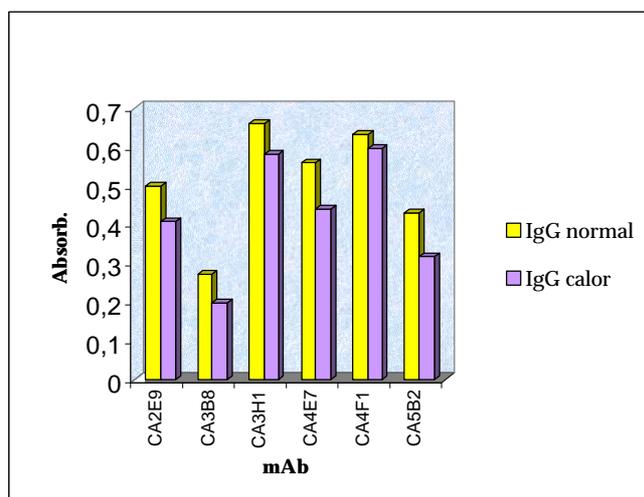


Figura 6. Representación de los efectos del tratamiento de la IgG de perro con calor sobre el reconocimiento de los anticuerpos monoclonales anti-IgG de perro

Tratamiento de la IgG con m-peryodato

Mediante esta prueba se comprobó que tres de los anticuerpos (**CA2E9**, **CA3H1**, **CA4F1**) daban una reacción similar frente a la IgG tratada con m-peryodato y a la IgG sin tratar (Fig. 7), lo que significa que en los epítomos reconocidos por los anticuerpos no están implicados hidratos de carbono.

Los otros tres anticuerpos (**CA3B8**, **CA4E7**, **CA5B2**) si vieron modificada su reacción al tratar la IgG con m-peryodato (Fig. 7), con lo que se demostró que en los epítomos reconocidos por estos anticuerpos si estaban implicados los hidratos de carbono.

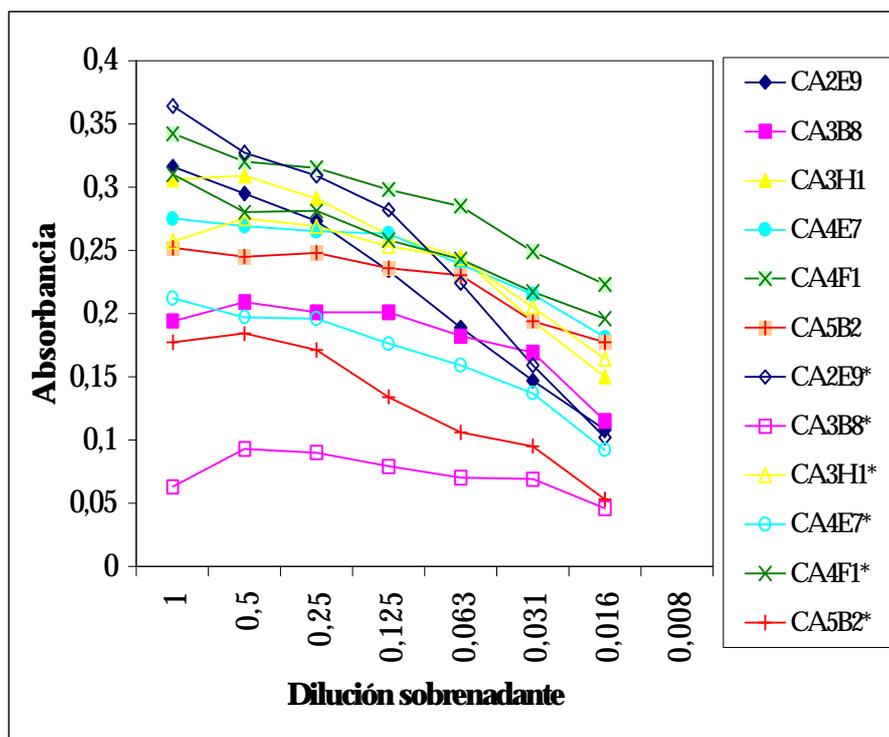


Figura 7. Efecto del tratamiento con m-peryodato sobre el reconocimiento de los anticuerpos anti-IgG canina frente a la IgG de perro. Los anticuerpos marcados con (*) son los enfrentados a la IgG tratada con m-peryodato

- Reactividad con distintos tipos celulares: Citometría de flujo

Mediante citometría de flujo se determinó la especificidad de los anticuerpos anti-IgG frente a distintos tipos celulares (tabla 6).

En todos los casos en general, la reacción fue muy escasa, coincidiendo con los datos al respecto encontrados en la bibliografía. Únicamente la reacción de los seis anticuerpos frente a las células procedentes de la tonsila, fue algo superior a la del resto, siendo esta reacción de mayor intensidad con el anticuerpo **CA2E9**.

Tabla 6. Reactividad de los anticuerpos con diferentes tipos celulares determinados mediante citometría de flujo (%)

mAb	BAZO	GANGLIO	TIMO	TONSILAS	PBL
CA2E9	2	0	8	37	2
CA3B8	3	0	0	3	2
CA3H1	11	12	3	12	0
CA4E7	21	5	0	24	10
CA4F1	13	0	0	19	1
CA5B2	17	21	1	17	8

- Reactividad de los anticuerpos frente a sueros de distintas especies

Mediante esta prueba, se comprobó el grado de conservación entre especies del epítipo reconocido por los anticuerpos.

Enfrentando los anticuerpos a sueros de distintas especies, mediante ELISA indirecto, se obtuvieron los resultados especificados en la tabla 7.

Uno de los anticuerpos, el **CA2E9**, fue el que mostró una mayor reacción cruzada, al dar positivo frente a los sueros de cabra, cerdo, conejo, gato, hamster, hombre, oveja y rata.

De los resultados obtenidos, se pudo determinar que cinco de los anticuerpos mostraban una especificidad bastante aceptable, siendo totalmente específico el **CA3B8** y el **CA5B2**. El **CA3H1** reaccionó frente a los sueros de conejo; el **CA4E7** frente al suero de oveja; y el **CA4F1** frente al suero de cabra, conejo, hombre y oveja.

Tabla 7. Crosreactividad de los anticuerpos frente a sueros de distintas especies

	CA2E9	CA3B8	CA3H1	CA4E7	CA4F1	CA5B2
Caballo	-	-	-	-	-	-
Cabra	+	-	-	-	+	-
Cerdo	+	-	-	-	-	-
Conejo	+	-	+	-	+	-
Gato	+	-	-	-	-	-
Hamster	+	-	-	-	-	-
Hombre	+	-	-	-	+	-
Oveja	+	-	-	+	+	-
Perro	+	+	+	+	+	+
Rata	+	-	-	-	-	-
Ratón	-	-	-	-	-	-
Vaca	-	-	-	-	-	-

- Inmunohistoquímica

Mediante esta técnica, se comprobó la reactividad de los anticuerpos frente a cortes de distintos órganos (ganglio linfático, bazo, médula ósea, tonsilas y placas de Peyer). Los resultados se muestran en la tabla 8.

La reacción positiva se manifestó mediante tinción del citoplasma de las células plasmáticas (Fig. 8).

Tabla 8. Reactividad de los anticuerpos frente a cortes histológicos

	CA2E9	CA3B8	CA3H1	CA4E7	CA4F1	CA5B2
Ganglio	–	++	++	+	+	+
Bazo	–	+	++	+	+	+
M. ósea	–	+	++	+	+	+
Tonsilas	–	–	++	+	+	+
P. Peyer	–	+	++	+	+	+

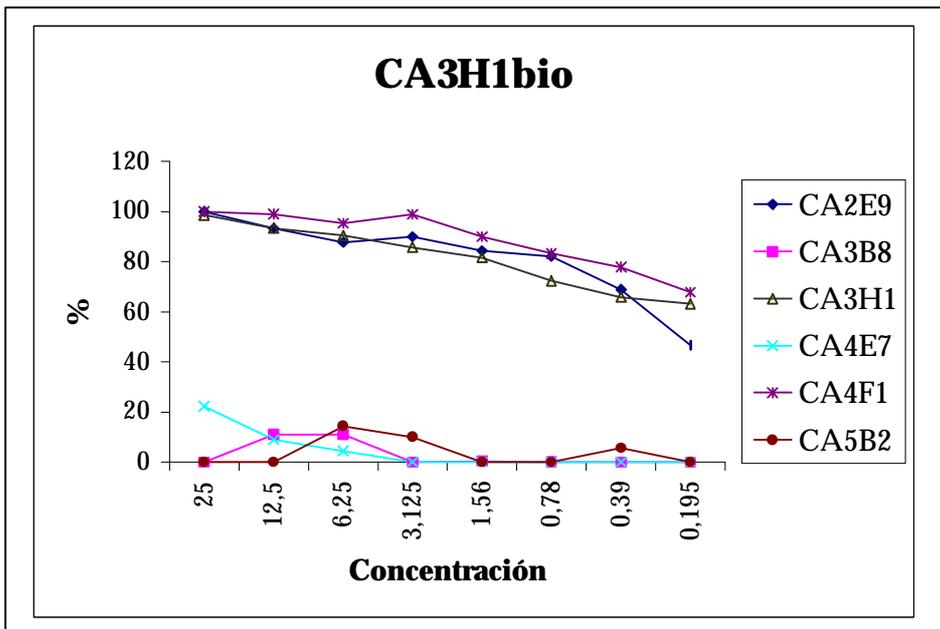
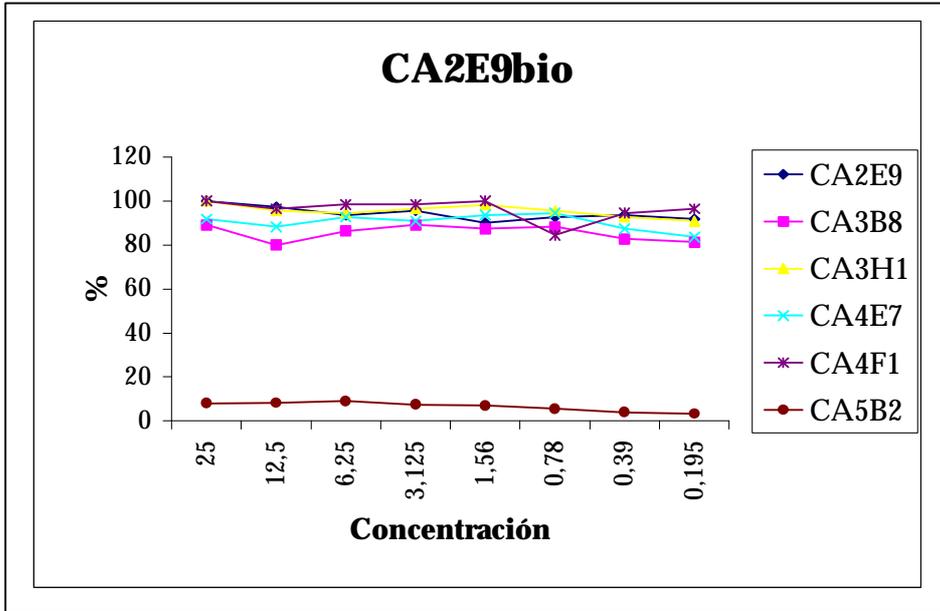
Los tejidos enfrentados al **CA2E9** presentaron gran ruido de fondo en toda la superficie de los mismos, no atribuible a la purificación del anticuerpo pues no se presentó en los cortes con el resto de los anticuerpos. A causa de esta suciedad no se pudo apreciar ninguna reacción positiva, por lo que este anticuerpo se eliminó del panel de los usados en técnicas inmunohistoquímicas. El resto de los anticuerpos dieron una reacción muy específica, sin apreciarse apenas ruido de fondo.

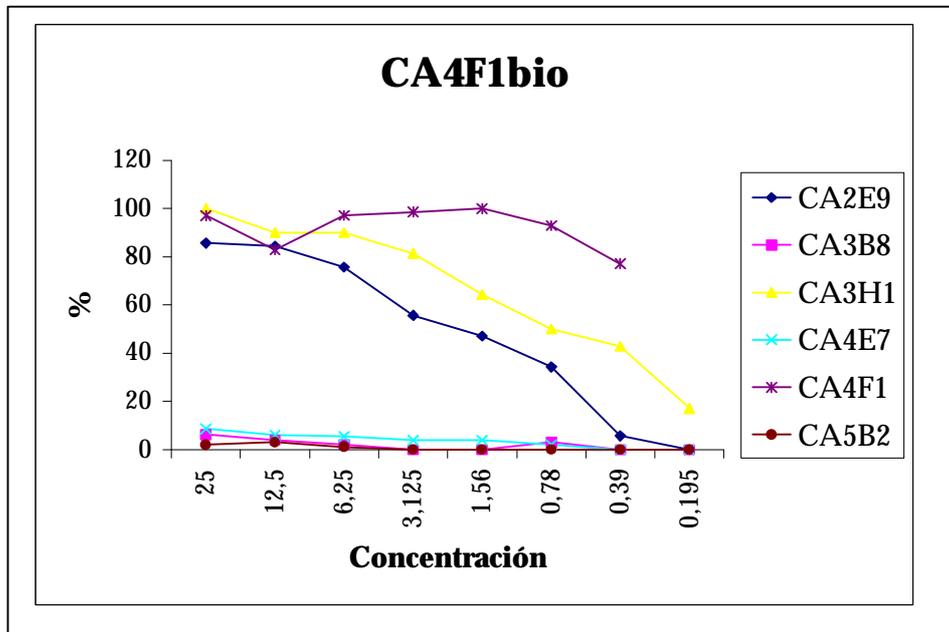
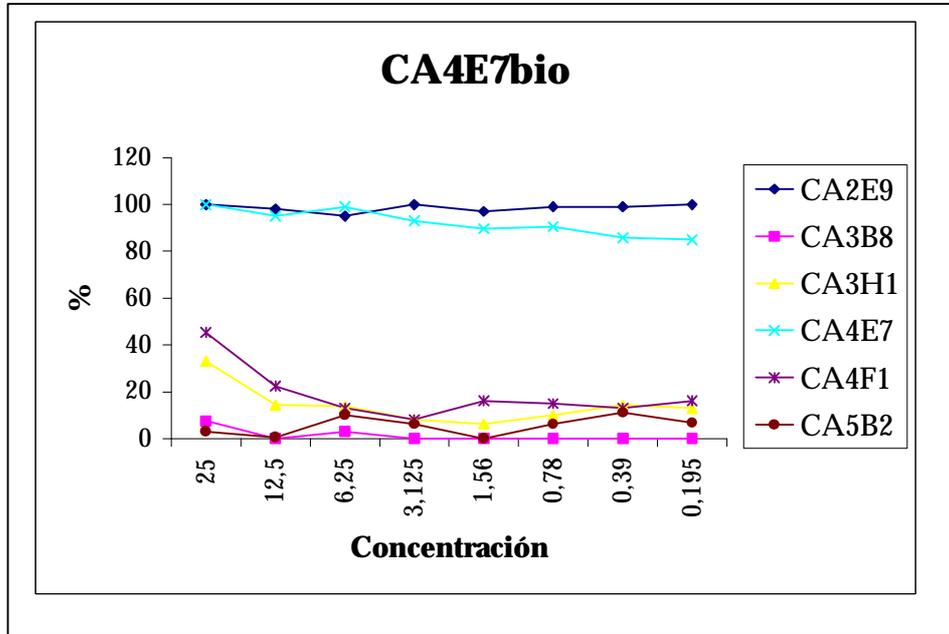
Los anticuerpos anti-IgG usados para las técnicas inmunohistoquímicas (todos menos el **CA2E9**), mostraron reacción positiva en el citoplasma de las células plasmáticas, siendo el **CA3H1**, **CA4E7** y **CA4F1** los que dieron una reacción más intensa, por lo que han sido los anticuerpos más usados en el desarrollo de este tipo de técnicas.

- **ELISA de competición: Ensayos de inhibición**

Los ensayos de competición fueron desarrollados para determinar si los anticuerpos reconocen epítomos distintos de la IgG canina. Para ello se enfrentaron los anticuerpos sin marcar a los anticuerpos biotinilados.

Los resultados se recogen en la tabla 9 y se esquematizan en la figura 9.





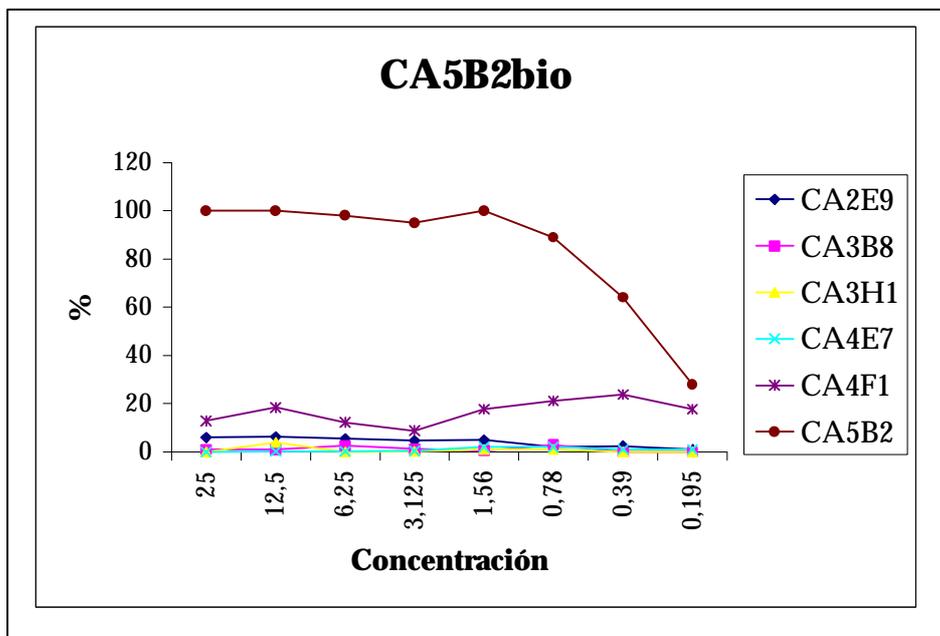


Figura 9. Gráficos ELISA de competición. Cada gráfico indica los resultados obtenidos al enfrentar uno de los anticuerpos biotinados con el resto de los anticuerpos sin marcar. El **CA3B8** no se ha incluido entre los marcados al no poderse biotinar

Como resultado de esta prueba, se ha agrupado a los seis anticuerpos en distintos grupos de acuerdo a sus reactividades.

El **CA2E9** se agrupa en un grupo aparte al presentar un patrón totalmente distinto al resto (da inhibición con el resto de los anticuerpos).

El **CA3B8** se agrupa en un segundo grupo, aunque el estudio con este anticuerpo no se pudo completar al no poder biotinarse.

El **CA3H1** y el **CA4F1** estarían juntos en el tercer grupo, al presentar un patrón de reacción idéntico.

El **CA4E7** presenta un patrón de reacción similar al **CA5B2**, aunque no se inhiben entre sí y el primero presenta inhibición frente al **CA2E9**.

El **CA5B2** no presenta inhibición con ninguno de los anticuerpos, por lo que reconoce un epítipo diferente a los demás.

Tabla 9. Representación de los resultados de los ensayos de competición

	CA2E9	CA3B8	CA3H1	CA4E7	CA4F1	CA5B2
CA2E9b	+	+	+	+	+	-
CA3B8b	NT	NT	NT	NT	NT	NT
CA3H1b	+	-	+	-	+	-
CA4E7b	+	-	-	+	-	-
CA4F1b	+	-	+	-	+	-
CA5B2b	-	-	-	-	-	+

NT = No testado. El **CA3B8** no se puede marcar

+ = Inhibición. Los dos anticuerpos reconocen el mismo epítipo

- = No Inhibic. Los dos anticuerpos reconocen epítipos diferentes

APLICACIONES DE LOS ANTICUERPOS MONOCLONALES ANTI-IgG DE PERRO

- Cuantificación de la IgG + IgM en suero: ELISA sandwich

- Elección de la pareja

Para la realización de este ensayo se probaron todas las parejas que reconocían epítipos distintos. De los resultados obtenidos se agruparon las parejas en tres grupos:

1.- **CA4E7sm/CA5B2bio**. Esta pareja se usó para determinar la cantidad de IgG + IgM en suero de perro. Se eligió por considerarse los valores obtenidos mediante su uso los más ajustados a los esperados y los más reproducibles.

2.- **CA3B8sm/CA4E7bio**. Esta pareja se utilizó para la determinación de la IgG en suero de perro. Los valores obtenidos se ajustaron a las concentraciones esperadas (9-15 mg/ml). No se profundizó en el estudio de esta pareja al detectarse cierta variabilidad interensayo que hizo considerarla menos adecuada que la anterior para estandarizarla. Sin embargo, y dado el interés de tener una pareja específica de IgG para la determinación de los niveles de dicha inmunoglobulina con el fin de aplicarla en diagnóstico experimental y clínico, se pretende realizar un estudio posterior más exhaustivo para intentar ponerla a punto.

3.- Con respecto a las siete parejas restantes testadas, no se profundizó en su estudio al no ajustarse los resultados obtenidos a los valores de concentraciones esperados.

Una vez elegida la pareja **CA4E7sm/CA5B2bio**, se consiguió determinar la concentración de IgG + IgM presente en suero de perro mediante ELISA sandwich. En todas las pruebas realizadas, las cantidades obtenidas se ajustaron al rango esperado (9-18 mg/ml = 9-15 mg/ml IgG + 0,7-2,7 mg/ml IgM). Como muestra de referencia en el ensayo se utilizó un suero comercial de perro (Bethyl Laboratories) de concentración conocida, considerándose el experimento como correcto cuando los valores obtenidos en este suero se ajustaban a las concentraciones conocidas.

- Optimización del ensayo

Los valores de anticuerpos usados (500 ng/200 ng) para la determinación de IgG + IgM a partir de suero de perro se estandarizaron por medio de pruebas con diversas concentraciones de los anticuerpos. Del anticuerpo sin marcar se ensayaron 2 µg, 1 µg, 500 ng y 250 ng. Una vez seleccionada la concentración de 500 ng como la más adecuada para tapizar las placas, se dispuso a seleccionar la concentración del anticuerpo marcado, probando las siguientes: 200, 100, 50 y 25 ng. Con el anticuerpo marcado, la concentración elegida fue la de 200 ng. Estas concentraciones seleccionadas como las más adecuadas para la realización del ensayo coincidieron con aquellas encontradas en la bibliografía. En todos los casos en los que se realizaron experimentos similares, se comprobó que la concentración de los anticuerpos sin marcar era el doble de la del anticuerpo marcado.

- Exactitud del ensayo

Con el fin de analizar la exactitud del ensayo (conformidad de los resultados obtenidos con los valores teóricos) se ha llevado a cabo el experimento presentado en la tabla 10, en el cual se han comparado los niveles de IgG + IgM determinados en el ensayo con los aportados por el fabricante del suero comercial (Bethyl Laboratories).

Los resultados obtenidos han mostrado un buen paralelismo entre las concentraciones de IgG + IgM obtenidas experimentalmente y los valores teóricos esperados, con diferencias entre los valores medios que oscilaron entre 1,1 y 3,2.

Tabla 10. Exactitud de las determinaciones de las concentraciones de IgG + IgM del suero de perro mediante la técnica de ELISA sandwich (n=8)

Valores esperados (mg)	Valores observados (mg)	Diferencia
25	23,9 ± 1,4	1,1
12,5	15,7 ± 1,6	- 3,2
6,25	8,6 ± 1,2	- 2,4
3,125	5,5 ± 0,6	-2,4

- Precisión del ensayo

Para determinar la precisión del ensayo (término indicador del grado de dispersión de los resultados), se han calculado los coeficientes de variación (CV) intraensayo e interensayo. Para ello, se realizaron 3 y 5 determinaciones respectivamente; las primeras en distintas placas y las segundas en la misma. A las determinaciones obtenidas se les calculó la media (x), desviación estándar (SD) y coeficiente de variación (CV). Los valores obtenidos (Tabla 11) oscilaron entre 4,5-11,9% para el intraensayo, y entre 6,6-18,2% para el interensayo.

Tabla 11. Reproducibilidad de las determinaciones de las concentraciones de IgG + IgM del suero de perro mediante la técnica de ELISA sandwich

SUEROS	Intraensayo (n = 3)		Interensayo (n = 5)	
	x IgG ± SD (mg/ml)	CV (%)	x IgG ± SD (mg/ml)	CV (%)
25 µg	23,67 ± 1,25	5,2	24,2 ± 1,6	6,6
12,5 µg	14,18 ± 0,81	4,5	13,4 ± 1,6	18
6,25 µg	8,97 ± 1,07	11,9	8,28 ± 1,38	16,7
3,125 µg	4,73 ± 0,52	6,8	3,28 ± 0,59	18,2

- Reactividad de los anticuerpos monoclonales anti-IgG canina y de la IgG-anti leishmania con cortes de bazo de perro con leishmaniosis

En la actualidad, el diagnóstico de la leishmaniosis se realiza mediante distintas técnicas, aunque siguen siendo muy frecuentes aquellos casos en los que el diagnóstico se limita a la suposición de la existencia de la enfermedad debido a un conjunto de síntomas ciertamente inespecíficos. También hay que destacar el diagnóstico de la leishmaniosis mediante PCR (Reacción en cadena de la polimerasa), y en este estudio se propone las técnicas inmunohistoquímicas para diferenciar este estado patológico.

Los objetivos perseguidos mediante la realización de esta prueba fue el desarrollo de un método diagnóstico eficaz contra la leishmaniosis. Para ello, se desarrollaron los siguientes aspectos:

- Aplicación del **anticuerpo policlonal anti-leishmania** obtenido en este trabajo (ver apartado “Purificación de la IgG canina”).

- Aplicación del anticuerpo monoclonal anti-IgG de perro **CA3H1**.

En ensayos previos a este experimento se intentó usar el anticuerpo monoclonal anti-IgG de perro marcado, para evitar así tener que realizar un paso más con el uso del anticuerpo anti-ratón marcado. Dichos anticuerpos marcados, pese a funcionar correctamente en ELISA, no desarrollaron la reacción esperada en inmunohistoquímica.

Mediante esta técnica, usando el anticuerpo **CA3H1**, que fue como ya se dijo uno de los anticuerpos que mostraron mejor reactividad en inmunohistoquímica, se obtuvieron los siguientes resultados:

Por un lado, se confirmó el uso del anticuerpo **CA3H1** en esta técnica, pudiéndose así mismo aplicar en cualquier otro estudio en el que este implicado el sistema inmune canino; y por otro, se comprobó que el **anticuerpo anti-leishmania** aislado reaccionaba efectivamente frente a las leishmanias.

Los resultados obtenidos en los diferentes cortes (Fig. 10) realizados fueron los siguientes:

a) *Anticuerpo primario anti-leishmania control positivo + Anticuerpo secundario anti-IgG canina biotinado control positivo (Sigma) (Fig. 10D)*

En este corte, utilizado como control positivo, se tiñeron las leishmanias y las células plasmáticas.

b) *Anticuerpo primario anti-leishmania control positivo + Anticuerpo secundario anti-IgG canina problema (CA3H1) + Anticuerpo terciario anti-IgG murino biotinado (Dako) (Fig. 10C)*

En este caso, al igual que el anterior se tiñeron las leishmanias y las células plasmáticas, indicando que el **CA3H1** reacciona bien en este tipo de preparaciones.

c) ***Anticuerpo primario anti-leishmania problema + Anticuerpo secundario anti-IgG canina problema (CA3H1) + Anticuerpo terciario anti-IgG murino biotinado (Dako) (Fig. 10B)***

En este tercer tipo de corte los resultados fueron los mismos que los obtenidos en los dos casos anteriores, con lo que se puede concluir que el anticuerpo anti-leishmania purificado funciona correctamente al dar iguales resultados que el control positivo.

d) *PBS control negativo + Anticuerpo secundario anti-IgG canina problema (CA3H1) + Anticuerpo terciario anti-IgG murino biotinado (Dako) (Fig. 10A)*

Por último, en este corte, usado como control negativo, solamente se tiñeron las células plasmáticas.

Como resumen de estos resultados se propone este método como idóneo para el diagnóstico de la leishmaniosis en perro. Se propone el

realizar el método tal y como se ha descrito anteriormente, de manera que el control negativo sirva para distinguir la tinción entre las células plasmáticas y las leishmanias. Esta diferenciación nítida es la que permite un correcto diagnóstico en los ensayos descritos. Hasta ahora se producían reacciones cruzadas de los anticuerpos con las leishmanias y las células plasmáticas.

- Aplicación del anticuerpo monoclonal CA4E7 en el diagnóstico de enfermedades autoinmunes (Pénfigo) mediante inmunohistoquímica

El interés del desarrollo de este método diagnóstico radica principalmente en la necesidad de un método rápido y eficaz que permita distinguir los individuos afectados por esta enfermedad autoinmune. En la actualidad, el diagnóstico de esta patología se limita en la mayoría de las ocasiones a una serie de síntomas comunes a otras patologías cutáneas, lo que en ocasiones lleva a un diagnóstico equivocado, con los consiguientes problemas producidos por un tratamiento incorrecto o tardío. Intentando resolver estos problemas relacionados con el diagnóstico, se ha recurrido a técnicas inmunohistoquímicas para poner en evidencia las lesiones histológicas típicas de este estado patológico. Esta técnica en la actualidad se ha desarrollado por medio de la aplicación de un anticuerpo policlonal anti-IgG de perro (ICN). El problema del uso de este anticuerpo es que, al ser policlonal, da un ruido de fondo muy intenso que en ocasiones imposibilita un diagnóstico correcto (Fig. 11).

Intentando superar estos problemas indicados anteriormente, mediante inmunohistoquímica y empleando el anticuerpo monoclonal **CA4E7**, se ha conseguido poner en evidencia los infiltrados de IgG en el caso de enfermedades autoinmunes como es el pénfigo (Fig. 11). En este caso, se ve claramente la reacción positiva del anticuerpo al reaccionar

con los depósitos de IgG alrededor de las vacuolas originadas en la epidermis, pudiéndose observar con gran claridad el patrón en panal de abeja formado por las mismas características de esta enfermedad. Igualmente se aprecian los depósitos de IgG en lámina propia en los cortes de piel. Esta puesta en evidencia de las lesiones características descritas para el pénfigo, unido a la reacción totalmente específica con la práctica ausencia de reacciones inespecíficas y de ruido de fondo, hacen del uso de este anticuerpo en la técnica descrita como idónea para el diagnóstico del pénfigo.

- Determinación del anticuerpo monoclonal CA3H1 mediante un sistema inmunosensible de filtración/disolución continuo

La base de éste sistema, desarrollado en el Departamento de Química Analítica de la Universidad de Córdoba, es un inmunoensayo no competitivo heterogéneo tipo sandwich que determina un inmunocomplejo de elevado peso molecular. Dicho inmunocomplejo es retenido temporalmente en un microfiltro localizado antes del detector.

La estructura macromolecular se forma en base a la afinidad de la interacción entre la estreptavidina y la IgG canina purificada marcada con biotina y la inmunoreacción entre la IgG canina y el anticuerpo monoclonal anti-IgG canina (**CA3H1**). Como elemento traza se usó un anticuerpo antiratón desarrollado en cabra.

La extensión de la inmunoreacción se monitorizó fluorimétricamente por medio de la condensación producida entre el ácido 4-hidroxifenilacético y al peróxido de hidrógeno en presencia de la peroxidasa retenida en el filtro.

Este método fue puesto a punto contrastándolo con el ELISA sandwich desarrollado a lo largo de este trabajo. Se comprobó que presentaba una gran precisión, destacando una alta sensibilidad que

permite la determinación de concentraciones de IgG entre 0,5 µg y 0,001 ng por ml.

En esta técnica cabe destacar la alta sensibilidad del método que permite determinar concentraciones del orden de 0,001 ng.

- Uso de los anticuerpos monoclonales biotinados como secundarios en ELISA para la determinación de distintos estados patológicos en el perro

Una vez probada la eficacia de los anticuerpos monoclonales biotinados en ELISA, se ha propuesto su uso en un futuro como anticuerpos secundarios para el diagnóstico de los más diversos estados patológicos.

Para ello, se propone el uso del método propuesto en este trabajo en el apartado “ELISA directo: Aplicación de los anticuerpos biotinados” (ver “Materiales y Métodos”). Dados los resultados obtenidos con todos los anticuerpos (exceptuando al **CA3B8**, que no se pudo marcar), se concluyó que los anticuerpos biotinados podían sustituir al anticuerpo secundario anti-ratón.

Siguiendo este método descrito, se propone el desarrollo de kits diagnósticos frente a diversas enfermedades (según demanda del mercado) de la siguiente manera:

Antigenado de la placa con el agente productor de la enfermedad (p.ej. leishmania, parvovirus, etc.) y desarrollo del resto de la técnica tal y como se ha especificado anteriormente.

Figura 8. Inmunohistoquímica de tejidos de perro en estado fisiológico frente a distintos anticuerpos anti-IgG canina.

A: Ganglio con el **CA4E7**. 40X. Citoplasma de las células plasmáticas teñidas en los cordones medulares.

B: Ganglio con el **CA3H1**. 40X. Citoplasma de las células plasmáticas teñidas en los cordones medulares.

C: Intestino (Placas de Peyer) con el **CA3H1**. 40X. A la izquierda de la imagen se observa el epitelio intestinal y a la derecha las células plasmáticas en el tejido linfoide. Ausencia de ruido de fondo.

D: Bazo con el **CA4E7**. 20X. Células plasmáticas.

E: Tonsila con el **CA4E7**. 20X. Tinción de células plasmáticas y del plasma por presencia en el mismo de IgG.

F: Arteria, capilares y páncreas con el **CA4E7**. 20X. Luz arterial positiva por presencia de IgG. Alrededores y páncreas negativo por ausencia de células plasmáticas.

G: Intestino con el **CA4E7**. 20X. Infiltrado de células plasmáticas abundante por estimulación antigénica, frecuente en animales jóvenes. Células plasmáticas en lámina propia y tejido conectivo sin ruido de fondo.

H: Intestino con el **CA4E7**. 40X. Detalle de imagen anterior.

Figura 10. Inmunohistoquímica para el diagnóstico de leishmania en bazo de perro.

A: Control negativo. Reacción del **CA3H1** sin el anti-leishmania. Únicamente se unen las células plasmáticas. 40X.

B: Muestra problema. Diagnóstico positivo de leishmania con el **anti-leishmania CA** y el anticuerpo **CA3H1**. Se tiñen las leishmanias en el interior de los macrófagos y algunas células plasmáticas. 40X.

C: Muestra problema. Igual a la anterior pero usando el anti-leishmania control positivo. 40X.

D: Muestra control positivo. Igual a la B pero usando el anti-leishmania control positivo y el anti-IgG canino biotinado control positivo. 40X.

Figura 11. Inmunohistoquímica para el diagnóstico de enfermedades autoinmunes en piel de perro. Tinción de la IgG con anticuerpos anti-IgG en lámina propia y en depósitos alrededor de las vacuolas formadas en la dermis como consecuencia del proceso autoinmune. En todos los casos se compara la reacción específica del anticuerpo anti-IgG **CA4E7** frente a los depósitos de dicha inmunoglobulina, que permite un diagnóstico inequívoco, con la reacción de un anticuerpo policlonal comercial (ICN) que da una reacción totalmente inespecífica que impide un diagnóstico diferencial.

A: Lupus eritematoso. **CA4E7**. 200X.

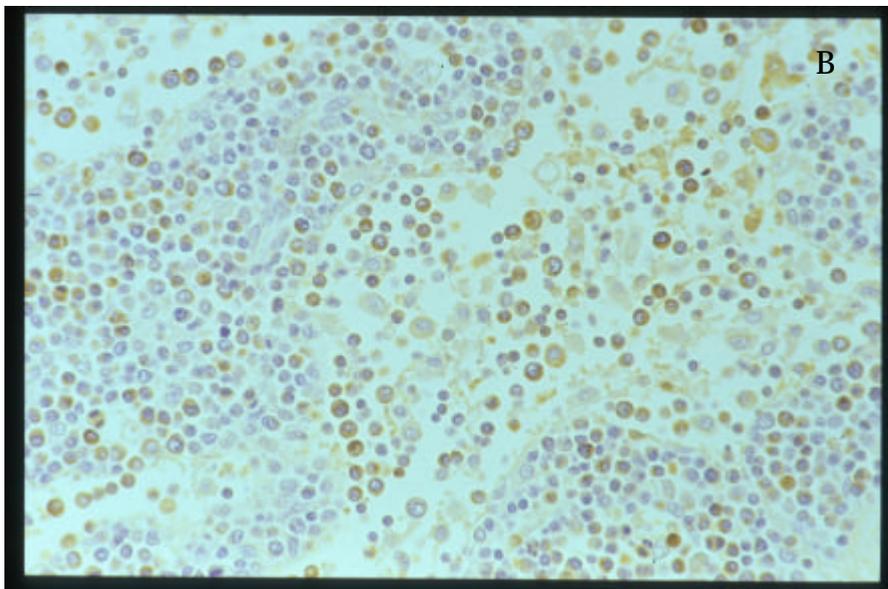
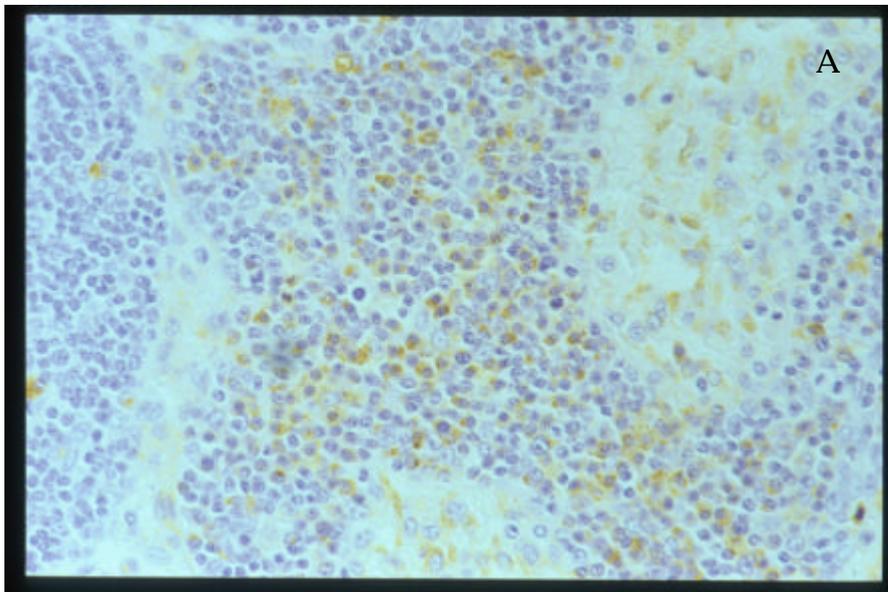
B: Lupus eritematoso. Anticuerpo policlonal comercial (ICN). 20X.

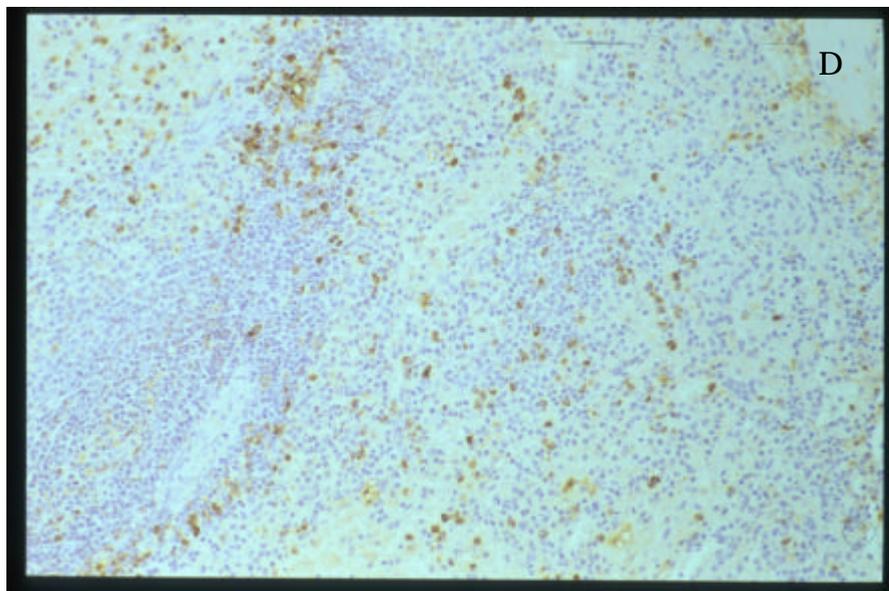
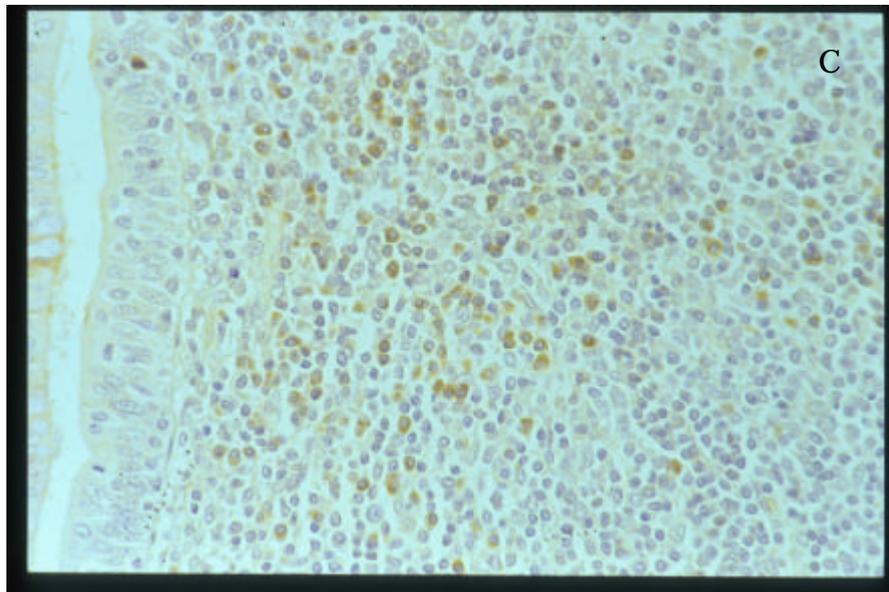
C: Pénfigo foliáceo. **CA4E7**. 20X

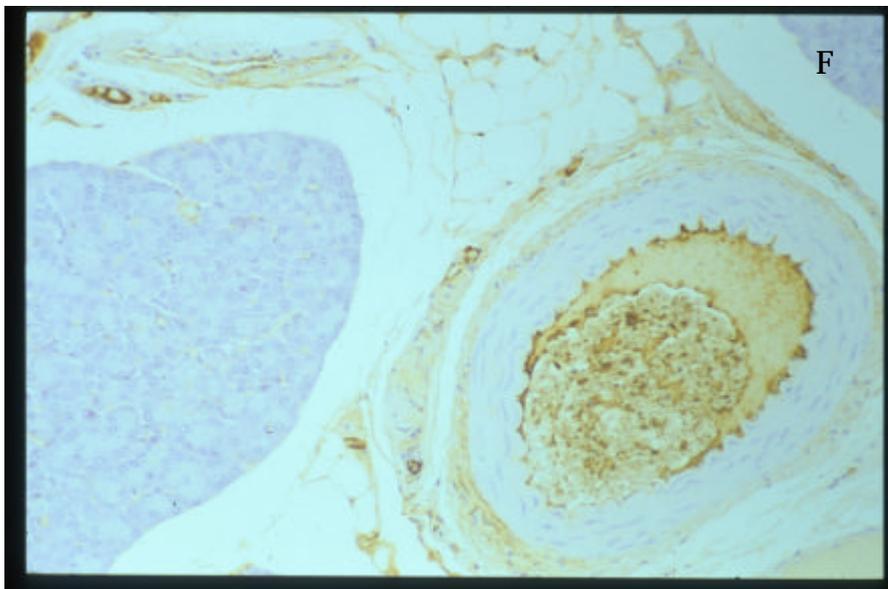
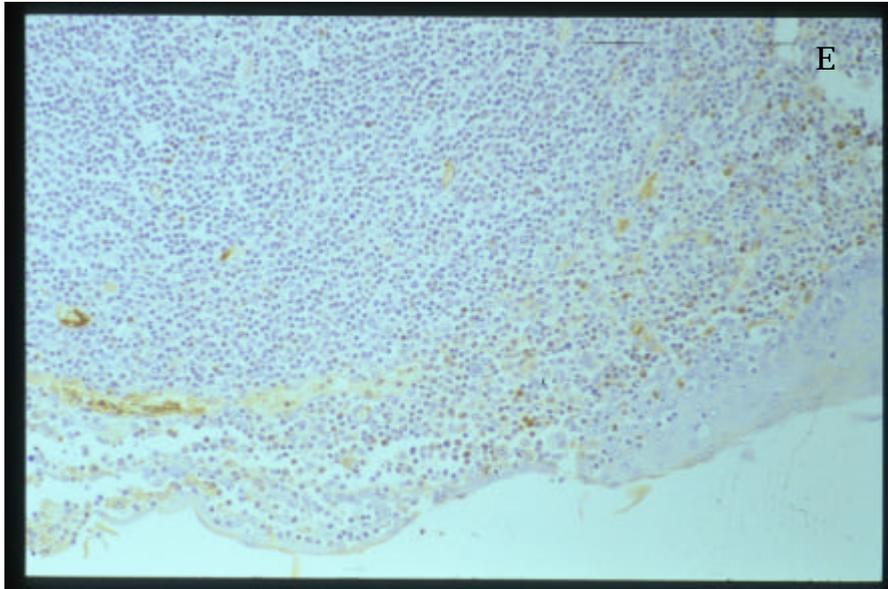
D: Pénfigo foliáceo. Anticuerpo policlonal comercial (ICN). 20X.

E: Pénfigo foliáceo. **CA4E7**. 20X

F: Pénfigo foliáceo. Anticuerpo policlonal comercial (ICN). 20X.







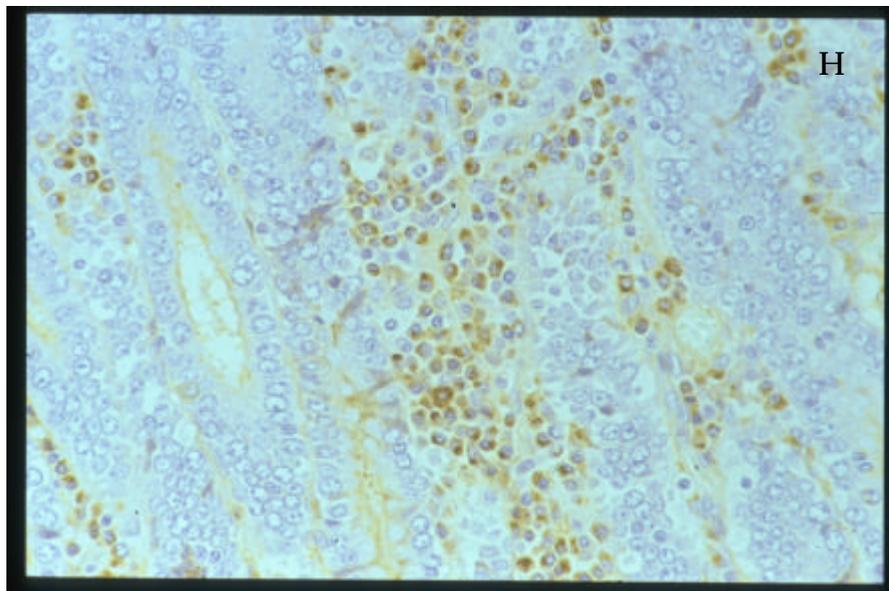
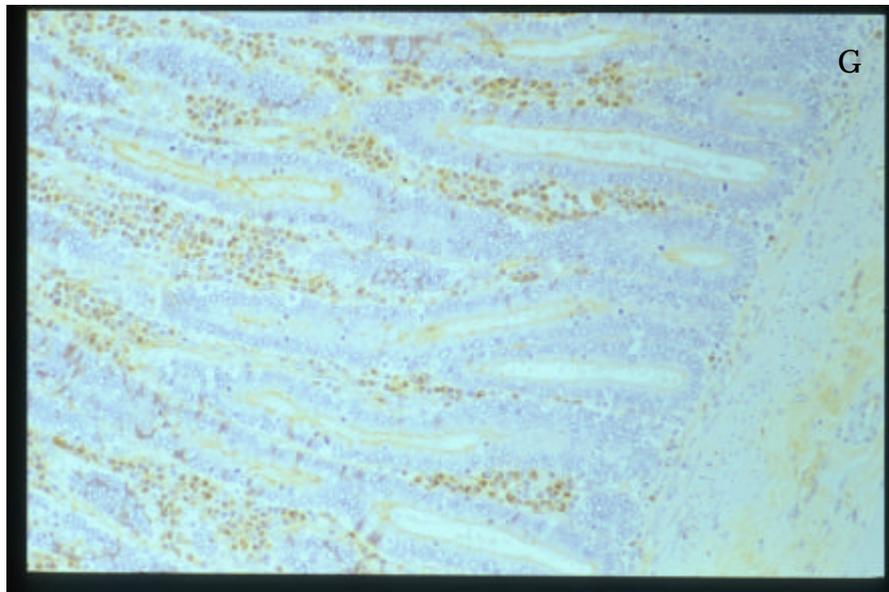
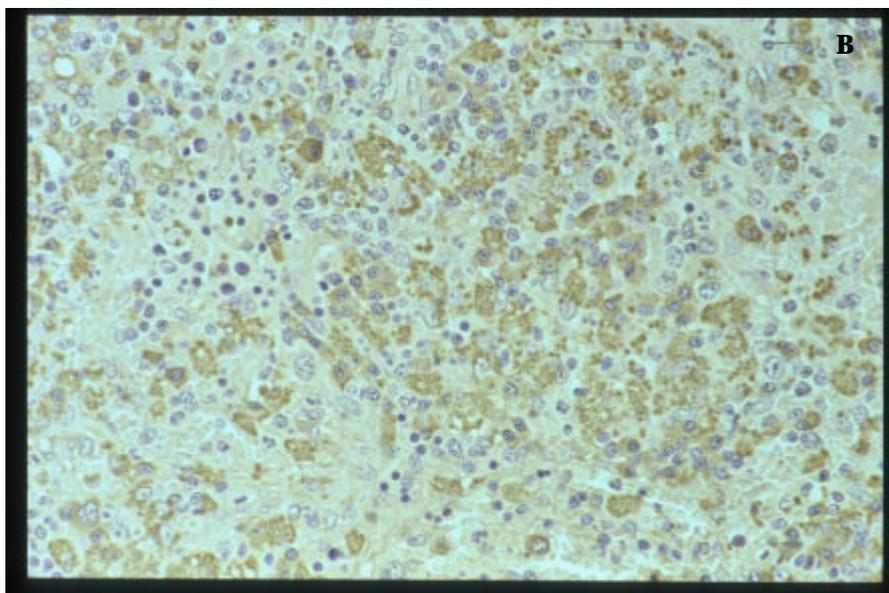
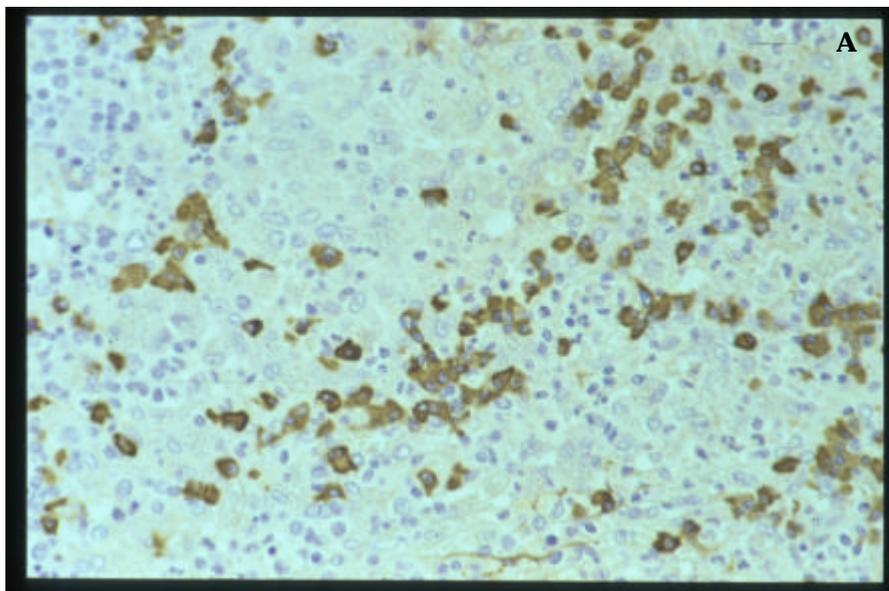


Figura 8



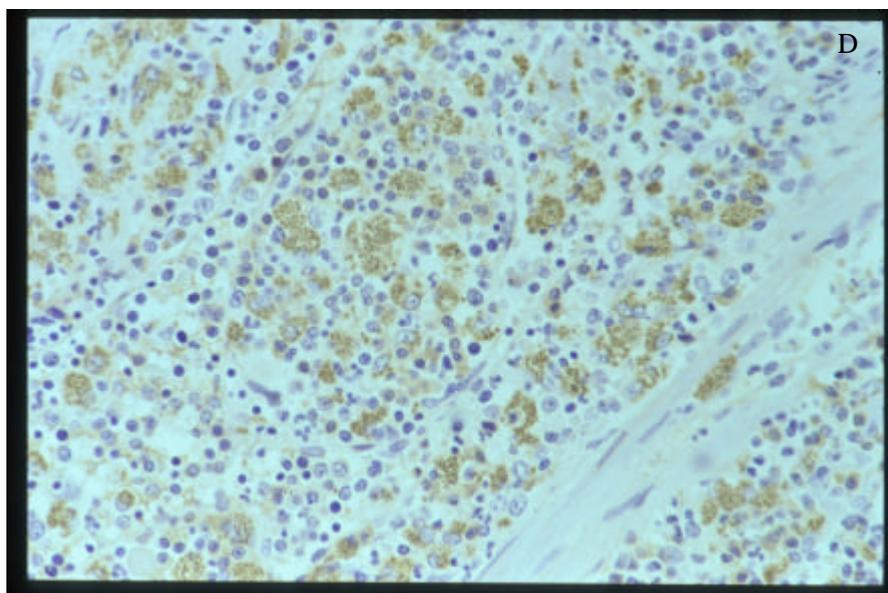
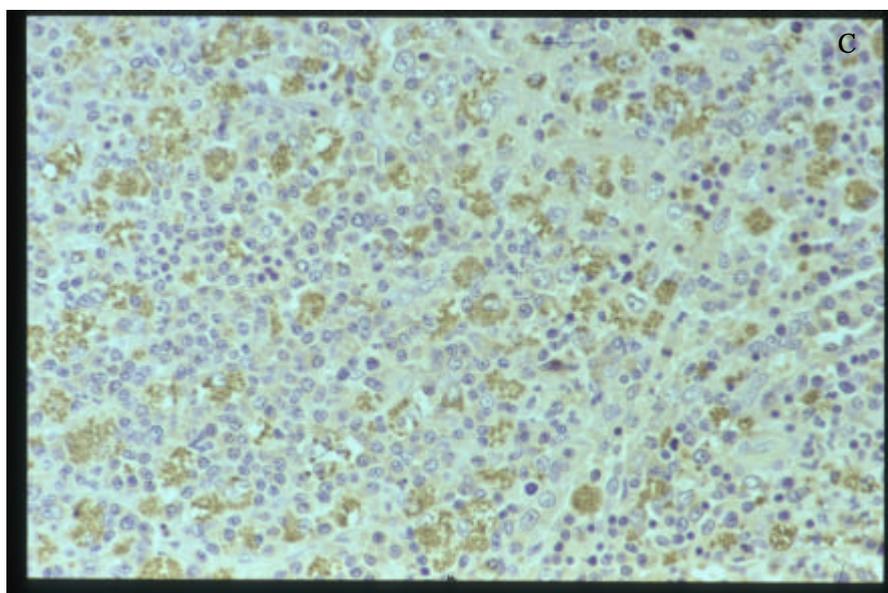
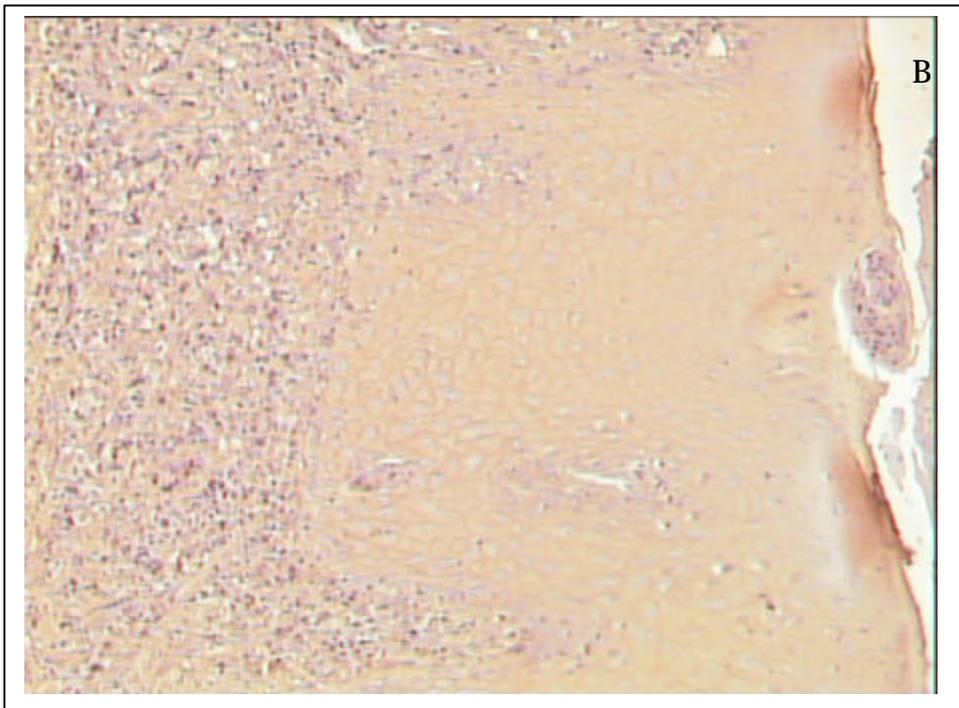
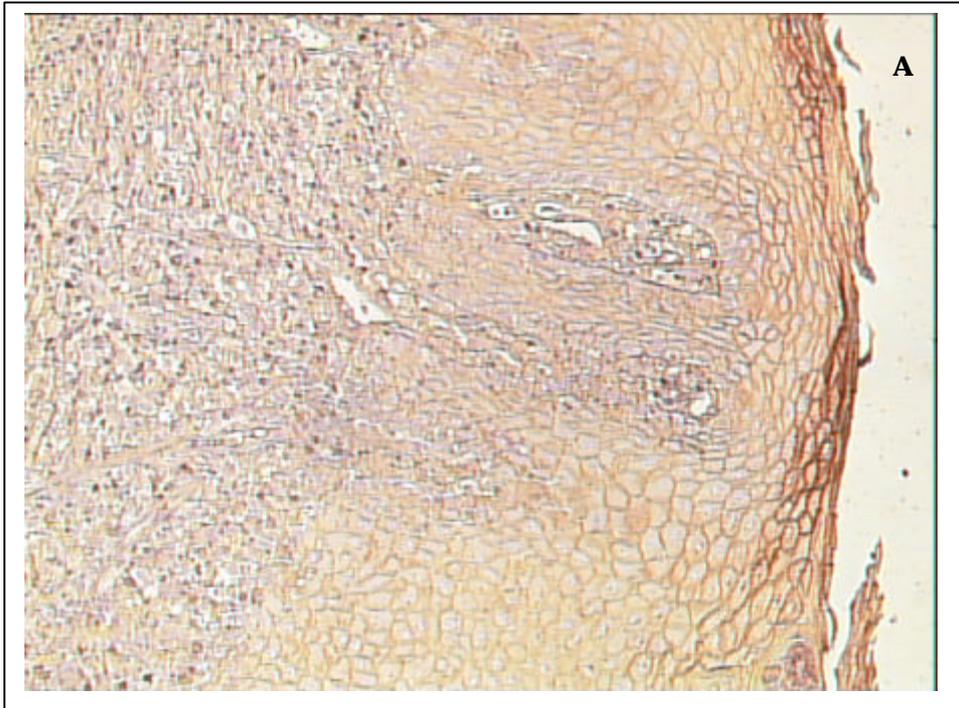
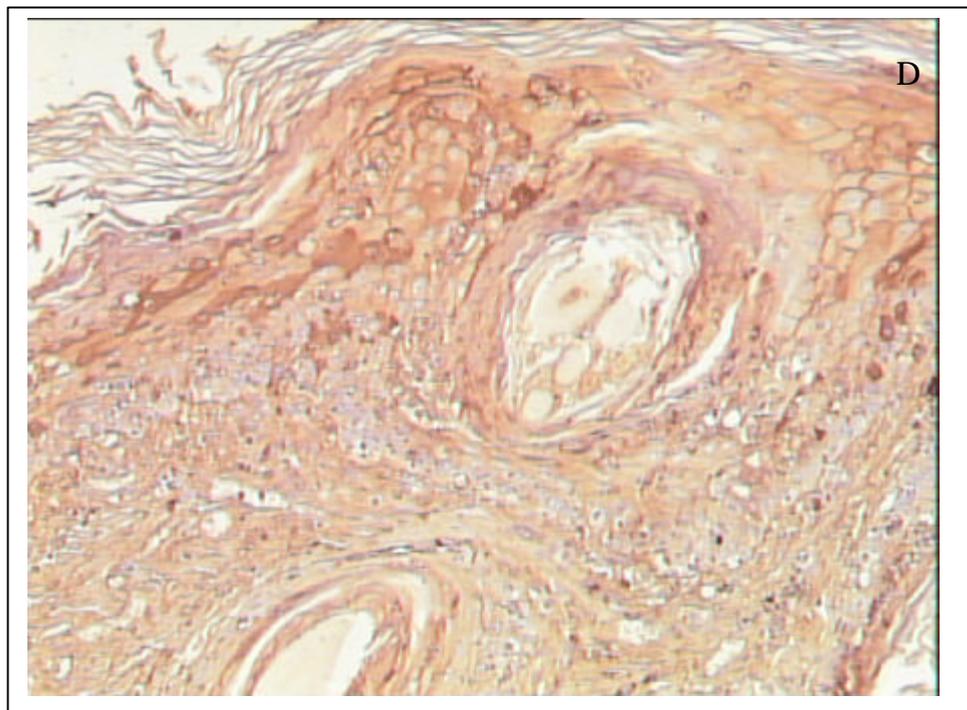
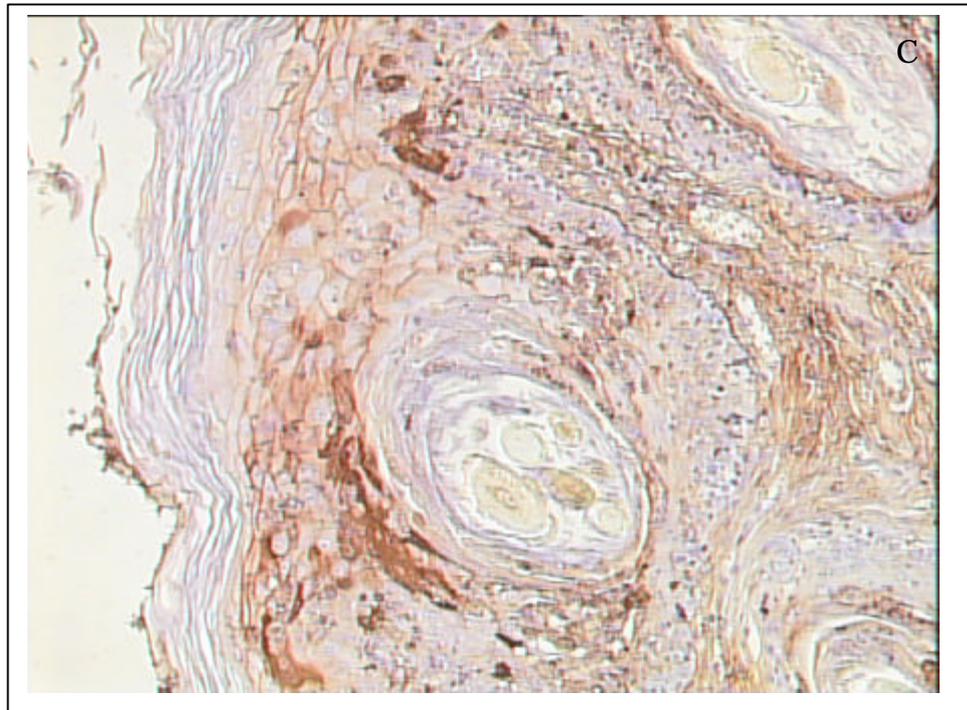


Figura 10





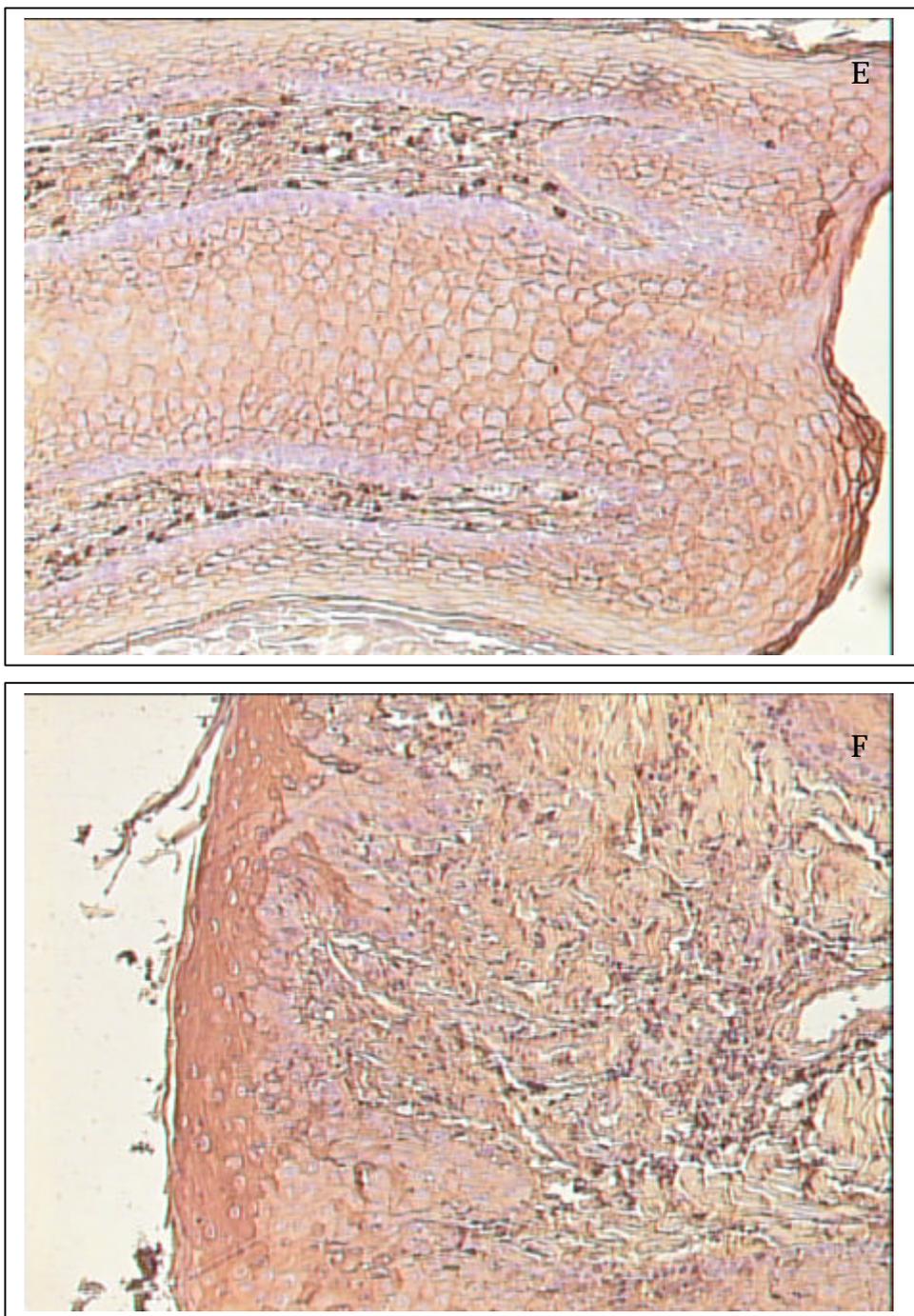


Figura 11

DISCUSIÓN

El estudio de las inmunoglobulinas de los mamíferos ha recibido una considerable atención en los últimos años. Estos estudios se han basado tanto en el conocimiento de la ontogenia y filogenia de las inmunoglobulinas como en la profundización en las necesidades de control y prevención efectiva de muchas enfermedades. Este tema ha visto gran aplicación en diversas especies: humano, (Chandler et al, 1983; Sánchez-Madrid et al, 1984), ratón (Baniyash & Eshhar, 1984; Hirano et al, 1988), rata (Conrad et al, 1983; Rup, 1989), vaca (Goodger et al, 1984; Thatcher & Gershiwn, 1988), oveja (Shaw et al, 1996), gato (De Boer et al, 1992), perro (De Boer et al, 1993; Mazza et al, 1994), pollo (Kuiken et al, 1998), peces (Sánchez et al, 1991; Sánchez et al, 1993; Estévez et al, 1994) y en los animales silvestres (Hibman & Griffin, 1992).

En este trabajo se ha procedido a la producción de anticuerpos monoclonales específicos de inmunoglobulina G canina comercial. Así mismo, se han caracterizado dichos anticuerpos con el fin de aplicarlos en diversos inmunodiagnósticos que ayuden a conocer más y mejor la inmunología canina. Una vez puesto a punto el método de purificación de la IgG canina (al ser descatalogada por la casa comercial), y partiendo de suero de animales parasitados con *leishmania infantum*, se procedió a aislar la IgG específica de dicho estado inmunológico, siendo posteriormente aplicada en inmunodiagnóstico.

PURIFICACIÓN DE LA INMUNOGLOBULINA G (IgG) CANINA

- Purificación de IgG a partir de sueros de animales sanos

En este trabajo se ha obtenido la IgG canina en un solo paso y con un alto grado de pureza mediante un método de cromatografía de afinidad sobre proteína A. La gran ventaja aportada por éste método propuesto reside en varios aspectos que se desarrollarán con más profundidad a continuación: Por un lado la rapidez, eficacia y especificidad del método; y por otro el hecho de la ausencia en el mercado de dicho material. Estas últimas características convierten a esta IgG purificada en un elemento único a la hora del diagnóstico y tratamiento tanto clínico como experimental.

Con respecto al método usado en la purificación de la inmunoglobulina, presenta la ventaja de no ser tan laborioso como los métodos tradicionales basados en la precipitación cromatográfica de sales de las inmunoglobulinas y posterior cromatografía de intercambio iónico y filtración en gel (Johnston et al, 1971; Kobayashi et al, 1984; Rosenshein & Marchalonis, 1987; Fuda et al, 1991). Han sido también varios los intentos de purificación de la inmunoglobulina canina con proteína A (Warr & Hart, 1974; Scott et al, 1997) encontrándose gran disparidad de resultados (rendimiento, especificidad, etc.) entre los distintos estudios, probablemente debido a la variedad de protocolos usados en lo que se refiere a pH de unión, líneas de *Staphilococcus*, métodos de elución, etc. (Scott et al, 1997). A pesar de la gran variabilidad, todos los autores coinciden en la gran utilidad del método. En este caso, y dado que el objetivo perseguido en este paso era el obtener inmunoglobulina purificada para su aplicación en estudios posteriores, se ha utilizado el procedimiento estándar descrito en el apartado correspondiente, con los resultados y ventajas que se describen a continuación. En ningún

momento se pretendió llevar a cabo un estudio exhaustivo de la unión Igs-proteína A.

A la sencillez y al rendimiento del método se une el hecho de la eficacia de la purificación, cercana al 90-95% comprobada mediante electroforesis en geles de poliacrilamida. Este resultado es comparable al obtenido por diversos autores (Warr & Hart, 1979). Tras dicha purificación se pudo comprobar que las bandas obtenidas al tratar a la inmunoglobulina con mercaptoetanol coincidían con las dos cadenas de la inmunoglobulina descritas en el perro: la ligera de 25 kDa y la pesada de 50 kDa. Además de estas dos bandas principales, se comprobó que aparecía una banda superior de peso molecular aproximado de 70 kDa. Comparando este patrón de bandas con el obtenido para la inmunoglobulina G comercial, se observó que la distribución de las mismas era prácticamente igual a la purificada en este trabajo. Únicamente se observó una ligera diferencia en la aparición de la banda superior a la cadena pesada: en el caso de la IgG comercial no se apreció la presencia de dicha banda. Dados los resultados obtenidos de las pruebas destinadas a determinar las características de dicha banda, se concluyó que pertenecía a la cadena pesada de la IgM canina. Ya que la purificación de la IgG de perro se realizó a raíz de ser descatalogada por la casa distribuidora y ser necesaria para continuar con la caracterización de los anticuerpos producidos, no se tuvo en cuenta la presencia de la banda correspondiente a la IgM, que por otro lado no supuso más de un 5-10 % del total de la Ig purificada. Una purificación completa de la IgG requeriría un proceso de filtración en gel, paso que no se consideró necesario ya que los objetivos perseguidos con este estudio se vieron cubiertos con la purificación obtenida. Así mismo, se comprobó que la reacción de los anticuerpos producidos frente a ambas IgGs (comercial y purificada) era la misma, por lo que se consideró que no había interferencia apreciable de la IgM.

El rendimiento de la purificación ha sido alto (7,4 mg por ml de suero), ya que por encima de un 50% de la IgG presente en el suero es retenido en la columna de proteína A y se eluyó en medio ácido sin dificultad. Estos resultados se aproximan a los aportados en otros trabajos (Scott et al, 1997). Una mejora de las condiciones de los ensayos permitiría conseguir una aproximación al 82% de unión, cifra considerada como idónea. Dados estos resultados, se puede incluir la IgG de perro entre las que presentan gran afinidad por la proteína A.

Como última ventaja de la IgG purificada en este trabajo, hay que destacar la ausencia en el mercado de material de este tipo: este producto ha sido descatalogado recientemente por SIGMA, única casa que lo comercializaba. En la actualidad, únicamente se han localizado inmunoglobulinas de algunas especies, entre las que no se incluye el perro.

- Purificación de IgG a partir de sueros de animales enfermos de leishmaniosis

Siguiendo el método de purificación especificado anteriormente para aislar la IgG de perro, en este trabajo se procedió a la obtención de IgG a partir de suero de perros afectados de leishmaniosis. Los resultados del proceso en cuanto a pureza, rapidez y rendimiento fueron exactos a los observados en el caso de la IgG a partir de suero de animales sanos. La especificidad de dicha IgG frente a las leishmanias se comprobó mediante inmunohistoquímica, tal y como se comentará en el apartado correspondiente.

Dados los resultados obtenidos en este caso, se propone el método usado para la purificación de IgGs a partir de sueros de perros afectados con otras enfermedades, considerado de interés dada la ausencia de dichos reactivos en el mercado. También puede ser de gran interés

ensayar el uso de dicha IgG-antileishmania en el tratamiento de dicha enfermedad, tal como se comentará posteriormente en el apartado de aplicaciones.

FUSIÓN: OBTENCIÓN DE ANTICUERPOS MONOCLONALES ANTI-IgG DE PERRO

Como resultado de este trabajo, y tras fusión de células de mieloma Sp2 con células de bazo de ratones Balb/c inmunizados con IgG canina (Sigma), se han obtenido diversos anticuerpos monoclonales. La concentración de inmunógeno utilizada en las inmunizaciones realizadas en este trabajo es intermedia sobre las encontradas en la bibliografía. Como es sabido, bajas dosis conducen a anticuerpos monoclonales con una elevada afinidad pero, en general, escaso número de hibridomas (Williams et al, 1990). En este caso se usaron dosis medias como solución de compromiso ya que el objetivo era obtener un número importante de anticuerpos, dado el escaso número disponible en la actualidad. Una vez clonados y comprobada su especificidad frente al inmunógeno utilizado, se seleccionaron seis de ellos para su posterior caracterización. La eficacia de la fusión es similar a la descrita en un trabajo en el que se producen anticuerpos frente a la IgG canina y se obtienen entre 5 y 10 clones de interés en cada fusión (Mazza et al, 1993). Así pues, los anticuerpos usados en este trabajo son: **CA2E9, CA3B8, CA3H1, CA4E7, CA4F1, CA5B2.**

Ya que las inmunoglobulinas son proteínas, son excelentes antígenos cuando se inyectan a especies distintas a la de origen (Halliwell & Gorman, 1989), aunque tal y como ha ocurrido en este caso, la eficacia de la fusión es mucho menor que cuando se utilizan células completas. Dada esta característica, se justifica el hecho de que en esta fusión se

hayan obtenido un número de hibridomas viables (seis) bastante menor que en los casos en los que se usan como inmunógeno células completas.

CARACTERIZACIÓN DE LOS ANTICUERPOS MONOCLONALES ANTI-IgG DE PERRO

- Isotipos

En este trabajo, se seleccionaron 11 anticuerpos en un paso previo a la caracterización de los mismos. De estos 11, 5 presentaron isotipo IgM, 1 isotipo IgG_{2b} y los 5 restantes IgG₁. Los cinco anticuerpos que presentaron isotipo IgM no consiguieron superar el proceso de clonación y estabilización del hibridoma, o bien dejaron de ser positivos frente al inmunógeno utilizado (IgG).

En contraposición a lo explicado anteriormente, los seis anticuerpos de isotipo IgG (1 IgG_{2b}, 5 IgG₁) no presentaron ningún problema a lo largo de todos los procesos de clonación y estabilización a los que fueron sometidos, manteniendo en todo momento su positividad frente a la IgG canina.

En general, los anticuerpos de isotipo IgG son preferidos dada su mayor facilidad para la purificación y su mayor y mejor reactividad en inmunoensayos. En este caso, además parece que también el isotipo IgM afecta a la estabilidad de los hibridomas, aunque dado el escaso número de clones con los que se ha trabajado, serían necesarios más ensayos para probar este hecho.

Probablemente debido a que el tipo de inmunización utilizado en este trabajo es similar al usado por DeBoer (1993), en ambos casos se han obtenido anticuerpos de isotipo IgG₁/κ. En este caso sin embargo, uno de los anticuerpos producidos es específico de la cadena ligera λ.

- Purificación

La producción de ascites a partir de los seis anticuerpos usados en este trabajo se ha considerado correcta, estando los valores de las concentraciones obtenidas (1-3 mg de proteína/ml de ascítes) dentro del rango esperado.

La purificación de los anticuerpos a partir de ascites se ha realizado de manera satisfactoria, tal y como era de esperar, al ser su isotipo IgG. La eficacia de la purificación ha sido demostrada mediante geles de poliacrilamida (ver “Resultados”). La purificación se dio por correcta al observar la ausencia de bandas diferentes a las cadenas de la IgG.

- Marcaje con biotina

Mediante el marcaje de los anticuerpos anti-IgG de perro con biotina se obtuvo un material importante para su uso posterior en ciertos inmunoensayos.

Al realizar un método estándar de marcaje de proteínas con los seis anticuerpos, uno de ellos, el **CA3B8**, no se marcó incluso doblando las concentraciones de biotina usadas con el resto. Mediante ELISA indirecto se comprobó que la biotina no se había fijado a dicho anticuerpo. Este hecho se podría explicar por alguna particularidad en la conformación del anticuerpo, estando descritos por nuestro grupo casos similares en relación con proteínas a las que no se une la biotina (Pintado et al, 1995), así como anticuerpos que presentan dificultad para ser conjugados con enzimas (Jeanson et al, 1988; Williams et al, 1990).

Por tanto, y dado que el resto de los anticuerpos si se han conseguido marcar sin ningún tipo de problemas, se ha limitado el uso del **CA3B8** a aquellos ensayos en los que no se requería el marcaje,

estando el resto de los anticuerpos disponibles para aquellos experimentos que si lo requerían.

- Títulos

a) Titulación de la IgG purificada

Mediante esta prueba, se obtuvieron las concentraciones mínimas de IgG de perro purificada que eran capaz de reconocer los anticuerpos purificados.

Los resultados de esta titulación se han considerado muy adecuados, al reconocer los anticuerpos producidos concentraciones de IgG expresadas en nanogramos. Estos resultados sirven para confirmar la gran afinidad de los anticuerpos al reconocer cantidades mínimas de la IgG frente a las que fueron producidas. En el perro no se ha encontrado un estudio similar al descrito en este apartado, por lo que no es posible comparar resultados. Sin embargo, en el caso de vacuno, los valores de Ig reconocidos varían entre 10 ng y 50 µg, por lo que los resultados obtenidos en este caso se encontrarían en márgenes equivalentes.

Además de la especificidad comentada, estos resultados convierten a estos reactivos en excelentes medios de detección de la IgG incluso en aquellos casos en los que las concentraciones de dicha inmunoglobulina sean mínimas.

b) Titulación de los anticuerpos

Después de titular el sobrenadante, los anticuerpos purificados y los biotinados, se ha comprobado que los anticuerpos producidos se pueden usar a unas diluciones consideradas como muy elevadas. Este hecho aporta el beneficio de poder usar los anticuerpos producidos muy

diluidos, lo que reportará grandes ventajas en el uso de los mismos en inmunoensayos:

Por un lado hay que señalar la gran ventaja económica que supone el uso de los anticuerpos a grandes diluciones. Esta ventaja se refleja en un ahorro de tiempo y dinero evitando el tener que realizar continuas expansiones de los hibridomas, obtenciones de ascites, purificaciones, marcajes, etc., pudiéndole sacar un gran rendimiento a cada proceso de producción de anticuerpo purificado.

Por otro lado, y no menos importante, está el hecho de la gran ventaja que supone el uso de los anticuerpos a elevadas diluciones en inmunoensayos, ya que estos ensayos tienen la particularidad de coordinar dos factores: de una parte hay que conseguir una concentración de anticuerpo que de una reactividad positiva frente al inmunógeno deseado (en este caso IgG de perro), y por otro, conseguir que dicha concentración sea la mínima evitando así la aparición de reacciones inespecíficas tan perjudiciales en este tipo de ensayos, y que pueden llegar a enmascarar los resultados positivos.

En todos los casos se observó que existía una correspondencia entre la titulación de los sobrenadantes y la de los anticuerpos purificados: aquellos que funcionaban a mayor dilución en sobrenadante, también lo hacían con el purificado, y viceversa.

Con las concentraciones de trabajo obtenidas con los seis anticuerpos producidos a lo largo de este estudio se ha logrado recoger las ventajas antes comentadas.

- Reactividad de los anticuerpos frente a distintas Igs caninas

Las distintas subclases de inmunoglobulinas caninas (IgG, IgE, IgM e IgA) contienen algunos determinantes antigénicos comunes o muy

próximos, tal y como lo demuestra la existencia de anticuerpos monoclonales crosreactivos con más de una subclase (DeBoer et al, 1993).

En lo que se refiere al perro, los anticuerpos monoclonales obtenidos por estos autores al inmunizar con Ig purificada de un conjunto de sueros reconocen diferentes subclases de la misma. También Mazza (1993), inmunizando con fracciones sólo parcialmente purificadas de los isotipos de la IgG encuentra que sus anticuerpos reconocen al menos dos de ellos. Además, en este mismo trabajo comprueba que reactivos comerciales específicos de IgG₁ o IgG₂ caninas reconocen a los cuatro isotipos de IgG. En unas experiencias posteriores, estos autores consiguen algunos anticuerpos específicos inmunizando con fracciones purificadas de los mismos, pero aun así la mayoría de los desarrollados mostraron reacción cruzada. A la vista de estos resultados, es lógico que en este trabajo, al inmunizar con IgG purificada, algunos de los anticuerpos presenten reacción cruzada cuando se enfrentan a un panel de Igs purificadas comerciales (IgG₁, IgG₂, IgM e IgA) de laboratorios Bethyl.

Únicamente dos de los anticuerpos (**CA3H1** y **CA4F1**) fueron específicos de la IgG₂, mientras que sólo uno (**CA4E7**) reaccionó con las cuatro inmunoglobulinas testadas. Los otros tres anticuerpos variaron en la reacción con dos (**CA2E9** con IgG₂ e IgM y **CA3B8** con IgG₁ e IgG₂) o tres (**CA5B2** con IgG₁, IgG₂, e IgM) de las inmunoglobulinas.

Con estos resultados se pueden dividir los anticuerpos en dos grupos, atendiendo a su posible aplicación:

Por una lado, con los anticuerpos específicos de una o dos inmunoglobulinas se tiene unos reactivos específicos para ser usados en análisis en los que se necesite una reacción específica con una Ig en concreto. Por medio de los anticuerpos específicos de la IgG₂ se podría determinar la cantidad de este subisotipo directamente. Utilizando los anticuerpos específicos de dos Igs se pueden determinar indirectamente por sustracción la Ig que no es la IgG₂ (IgG₁ en el caso del **CA3B8** e IgM

en el caso del **CA2E9**). Los anticuerpos específicos de una subclase, como el **CA3H1** y el **CA4F1**, podrían ser de utilidad para estudios relacionados con la respuesta humoral en enfermedades caninas. Dichos anticuerpos serían fácilmente utilizables en ensayos serológicos específicos para un determinado antígeno y ayudarían en la comprensión y estudio de la respuesta inmune en la infección, alergia o autoinmunidad.

Por otra parte, y teniendo en cuenta la múltiple reactividad de los anticuerpos, se obtienen sin tener que realizar nuevas fusiones anticuerpos que reaccionan con la IgA y con la IgM, hecho que podría ser usado en diferentes estudios en los que estuviera implicada la variación de estas inmunoglobulinas, tal y como se ha hecho en este trabajo con los anticuerpos anti-IgG.

- Inmunoblotting

Mediante esta técnica se ha determinado la especificidad de cada uno de los seis anticuerpos frente a las cadenas (ligera y pesada) de la IgG.

Se ha realizado la prueba enfrentando a los anticuerpos a la IgG purificada y al suero de perro en estado fisiológico. En la reacción de los anticuerpos tal y como era lógico esperar, coincidió la reacción observada en la prueba con la IgG purificada y en el caso del suero de perro. Este hecho indica que la totalidad de los componentes del suero distintos de la IgG no interfieren en ningún momento en la reacción de los anticuerpos monoclonales anti-IgG de perro usando la técnica de inmunoblotting. Esto hace a estos anticuerpos útiles para cualquier ensayo que requiera el inmunoblotting como técnica a utilizar en técnicas *in vitro* a partir de suero de perro.

Un tratamiento especial requiere el caso del anticuerpo **CA2E9**, del cual se ha comentado anteriormente que presenta un comportamiento

en esta técnica distinto a los otros usados en este trabajo. En el caso de la reacción con la IgG purificada, el anticuerpo mostró dos bandas de pesos moleculares coincidentes con las cadenas ligeras y pesadas de la IgG canina (ver Fig. 3.1 de “Resultados”). Sin embargo, y como era de esperar, al enfrentar el **CA2E9** a suero de perro siguiendo una técnica idéntica a la empleada en el caso de la IgG purificada, se comprobó que además de las cadenas ligeras y pesadas de la IgG aparecían otras bandas accesorias de similar intensidad que las anteriores (ver Fig. 3.2 de “Resultados”). La intensidad de las bandas hizo rechazar la hipótesis de que se tratara de ruido de fondo, lo que se confirmó al observar los resultados obtenidos con el resto de los anticuerpos, en los que las bandas atribuidas a este fenómeno eran de una intensidad considerablemente menor a la mostrada por las cadenas principales. Al contrastar el peso molecular de la más intensa con un patrón de pesos moleculares estándares se comprobó que el valor obtenido coincidía con el descrito para la IgM canina, hecho este lógico porque, como se ha comprobado con el panel de inmunoglobulinas comerciales, este anticuerpo presenta reacción cruzada con la IgM en ELISA. Por tanto, se puede concluir que este anticuerpo reconoce un epítipo muy conservado en las inmunoglobulinas caninas.

El resto de los anticuerpos si se pueden clasificar según el tipo de reacción que presentan:

- Anticuerpos específicos de la cadena pesada: **CA3B8**, **CA3H1** y **CA4F1**. Al ser la cadena pesada (50kDa) específica de la IgG, se define a estos anticuerpos como específicos de esta subclase. Este hecho se verificó al comprobar que dichos anticuerpos reaccionaban únicamente contra la IgG (IgG₁ y/o IgG₂) (Tabla 3).

- Anticuerpos específicos de la cadena ligera: **CA4E7**. La cadena ligera (25 kDa) es común a todas las inmunoglobulinas, por lo que se puede concluir que este anticuerpo reacciona con todas las

inmunoglobulinas. Esta hipótesis se confirmó al comprobar que dicho anticuerpo reconoce a la IgG (IgG₁ e IgG₂), IgM e IgA (Tabla 3).

- Anticuerpos específicos de las cadenas ligera y pesada: **CA5B2**. Este anticuerpo no es específico de la IgG, lo que se pudo comprobar mediante su reacción con la IgG (IgG₁ e IgG₂) e IgM (Tabla 3). La peculiaridad de la unión de este anticuerpo se podría justificar considerando que el epítipo reconocido por el mismo está situado en las cadenas ligera y pesada de la IgG y la IgM.

Estos resultados demuestran que el panel de anticuerpos producidos se puede utilizar con dos objetivos:

1.- En el caso de requerir unos reactivos específicos, se usarían los anticuerpos específicos de la cadena pesada de la IgG.

2.- En aquellos casos en los que se necesitaran reactivos específicos de otras inmunoglobulinas (IgM o IgA), se podrían usar los anticuerpos crosreactivos con estas subclases.

- Niveles de IgG en sueros de perro

Mediante ELISA sandwich usando la pareja **CA4E7sm/CA5B2bio**, se testaron sueros de 45 perros de ambos sexos, diversas razas y diferentes edades con el fin de determinar las concentraciones de IgG + IgM del mismo.

Al coincidir gran parte de los valores obtenidos con las concentraciones fisiológicas descritas para el perro (9-18 mg/ml = 9-15 mg/ml IgG + 0,7-2,7 mg/ml IgM), se pudo concluir que dicha pareja era apta para su uso en la determinación de la concentración de IgG + IgM a partir de suero.

En el caso de los individuos que dieron concentraciones menores a las fisiológicas, este hecho se atribuyó al posible padecimiento de algún proceso subclínico que supusiera una inmunosupresión del individuo.

Con respecto a los valores obtenidos superiores al rango establecido en la bibliografía como fisiológico, hay que destacar que dicho rango se estableció como valor medio de unos resultados muy dispares, habiéndose encontrado valores en ciertas razas cercanos a los 30 mg/ml. Por lo tanto, y dada la gran variabilidad encontrada entre las distintas razas caninas, se consideran correctos los valores obtenidos con esta pareja.

- Obtención de fragmentos Fab de la IgG canina

El anticuerpo **CA4F1** (específico para IgG₂) reconoce por inmunoblotting la cadena pesada y además reacciona con el fragmento Fab, por lo que es bastante probable que reconozca la región CH₁ de la cadena pesada de la IgG, ya que en humano (Shakib, 1986), en vacuno (Williams et al, 1990) y en perro (De Boer, 1993) la mayoría de los anticuerpos anti-IgG₂ descritos reconocen este fragmento.

Para el caso del **CA3H1**, que también es específico de la cadena pesada de la IgG₂, pero no reconoce el Fab, (aunque presenta valores de absorbancia cercanos a la positividad), puede ocurrir que tenga una menor afinidad y el tratamiento con papaína altere de alguna manera el epítipo de unión, dificultando la unión del anticuerpo. También puede ocurrir que al unirse el Fab a la placa de ELISA, el epítipo reconocido por el **CA4F1** quede más expuesto y enmascare de alguna forma al específico del **CA3H1**, ya que ambos deben de estar muy cercanos, dado que se inhiben, tal y como se vio en el apartado correspondiente en "Resultados".

El anticuerpo **CA3B8** no reconoce el Fab, y probablemente reconozca la Fc, puesto que reacciona con la cadena pesada tanto de la IgG₁ como de la IgG₂ y esta región sería común a ambos.

- Tratamiento de la IgG con ácido/calor

Tras el tratamiento de la IgG canina con ácido o con calor, se comprobó que los seis anticuerpos anti-IgG de perro seguían reconociendo a la inmunoglobulina tratada.

A la vista de estos resultados se plantearon varias hipótesis que podrían ser consideradas a la hora de explicar este fenómeno:

Por un lado se podría dudar de la eficacia del tratamiento efectuado en cuanto a duración o intensidad para atacar a la inmunoglobulina, hipótesis que se rechaza según los protocolos usados anteriormente por otros autores (Halliwell et al, 1975). Otra hipótesis se basaría en el hecho de que el ELISA usado en este trabajo sea más sensible y capaz de detectar pequeñas cantidades de inmunoglobulina que hayan resistido al tratamiento, con respecto a las técnicas usadas en otros trabajos (Halliwell et al, 1993). Esto último parece improbable ya que la técnica presenta resultados variables con los distintos anticuerpos. Por último, y más probable, se podría pensar que los epítomos reconocidos por los anticuerpos son resistentes, en diferente grado, a la acción de los ácidos y de las temperaturas elevadas.

Una vez confirmados estos resultados, se puede concluir que la unión antígeno-anticuerpo entre la IgG y los seis anticuerpos anti-IgG es tan íntima que no se ve afectada por unos tratamientos tan agresivos como los efectuados a lo largo de este ensayo.

En la IgE humana se ha comprobado que los epítomos sensibles al calor y al ácido se sitúan en la fracción CH₂ (De Boer et al, 1993). Los resultados obtenidos en este trabajo indicarían que aquellos anticuerpos que reconocen la Fc lo harían en segmentos CH₃.

- Tratamiento de la IgG con m-peryodato

Tras el tratamiento de la IgG canina con m-peryodato, se comprobó que tres de los anticuerpos anti-IgG de perro seguían reconociendo a la inmunoglobulina tratada, mientras que los otros tres se veían afectados en parte por el tratamiento.

Con estos resultados se deduce que los epítomos reconocidos por los anticuerpos producidos en este trabajo no contienen, o sólo contienen en parte en su composición hidratos de carbono.

El papel de los hidratos de carbono no está claro en la IgG (Tizard, 1989). Parece ligado al catabolismo y a ciertas funciones de la inmunoglobulina. Se ha comprobado en algunos estudios que ciertas IgGs deglicosiladas pierden o disminuyen su capacidad para unirse a sus receptores celulares.

- Reactividad con distintos tipos celulares: Citometría de flujo

Mediante esta prueba, se comprobó que los resultados obtenidos al enfrentar los seis anticuerpo monoclonales anti-IgG de perro a distintos tipos celulares (células de bazo, ganglio, timo, tonsilas y PBL) se obtenían resultados muy bajos en todos los casos.

Estos resultados coinciden totalmente con los únicos relacionados con el tema encontrados en la bibliografía, en los que se lleva a cabo esta misma experiencia con células de órganos de trucha enfrentándolos a anticuerpos monoclonales anti-Ig de esta especie (Sánchez et al, 1993).

Con estos resultados, se puede afirmar que las IgG expresada en superficie por ciertas células de la estirpe linfoide no es reconocida apreciablemente por los anticuerpos monoclonales anti-IgG de perro producidos y caracterizados en este trabajo.

- Reactividad de los anticuerpos frente a sueros de distintas especies

Mediante esta prueba, y enfrentando los seis anticuerpos a sueros de distintas especies (caballo, cabra, cerdo, conejo, gato, hámster, hombre, oveja, perro, rata, ratón y vaca), se comprobó el grado de conservación del epítipo reconocido entre las distintas especies.

Se ha descrito que ciertos anticuerpos monoclonales reconocen otras especies, además de aquella frente a la que fueron producidos. Esta característica ha sido aprovechada por algunos autores para proponer el uso de anticuerpos contra Igs de una especie para su empleo en otras. Así, anticuerpos monoclonales específicos de inmunoglobulinas bovinas se han estudiado para su uso con Igs de otras especies (Henning & Nielsen, 1992), anticuerpos específicos de IgE canina que reaccionan con una proteína del suero de gato descrita como posible IgE (DeBoer et al, 1992); un anticuerpo policlonal específico de IgG canina que reconocía dicha inmunoglobulina en el zorro rojo (Buxton et al, 1997); y anticuerpos específicos de peces de colores que reaccionan con carpa (Siwicki et al, 1994).

Dada la escasa reactividad cruzada de cuatro de los anticuerpos (exceptuando el **CA2E9** y el **CA4F1**), se puede decir que los anticuerpos producidos son bastante específicos de la especie canina.

Puntualizando los resultados, y teniendo en cuenta el caso particular del anticuerpo **CA2E9**, se comprobó que reaccionaba frente a sueros de ocho de las especies testadas (cabra, cerdo, conejo, gato, hámster, hombre, oveja, perro, rata). Con estos resultados se confirma la característica del **CA2E9** definida anteriormente en el apartado de "Inmunoblotting": se trata de un anticuerpo que reconoce un epítipo muy conservado. Según se definió anteriormente, el epítipo reconocido por este anticuerpo estaba presente en las distintas inmunoglobulinas, y

según se comprueba con este experimento, está igualmente muy conservado dicho epítopo entre especies.

Revisando los resultados obtenidos con el resto de los anticuerpos se comprobó que el **CA3B8** y el **CA5B2** son específicos exclusivamente del perro, frente a los sueros de las especies testadas, consideradas de las más comunes en veterinaria en nuestro país.

Y entre estos estados contrapuestos, se encuentran los otros tres anticuerpos, que a parte de su positividad frente al suero de perro reaccionan con: el **CA3H1** que dio positivo con el suero de conejo; el **CA4E7**, que reacciona con el suero de oveja; y el **CA4F1**, que reacciona con los sueros de cabra, conejo, hombre y oveja. Estos resultados distintos para el **CA3H1** y para el **CA4F1** podrían confirmar la hipótesis expuesta en este trabajo de que, si bien reconocen epítopos muy cercanos porque se inhiben entre sí, son diferentes ya que uno está presente en mayor número de especies que el otro.

Como conclusión de estos resultados, se puede definir dos tipos de anticuerpos de acuerdo a la reactividad mostrada en esta prueba:

Por un lado están aquellos anticuerpos específicos del suero de perro. Esta especificidad podría ser de utilidad en aquellos ensayos en los que se requiera una especificidad total, sin que exista la posibilidad de la reactividad entre especies.

De otra parte, están los anticuerpos que reaccionan con alguna otra especie. Esta reactividad, en contraposición a lo expuesto en el párrafo anterior, puede ser de inestimable utilidad, al igual que en el caso de la reactividad con las otras Igs distintas de la IgG. En este caso, y sin necesidad de recurrir a nuevos procesos de producción (con el coste y trabajo que ello supone) se ofrecen unos reactivos que reaccionan con distintas especies. Estos anticuerpos serían de utilidad en el estudio estados inmunológicos específicos de distintas especies. Dado todo esto, y dada la escasez de productos de este tipo en el mercado actual, se

considera de gran importancia la utilidad de los anticuerpos desarrollados en este trabajo en el futuro estudio de la inmunología veterinaria.

- Inmunohistoquímica

Mediante esta técnica, se probó la reactividad de los anticuerpos monoclonales anti-IgG de perro frente a cortes histológicos de diversos órganos de perro (ganglio, bazo, médula ósea, tonsilas y placas de Peyer). Con los resultados obtenidos en esta técnica se determinaron cuales de los anticuerpos se podían usar en esta técnica y cuales no eran recomendables.

En los casos en los que se observó reacción con esta técnica, los resultados se correspondieron con tinciones del citoplasma de las células plasmáticas, resultado totalmente lógicos al tratarse estas de las células productoras de inmunoglobulinas. Así mismo también se dio cierta reacción en el interior de algunos macrófagos y en el plasma observado en el interior de algunos vasos sanguíneos.

Nuevamente en los resultados obtenidos en este experimento hay que hacer mención especial al caso del anticuerpo **CA2E9**. Al realizar la prueba descrita en “Materiales y Métodos”, se comprobó que los cortes que se habían probado con este anticuerpo, todos ellos dieron unos resultados con mucho ruido de fondo. Fue tanta esta reacción indeseable, que no se pudo determinar en ninguno de los casos si el resultado de la prueba había sido positivo o negativo. En una primera prueba, habiéndose llevado a cabo con sobrenadante del anticuerpo, se pensó que la reacción inespecífica de los cortes podía ser atribuida a la falta de pureza de dicho sobrenadante. Dicha hipótesis fue descartada inmediatamente al obtenerse los mismos resultados realizando la prueba con el anticuerpo purificado. Así pues, y dados los resultados obtenidos

con este anticuerpo en pruebas anteriores, se pensó que todo era producto de las características de reactividad cruzada del anticuerpo. Por todo esto, se retiró este anticuerpo del panel de los utilizados para los estudios inmunohistoquímicos.

Con respecto al resto de los anticuerpos probados en esta técnica, se comprobó que los mejores resultados eran los obtenidos con el anticuerpo **CA3H1**, siendo también bastante aceptables los obtenidos con el **CA4E7** y **CA4F1**. Los anticuerpos **CA3B8** y **CA5B2** también dieron resultados positivos en esta técnica, pero menos intenso que los anteriores.

Con los resultados obtenidos en esta prueba, a parte de contribuir a la caracterización de los anticuerpos producidos, se procedió a elegir aquellos anticuerpos más adecuados para ser aplicados en técnicas diagnósticas basadas en la inmunohistoquímica, tal y como se comentará más adelante.

- ELISA de competición: ensayos de inhibición

Mediante el ELISA de competición se determinó si los anticuerpos producidos reconocían los mismos o distintos epítomos de la IgG canina. Para la realización de esta prueba se enfrentaron los anticuerpos marcados a los anticuerpos sin marcar. Ya que el anticuerpo **CA3B8** no se pudo marcar, tal y como se comentó anteriormente, no se incluyó en el panel de los anticuerpos marcados, aunque si estuvo presente entre los anticuerpos sin marcar.

De los resultados obtenidos con el resto de los anticuerpos abría que señalar diversos puntos:

El **CA2E9** fue el único de los anticuerpos que presentó inhibición al ser utilizado como pareja con todos los demás. Con más exactitud, y teniendo en cuenta los resultados obtenidos con este anticuerpo a lo largo

de todos los estudios realizados anteriormente, se podría decir que el epítipo reconocido por el mismo está repetido, debiendo ser por tanto de pequeño tamaño, y debiendo estar presente en un gran número de inmunoglobulinas, especies y estructuras celulares, por lo que no se puede usar en inmunohistoquímica dada la cantidad de interferencias que provoca. Igualmente, se podría aceptar la hipótesis del impedimento estérico, por el cual la unión del anticuerpo a su epítipo correspondiente impidiera la unión de los otros anticuerpos al suyo. Dadas las características del anticuerpo, definidas a lo largo de todos los estudios realizados parece la primera de las hipótesis expuestas la más acertada. La característica de este anticuerpo definida en este ensayo hacen que no pueda ser usado como pareja en los ELISAs sandwich, ya que, como se verá más adelante, la característica principal de este tipo de ensayo es el que la pareja de anticuerpos (anticuerpo sin marcar/anticuerpo marcado) reconozcan distintos epítipos.

El **CA4E7** presentó inhibición únicamente con el **CA2E9**, por lo que este anticuerpo sería idóneo para su uso en ELISA sandwich enfrentándolo al resto de los anticuerpos.

El **CA5B2** no presentó inhibición al enfrentarse al resto de los anticuerpos, con lo que se puede concluir que reconocen epítipos totalmente diferente al reconocido por el resto. Esta característica lo convierte en un elemento ideal a la hora de usarlo como miembro de las parejas de los ELISAs sandwich.

Con respecto a los restantes anticuerpos, dos de ellos: **CA3H1** y **CA4F1**, presentan el mismo tipo de reacción frente al resto de los anticuerpos, lo que indicaría que reconocen epítipos solapantes o bien el mismo epítipo con distinta afinidad. Lo primero parece más probable ya que la cantidad de **CA4F1** no marcado que se requiere para producir un 50% de inhibición es menor cuando se enfrenta a sí mismo que cuando se enfrenta al **CA3H1**. Además, ambos son específicos de la IgG₂.

Y finalmente, el único anticuerpo que queda por clasificar es el **CA3B8**, que pese a no poder usarse biotinado, siempre intervino en las parejas como el componente sin marcar. Así pues, los resultados en este caso se refieren a los obtenidos de enfrentar el **CA3B8** sin marcar al resto de los anticuerpos biotinados. Este anticuerpo presentó un patrón de reacción muy similar al **CA5B2**, con la única diferencia de que en este caso, al enfrentarlo al **CA2E9** si se daba inhibición entre ambos, por lo que se concluye que reconoce un epítipo distinto a los reconocidos por el resto de los anticuerpos, exceptuando al **CA2E9**. Las características presentadas por este anticuerpo lo hacen adecuado para su uso en ELISA sandwich enfrentado al resto de los anticuerpos (exceptuando al **CA2E9**), pero siempre actuando como anticuerpo de captura.

APLICACIONES DE LOS ANTICUERPOS MONOCLONALES ANTI-IgG DE PERRO

- Cuantificación de la IgG + IgM en suero: ELISA sandwich

Una de las aplicaciones de los anticuerpos obtenidos en este estudio es la determinación de los niveles de IgG + IgM en suero de perro. Para ello se eligió, después de probar varias posibilidades, la pareja formada por el anticuerpo **CA4E7** sin marcar y el **CA5B2** biotinado.

Una vez estandarizados los resultados obtenidos por el uso de esta pareja, se propuso como reactivo a usar en ensayos clínicos y experimentales en los cuales se requiera la determinación de los niveles de IgG + IgM, pensando que podría ser de utilidad para medir dichos niveles en otros fluidos corporales distintos del suero, tal y como han hecho otros autores en lágrimas (Ginel et al, 1993a; German et al, 1998), médula ósea (Heddle & Rowley, 1975), heces (Reynolds & Johnson, 1970),

saliva (Heddle & Rowley, 1975; German et al, 1998), bilis (German et al, 1998), leche y calostro (Heddle & Rowley, 1975).

Las concentraciones determinadas por esta pareja se han considerado como adecuadas, no considerando como negativa la variabilidad encontrada en los valores obtenidos al haberse encontrado en la bibliografía datos enormemente diversos en cuanto a las concentraciones estándares en los sueros caninos. Esta variabilidad se ha atribuido a la gran cantidad de razas que presenta la especie canina.

En cuanto a la pareja **CA3B8sm/CA4E7bio**, se ha optado por no usarla dada la variabilidad interensayo encontrada en su uso. A pesar de esta variabilidad, los resultados obtenidos en algunas de las ocasiones si pareció que se ajustaban a los esperados, por lo que se dio tratamiento aparte a esta pareja, proponiendo un posterior estudio más detallado para poder estandarizarla para su uso en la determinación de IgG canina.

Con respecto a las siete parejas restantes, los resultados tan dispares encontrados con respecto a los esperados, coincidieron con algunos de los encontrados en la bibliografía (DeBoer et al, 1993), en los cuales las parejas elegidas no recogieron del suero la cantidad de Ig esperada.

- Reactividad de los anticuerpos monoclonales anti-IgG canina y de la IgG-anti leishmania con cortes de bazo de perro con leishmaniosis

Con el aislamiento de la IgG a partir de suero de perro afectado de leishmaniosis, y usando el **CA3H1** como anticuerpo anti-IgG canina, se ha puesto a punto una técnica de diagnóstico de esta enfermedad de gran valor para las clínicas de pequeños animales.

En ensayos previos a este experimento se intentó usar el anticuerpo monoclonal anti-IgG de perro marcado, para evitar así tener que realizar un paso más con el uso del anticuerpo anti-ratón marcado.

Dichos anticuerpos marcados, pese a funcionar correctamente en ELISA, no desarrollaron la reacción esperada en inmunohistoquímica. Este hecho se pudo explicar de dos maneras:

- La inmunohistoquímica es una técnica de mucha menor sensibilidad con respecto al ELISA, por lo que aquellos reactivos usados en la segunda no tienen por qué funcionar en la primera. Aquellos anticuerpos que funcionan en ambas técnicas, lo hacen a una dilución mucho mayor para el ELISA que para la inmunohistoquímica.

- El método de marcaje desarrollado con estos anticuerpos no resultó afín con el método de conjugación y revelado de la inmunohistoquímica.

Pese a no poder usarse en este ensayo los anticuerpos marcados, al desarrollarse la reacción adecuadamente usando el anticuerpo anti-ratón marcado, no se consideró este hecho como negativo para el buen desarrollo de la prueba. Todo esto, unido a que el paso adicional por el uso del anticuerpo anti-ratón sólo incrementan el desarrollo de la prueba en 30 minutos, y a que la disponibilidad del anti-ratón no presenta problemas, y dados los buenos resultados obtenidos en la prueba, hizo considerar el problema del anticuerpo marcado como poco relevante.

El gran valor de esta técnica desarrollada se ha puesto de manifiesto en los siguientes aspectos:

Se trata la leishmaniosis de una enfermedad de gran prevalencia en España, cuyo diagnóstico en la mayoría de las ocasiones se basa en un conjunto de síntomas un tanto inespecíficos. Este hecho hace que en muchos casos no se diagnostique adecuadamente la enfermedad, con los consiguientes efectos negativos sobre la salud del animal que supone el no haber diagnosticado la enfermedad a tiempo. O lo que es más negativo, se puede dar el caso de que, equivocando el diagnóstico, el clínico recete un tratamiento equivocado que en ocasiones únicamente sirve para precipitar el desarrollo fatal de la enfermedad.

En los casos en los que se ha intentado el diagnóstico mediante inmunohistoquímica (con anticuerpos policlonales o no específicos de perro), se ha encontrado en los resultados un ruido de fondo tal que en muchas ocasiones ha impedido un diagnóstico adecuado, o ha hecho que este sea dudoso. Por tanto, y dada la reacción del anticuerpo desarrollado en este trabajo y aplicado en este método diagnóstico propuesto, se define el **CA3H1** como un excelente reactivo para el diagnóstico de la leishmaniosis. Estas cualidades se pueden resumir en la especificidad del anticuerpo, observándose la ausencia de ruido de fondo que pudiera enmascarar los resultados, con lo que se descarta la posibilidad de la presentación de problemas a la hora de llevar a cabo un diagnóstico adecuado.

Por lo tanto, y a la vista de los resultados obtenidos en este trabajo, se propone este método como un método rápido y que carece de grandes dificultades, pudiéndose poner a punto en cualquier laboratorio de inmunoanálisis.

- Aplicación del anticuerpo monoclonal CA4E7 en el diagnóstico de enfermedades autoinmunes mediante inmunohistoquímica

En este caso, y al igual que en el anterior, se propone un método de gran valor para el diagnóstico de enfermedades autoinmunes, como es el caso del pénfigo.

En este caso, tras una simple biopsia de piel, y mediante el uso del anticuerpo monoclonal **CA4E7**, se ha conseguido poner a punto un método diagnóstico eficaz para esta enfermedad.

Se da en este caso, al igual que en el caso anterior, la ausencia de reactivos eficaces para el diagnóstico de esta enfermedad, cuya sintomatología la ha hecho confundir en varias ocasiones con otras patologías distintas.

En el caso de esta enfermedad se ha estado diagnosticando en diversos laboratorios según el método propuesto en este trabajo. El problema presentado hasta ahora era el hecho de que el anticuerpo usado, al ser un policlonal producía una reacción un tanto inespecífica que hacía difícil determinar si la reacción era positiva o no.

Con el uso del anticuerpo **CA4E7** desarrollado en este trabajo, se superan las dificultades encontradas hasta ahora, y permite desarrollar un método de diagnóstico en el cual se presentan los cortes del individuo enfermo con la reacción específica teñida que permite unos resultados eficaces y sin dudas.

- Determinación del anticuerpo monoclonal CA3H1 mediante un sistema inmunosensible de filtración/disolución continuo

Mediante este método desarrollado en el departamento de Química Analítica de la Universidad de Córdoba se amplía el campo de aplicación de los anticuerpos desarrollados en este trabajo.

Esta aplicación demuestra que los anticuerpos producidos son reactivos de gran valor y de gran aplicación en todo tipo de inmunoensayos en los que esté implicada una reacción antígeno-anticuerpo.

Se propone el futuro uso de los anticuerpos producidos en diferente tipo de inmunoensayos.

- Uso de los anticuerpos biotinados como secundarios en ELISAs indirectos

El test ELISA (Engvall & Ruoslahti, 1979) se ha convertido en los últimos tiempos en un inmunoensayo ampliamente extendido para la detección de anticuerpos. Tiene la ventaja de que se puede automatizar y

usar para testar gran número de muestras. Así mismo, puede ser usado cuantitativamente para estimar la cantidad de anticuerpo contenido en una muestra dada (Griffin y Buchan, 1989).

Una vez comprobados los buenos resultados de los anticuerpos marcados en ELISA indirecto, y dada la sencillez, rapidez y eficacia del método, se ha propuesto su uso para el diagnóstico de determinadas enfermedades.

Además, se ha comprobado la eliminación de ruidos de fondo en ELISA indirecto introduciendo anticuerpos monoclonales específicos de la especie a estudiar como secundario (Juntti et al, 1987). Este hecho es de gran importancia, sobre todo en aquellos casos en los que es necesaria gran precisión a la hora de discriminar entre resultados positivos y negativos.

Se consideran a estos anticuerpos como herramientas de gran valor en estos ensayos, pues tras la purificación de las IgGs específica de los estados patológicos elegidos, se desarrollarían los kits diagnósticos para el diagnóstico rápido de cada una de las enfermedades.

CONCLUSIONES

- Se ha conseguido aislar la inmunoglobulina G + M de perro a partir de suero de animales sanos o enfermos. Una vez aislada la proteína y confirmada la eficacia de la purificación, se propone este método como el adecuado para aislar las inmunoglobulinas de distintas especies animales. Se considera de gran interés este aspecto, dada la escasez de este tipo de reactivos en el mercado y dada la importancia de los estudios inmunológicos en las especies de interés veterinario.

- A partir de la IgG comercial, se ha producido, y posteriormente caracterizado, un panel de seis anticuerpos frente a dicha inmunoglobulina.

- Dada la crosreactividad de dichos anticuerpos frente a otras inmunoglobulinas y frente a otras especies, se han obtenido sin necesidad de coste y trabajo adicional unos reactivos a usar en estudios que impliquen dichas inmunoglobulinas en dichas especies.

- Como resultado final de este trabajo, y tras la completa caracterización de los anticuerpos obtenidos, se han propuesto diversos métodos diagnósticos de gran interés para los diagnósticos clínicos y experimentales en inmunología canina directamente, y por extrapolación, en inmunología veterinaria en general.

- Se deja abierta la posibilidad del desarrollo de nuevos métodos diagnósticos empleando los reactivos producidos en este trabajo.

APÉNDICE

1.- TAMPONES Y SOLUCIONES

1.- Uso general

1.- PBS/PBST

8,1 mM NaHPO₄, 1,5 mM KH₂PO₄, 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, pH 7.4/ Tween-20 0,1%.

2.- Solución eosina

0,25% eosina, 0,02% NaN₃ en PBS.

3.- Salina

0,45% NaCl en agua destilada.

4.- Solución Ficoll-Amidotrizoato

8% Ficoll 400 (Pharmacia) en agua destilada al que se añade amidotrizoato sódico al 76% (Schering) hasta alcanzar una densidad de 1,080 g/L.

5.- Solución de bloqueo

Leche desnatada en polvo 5% en PBS o BSA (Boehringer Mannheim) 2% en PBST.

2.- Immunoblotting

1.- Solución cloronaftol

66 µg de cloronaftol en 10 ml de metanol + 120 µl de H₂O₂ en 100 ml de PBS.

3.- Inmunoensayos (ELISA)

1.- Tampón Carbonato/Bicarbonato

0,2 M, pH 9.5.

2.- Solución reveladora de ELISA

0,5 M ácido cítrico pH 4.0 + 1/100 (v/v) 2% ABTS (sal diamónica 2-2'-Azino-di-[3-etilenbenziazolina sulfonato (6)]) (Boehringer Mannheim) + 0,03% H₂O₂.

3.- Solución de inhibición de la reacción de revelado de ELISA

0,5 N Fluoruro Sódico.

4.- Obtención de fragmentos Fab

1.- Tampón Fosfato 10X. pH 7.3

77% Fosfato HNa₂PO₄ 0,5 M + 33% Fosfato H₂NaPO₄ 0,5 M.

2.- EDTA

0,02 M en buffer 1X.

3.- Cisteína

0,1 M en buffer 1X. Preparar en el momento de usar.

4.- Papaína

A partir de una suspensión comercial de 100 mg/10 ml.

5.- I-acetamida

0,15 M en buffer 1X.

5.- Citometría de Flujo

1.- Solución de lavado FCM

1% BSA, 0,2% NaN₃ en PBS.

2.- Solución fijadora FCM

1% paraformaldehido en solución de lavado FCM.

6.- Electroforesis y electrotransferencia

1.- Solución 1 (stock de monómeros)

29,2% acrilamida, 0,8% de bis-acrilamida en agua destilada.

2.- Tampón 2 de electroforesis

1,5 M Tris-HCl, pH 8.8.

3.- Tampón 3 de electroforesis

0,5 M Tris-HCl, pH 6.8.

4.- Solución 4 SDS

10 % SDS en agua destilada.

5.- Solución APS

10% APS.

6.- Tampón puente electroforesis

0,025 M Tris-HCl, 0,192 M Glicina, 0,1% SDS en agua destilada.

7.- Solución negro-amido

0,1% negro-amido 10-B, 45% metanol, 10% ácido acético en agua destilada.

8.- Tampón de tratamiento de muestras

0,125 M Tris-HCl, 4% SDS, 20% glicerol, (10% 2-mercaptoetanol), 0.1% Brilliant blue, pH 6.8.

9.- Tampón de transferencia

25 mM Tris, 192 mM Glicina, 20% metanol en agua destilada. pH 9.2.

7.- Tinción/Destinción de geles de poliacrilamida

1.- Solución de tinción

0,125% Coomassie Blue R-250, 50% metanol, 10% ácido acético en agua destilada.

2.- Solución de destinción

50% metanol, 10% ácido acético en agua destilada.

2.- MEDIOS DE CULTIVO

1.- Medio HY

13,3% Medio HY (Sigma), 3,5% NaHCO₃ en agua destilada, pH 7.3

2.- Medio HY suplementado

0,1 mM hipoxantina, 0,016 mM timidina, 2500 U/L penicilina, 2,5 mg/l streptomycin, 10% suero fetal de ternera (FCS) en medio HY.

3.- Medio selectivo HAT

0,1 mM hipoxantina, 0,016 mM timidina, 0,4 µM Aminopterina, en medio HY.

4.- Medio de congelación

45 ml de FCS, previamente inactivado durante una hora a 56°C, 5 ml de dimetil-sulfoxido (DMSO).

3.-PROCEDIMIENTOS BÁSICOS

1.- Congelación de células

Las células o líneas, previamente cultivadas en fase semilogarítmica en botellas de cultivo de 75 ml, se transfieren a tubos de centrifuga de 50 ml. Las células son centrifugadas 5 minutos a 1500 rpm a temperatura ambiente, conservándose el pellet celular hasta alcanzar una concentración aproximada de 2×10^6 células/ml y se resuspende. Finalmente, se transfiere 1 ml de esta suspensión por criovial, se cierran y se introducen en una caja de congelación a -80°C toda la noche y posteriormente se transfieren a nitrógeno líquido.

2.- Descongelación de células

El criovial, que contiene las células se introduce en baño a 37°C, agitando suavemente hasta que las células se han descongelado. Una vez abierto el criovial y resuspendidas las células, se transfieren a un tubo estéril de 10 ml. Se añaden unos 8 ml de medio de cultivo sin suplementar y se centrifuga 5 minutos a 1500 rpm. Finalmente, las células son resuspendidas a la concentración deseada y transferidas a una botella o placa de cultivo.

3.- Preparación de geles de poliacrilamida

Los cristales, previamente limpiados con etanol, se montaron con los espaciadores y, antes de colocarlos en el porta geles, se rellenaron los huecos de los bordes inferiores con grasa selladora. La formación del gradiente de concentración se realizó mediante una bomba peristáltica y el formador de gradientes. En cada vaso de éste se vertieron las dos soluciones (Tabla 3.1) para formar un gel de 15% a 5% de poliacrilamida. Una vez polimerizado el gel separador (1-2 horas), se preparó el gel de concentración con las soluciones de la tabla 2. Inmediatamente después se colocó encima el peine para formar los pocillos y se dejó polimerizar unos 20 minutos.

15%	Soluciones	5%
3,04 ml.	Agua	7,3 ml.
6,4 ml.	Solución 1	2,13 ml
3,2 ml.	Solución 2	3,2 ml
130 µl.	SDS 10%	0,125 ml.
80-100µl.	APS 10%	80-100µl
8-10 µl.	TEMED	8-10 µl.

Tabla 3.1. Cantidades de las soluciones empleadas en la preparación del gel separador

Soluciones	1 Gel	2 Geles
Agua	7 ml	14 ml
Solución 1	1,5 ml	3,05 ml
Solución 3	2,87 ml	5,74 ml
SDS 10%	0,12 ml	0,23 ml
APS	100 µl	200 µl
TEMED	10 µl	20 µl

Tabla 3.2. Cantidades empleadas en la preparación del gel (es) superior (es)

4.-Inmunoprecipitación con mini-geles

Los cristales, previamente limpiados con etanol, se montaron con los espaciadores y se colocaron en el porta geles. En un vaso de precipitado se preparó la solución del gel separador (Tabla 4.1) y se añadió cuidadosamente sobre el soporte. Una vez polimerizado el gel (1 hora aproximadamente), se preparó el gel de concentración con las soluciones de la tabla 4.2. Inmediatamente después se colocó encima el peine para formar los pocillos y se dejó polimerizar unos 20 minutos.

Soluciones	
Agua	8 ml.
Solución 1	6,66 ml
Solución 2	5 ml
SDS 10%	200 µl.
APS 10%	100µl
TEMED	10 µl.

Tabla 4.1. Cantidades de las soluciones empleadas en la preparación del gel separador

Soluciones	
Agua	6 ml
Solución 1	1,34 ml
Solución 3	2,5 ml
SDS 10%	100 µl
APS	120 µl
TEMED	12 µl

Tabla 4.2. Cantidades empleadas en la preparación del gel concentrador

5.- Cuantificación de proteínas

La concentración de proteínas de cada anticuerpo purificado o purificado y marcado, fue determinada mediante un kit de calibrado Bio-Rad.

Para realizar la recta de calibrado se preparó una serie de muestras de concentraciones conocidas para luego determinar su absorbancia en tubos de cristal perfectamente limpios y secos para evitar las interferencias de otras posibles proteínas pegadas a las paredes.

Se preparó el Blanco a partir del patrón incluido en el kit, según las condiciones especificadas por el fabricante.

Con los valores de absorbancia obtenidos (leídos a longitud de onda de 595 nm) se elaboró una recta enfrentándolos a los valores de cada concentración.

BIBLIOGRAFÍA

Aalberse, R.C., Van der Gaag, R., Van Leeuwen, J. “*Serological aspects of IgG4 antibodies.1. Prolonged immunization results in an IgG4-restricted response*”. **Journal of Immunology**. 1983. 130, 722-728.

Abranches, P., Silva-Pereira, M.C., Conceicao-Silva, F.M., Santos-Gómez, G.M., Janz, J.G. “*Canine leishmaniasis: Pathological and ecological factors influencing transmission of infection*”. **Journal of Parasitology**. 1991. 77, 557-561.

Adler, S. “*Canine visceral leishmaniasis with special reference to its relationship to human visceral leishmaniasis*”. **3º Congress International de Pathologie Compareé. Section Medicine Humaine, Eleftheroudakis Co. Athens**. pp. 1-10.

Aggarwal, N. & Holmes, M.A. “*Production and characterisation of two monoclonal antibodies recognising equine IgG Fc receptors*”. **Veterinary Immunology and Immunopathology**. 2000. 73, 63-71.

Allen, P.Z. & Dalton, E.J. “*Studies on equine immunoglobulin*” **Immunology**. 1975. 18, 178-195.

Azwai, S.M., Carter, S.D., Woldehiwet, Z. “*Monoclonal antibodies against camel (*Camelus dromedarius*) IgG, IgM and light chains*”. **Veterinary Immunology and Immunopathology**. 1995. 45(1-2), 175-184.

Badaro, R., Reed, S.G., Barral, A., Orge, G., Jones, T.C. "Evaluation of the micro enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for antibodies in American visceral leishmaniasis: antigen selection for detection of infection-specific responses". **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**. 1986. 35, 72-78.

Barret, D.J. & Ayoub, E.M. "IgG₂ subclass restriction of antibody to pneumococcal polysaccharides". **Clinical and Experimental Immunology**. 1986. 63, 127-134.

Baniyash, M. & Eshhar, Z. "Inhibition of IgE binding to mast cells and basophils by monoclonal antibodies to murine IgE". **European Journal of Immunology**. 1984. 14, 799-807.

Barret, D.J. & Ayoub, E.M. "IgG₂ subclass restriction of antibody to pneumococcal polysaccharides". **Clinical and Experimental Immunology**. 1986. 63, 127-134.

Beck, O.E. "Distribution of virus antibody activity among human IgG subclasses". **Clinical and Experimental Immunology**. 1981. 43, 626-630.

Beh, K.J. "Production and characterization of monoclonal antibodies specific for sheep subclasses IgG₁ and IgG₂". **Veterinary Immunology and Immunopathology**. 1987. 14, 187-196.

Beh, K.J. "Monoclonal antibodies against sheep immunoglobulins light chain, IgM and IgA". **Veterinary Immunology and Immunopathology**. 1988. 18, 19-27.

Besser, T.E., Gay, C.C., McGuire, T.C., Evermann, J.F. "Passive immunity to bovine rotavirus infection associated with transfer of serum antibody into the intestinal lumen. **Journal of Virology**. 1988. 62, 2238-2243.

Bettini, S. & Gradoni, L. "Canine leishmaniasis in the Mediterranean area and its implication for human leishmaniasis". **Insective Science Applications**. 1986. 7, 241-245.

Bianchi, A.T.J., Moonen-Leusen, P.J., Van der Heijden, P.J., Bokhout, B.A. "The use of a double antibody sandwich ELISA and monoclonal antibodies for the assessment of porcine IgM, IgG and IgA concentrations". **Veterinary Immunology and Immunopathology**. 1995. 44, 309-317.

Bichsel, P., Vandavelde, M., Vandavelde, G., Affolter, U. "Immunoelectrophoretic determination of albumin and IgG in serum and cerebrospinal fluid in dogs with neurological diseases". **Research in Veterinary Science**. 1984. 37, 101-107.

Bigler, B., De Weck, A.L., Stadler, B.M., Frick, O.L., De Boer, D.J., Derer, M. **Proceedings of the 10th European Society of Veterinary Dermatology Annual Congress**, Aalboorg. 1993. p73.

Bird, P., Lowe, J., Stokes, R.P., Bird, A.G., Ling, N.R., Jefferis, R. "The separation of human serum IgG into subclass fractions by immunoaffinity chromatography and assessment of specific antibody activity". **Journal of Immunological Methods**. 1984. 71, 97-103.

Bird, P., Jones, P., Allen, D., Donachie, W., Huntley, J., McConnell, I., Hopkins, J. "Analysis of the expression and secretion of isotypes of sheep B

cell immunoglobulins with a panel of isotype-specific monoclonal antibodies".
Research of Veterinary Science. 1995. 59(3), 189-194.

Bond, R., Thorogood, S.C., Lloyd, D.H. "Evaluation of two enzyme-linked immunosorbent assays for the diagnosis of canine atopy". **Veterinary Record.** 1994. 135, 130-133.

Butler, J.E., "Bovine immunoglobulins: An augmented review".
Veterinary Immunology and Immunopathology. 1983. 4, 43-67.

Butler, J.E., "Biochemistry and biology of ruminant immunoglobulins".
In: R. Pandly (Editor). Progress in Veterinary Microbiology and Immunology. Karger, Basel, 1986. Vol. 2. 1-53.

Buxton, D., Maley, S.W., Pastoret, P.P., Brochier, B., Innes, E.A.
"Examination of red foxes (*Vulpes vulpes*) from Belgium for antibody to *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii*". **Veterinary Record.** 1997. 141, 308-309.

Caprio, R.E., Furth, K., Rosner, I. "Predictive value of serum IgE on the correlation of RAST and intradermal testing in an atopic population".
Immunology and Allergy Practice. 1983. 5, 13-21.

Catty, D. (Ed). "Antibodies. Vol. I. A practical approach". **IRL PRESS. Oxford. Washington D.C.** 1988.

Chandler, H.M., Coulter, A.R., Healey, K., Kornitschuk, M., MacGregor, A., Hurrell, J.G.R. "Monoclonal hybridoma antibodies against human IgE and their use in a rapid and sensitive enzyme immunoassay for the

semiquantitative assesment for total IgE levels in human blood. **International Archives of Allergy Applied Immunology**. 1983. 72, 267-272.

Chin, J.C., Scully, C., Pang, B. "Monoclonal antibodies against ovine IgA purified from lung lavage fluid". **Research of Veterinary Science**. 1986. 41, 102-110.

Cobbold, S., Holmes, M., Willett, B. "The immunology of companion animals: reagents and therapeutic strategies with potential veterinary and human clinical applications". **Immunology Today**. 1994. (15). 8, 347-352.

Codner, E.C. & Lessard, P. "Comparison of intradermal allergy test and enzyme-linked immunosorbent assay in dogs with allergic skin disease". **JAVMA**. 1993. 202 (5), 739-743.

Conrad, D.H., Studer, E., Gervasofil, J., Mohanakumar, T. "Properties of two monoclonals antibodies directed against the Fc and Fab' regions of rat IgE". **International Archives of Allergy Applied Immunology**. 1983. 70, 352-360.

Dafa'alla, T.H., Ghalib, H.W., Abdelmageed, A., Williams, J.F. "The profile of IgG and IgG subclasses of onchocerciasis patients". **Clinical and Experimental Immunology**. 1992. 88, 258-263.

Day, M.J. "Immunopathology of anal furunculosis in the dogs". **Journal of Small Animal Practice**. 1993. 34, 381-389.

Day, M.J. & Penhale, W.J. "Immunodiagnogsis of autoimmune skin disease in the dog, cat and horse". **Australian Veterinary Journal**. 1986. 63, 65-71.

Day, M.J. & Penhale, W.J. "Serum immunoglobulin A concentration in normal and diseased dogs". **Research in Veterinary Science**. 1988. 45, 360-363.

De Boer, D.J., Saban, R., Schultz, K.T., Bjorling, D.E. "Feline immunoglobulin E: preliminary evidence of its existence and crossreactivity with canine IgE. In: **P.J. Ihrke and S.E. White (Editors), Advances in Veterinary Dermatology**, Vol. 2. 1992.

De Boer, D.J., Ewing, K.M., Schultz, K.T. "Production and characterization of mouse monoclonal antibodies directed against canine IgE and IgG". **Veterinary Immunology and Immunopathology**. 1993. 37, 183-199.

Deplazes, P., Smith, N.C., Arnold, P. "Specific IgG1 and IgG2 antibody responses of dogs to *Leishmania infantum* and other parasites". **Parasite Immunology**. 1995. 17, 451-458.

Dhandayuthapani, S., Izumi, S., Anandan, D., Bhatia, V.N. "Specificity of IgG subclass antibodies in different clinical manifestations of leprosy". **Clinical and Experimental Immunology**. 1992. 88, 253-257.

Edrissian, G.H., Darabian, P. "A comparison of enzyme-linked immunosorbent assay and indirect fluorescent antibody test in the sero-diagnosis of cutaneous and visceral leishmaniasis in Iran". **Trans. Research Society of Tropical Medicine and Hygiene**. 1979. 73: 289-292.

el Amin, E.R., Wright, E.P., Vlug, A. "Characterization of the humoral immune response in Sudanese Leishmaniasis: specific antibody detected by class- and subclass- specific reagents". **Clinical and Experimental Immunology**. 1986a. 64, 14-19.

el Amin, E.R., Wright, E.P., Abdel Rahman, A.M., Kolk, A., Laarman, J.J., Pondman, K.W. "*Serodiagnosis of Sudanese visceral and mucosal leishmaniasis: comparison of ELISA-immunofluorescence and indirect haemagglutination*". **Trans. Research Society of Tropical Medicine and Hygiene**. 1986b. 80: 271-274.

el Safi, S.H., Evans, D.A. "*A comparison of the direct agglutination test and enzyme-linked immunosorbent assay in the serodiagnosis of leishmaniasis in the Sudan*". **Trans. Research Society of Tropical Medicine and Hygiene**. 1989. 83: 334-337.

Engvall, E. & Ruoslahti, E. **Immunoassays in the Clinical Laboratory**. Ed. Liss, A. R. New York. 1979. pp. 89-97.

Estes, D.M., Templeton, J.W., Hunter, D.M., Adams, L.G. "*Production and use of murine monoclonal antibodies reactive with bovine IgM isotype and IgG subisotypes (IgG₁, IgG_{2a} and IgG_{2b}) in assessing immunoglobulins levels in serum of cattle*". **Veterinary Immunology and Immunopathology**. 1990. 25, 61-72.

Estévez, J., Leiro, J., Santamarina, M.T., Domínguez, J., Ubeira, F.M. "*Monoclonal antibodies to turbot (*Scophthalmus maximus*) immunoglobulins: characterization and applicability in immunoassays*". **Veterinary Immunology and Immunopathology**. 1994. 41, 353-366.

Fahey, J.L. & McKelvey, E.M. "*Quantitative determination of serum immunoglobulins in antibody-agar plates*". **Journal of Immunology**. 1965. 94, 84-90.

Felsburg, P.J., Glickman, L.T., Jesyk, P.F. “*Selective IgA deficiency in the dog*”. **Clinical Immunology and Immunopathology**. 1985. 36, 297-305.

Felsburg, P.J. “*Overview of the immune system and immunodeficiency diseases*”. **Veterinary Clinics of North America**. 1994. 24, 629-653.

Fey, H., Messerli, J., Sturzenegger, N., Grolimund, F. “*Methods of isolation, purification and quantification of bovine immunoglobulins*”. **Zentralbibliothek of Veterinaermedizin, Reihe B**, 1976. 23, 269-281.

Fuda, H., Soyano, K., Yamazaki, F., Hara, A. “*Serum immunoglobulin M (IgM) during early development of masu salmon (Oncorhynchus masou)*”. **Comparative Biochemistry and Physiology**. 1991. 99A: 637-643.

German A.J., Hall, E.J., Day, M.J. “*Measurement of IgG, IgM and IgA concentrations in canine serum, saliva, tears and bile*”. **Veterinary Immunology and Immunopathology**. 1998. 64, 107-121.

Ginel, P.J., Novales, M., García, M., Martín, E.M., López, R., Molleda, J.M. “*Immunoglobulins in stimulated tears of dogs*”. **American Journal Veterinary Research**. 1993a. 54 (7), 1060-1063.

Ginel, P.J., Novales, M., Lozano, M.D., Molleda, J.M., López, R. “*Local secretory IgA in dogs with low systemic IgA levels*”. **Veterinary Record**. 1993b. 132, 321-323.

Glemmie, M.J. & Johnson, W.M. “*Clinical trials of antibody therapy*”. **Immunology Today**. 2000. 21(8), 403-410.

Goldsby, R.A., Srikumaran, S., Arulanandam, A., Hague, B., Ponce de León, F.A., Sevoian, M., Guidry, A.J. “*The application of hybridoma technology to the study of bovine immunoglobulins*”. **Veterinary Immunology and Immunopathology**. 1987. 17, 25-35.

Goodger, J., Russell, W.P., Nolan, A., Newell, D.G. “*Production and characterization of a monoclonal badger anti-immunoglobulin G and its use in defining the specificity of Mycobacterium bovis infection in badgers by Western blot*”. **Veterinary Immunology and Immunopathology**. 1994. 40, 243-252.

Griffin, J.F.T., & Buchan, G.S. “*The ELISA technique for diagnosis of severe tuberculosis in deer and exotic ruminants*”. **Proceeding of a Deer Course for Veterinarians**. 1989. 6, 78-86.

Griffin, C.E., Moriello, De Boer, D.J. “*The effect of serum IgE on an in vitro ELISA test in the normal canine*”. **Advances in Veterinary Dermatology**. Philadelphia: WB Saunders Co. 1990. 137-144.

Halliwell, R.E.W., Schwartzman, R.M., Rockey, J.H. “*Antigenic relationship between human IgE and canine IgE*”. **Clinical and Experimental Immunology**. 1972. 10, 399-407.

Halliwell, R.E.W., Schwartzman, R.M., Montgomery, P.C., Rockey, J.H. “*Physicochemical properties of canine IgE*”. **Transplantation Procedures**. 1975. 7, 537-543.

Halliwell, R.E.W. & Kunkle, G.A. “*The radioallergosorbent test in the diagnosis of canine atopic disease*”. **Journal of Allergy Clinical Immunology**. 1978. 62, 236-242.

Halliwell, R.E.W., Longino, S.J. “*IgE and IgG antibodies to flea antigen in differing dog populatios*”. **Veterinary Immunology and Immunopathology**. 1985. 8, 215-223.

Halliwell, R.E.W., Preston, J.F., Nesbitt, J.G. “*Aspect of the immunopathogenesis of flea allergy dermatitis in dogs*”. **Veterinary Immunology and Immunopathology**. 1987. 17, 483-489.

Halliwell, R.E.W., Werner, L.L., Baum, D.E., Newton, C.D., Wolfe, J.H., Schumacher, H.R. “*Incidence and characterization of canine rheumatoid factor*”. **Veterinary Immunology and Immunopathology**. 1989. 21, 161-170.

Halliwell, R.E.W., Gorman, N.T. **Inmunología Clínica Veterinaria**. Cap.2 y 3. 1989. Ed. Acribia.

Halliwell, R.E.W. & Gorman, N.T. **Veterinary Clinical Immunology**. 1989. W.B. Saunders. Philadelphia, PA, USA.

Halliwell, R.E.W. “*Clinical and immunological aspects of allergic skin diseases in domestic animals*”. In: **von Tsarner, C., Halliwell, R.E.W. (Eds.). Advances in Veterinary Dermatology**. vol.1. Balliere Tindall. London. pp. 91-117.

Halliwell R.E.W. “*Local and systemic antibody production in horses affected with chronic obstructive pulmonary disease*”. **Veterinary Immunology and Immunopathology**. 1993. 38, 201-215.

Halpern, G.M. "Evaluation of *in vitro* IgE testing to diagnosis atopic diseases". **Clinical Review Allergy**. 1989. 7, 23-48.

Harlow, E., & Lane, D. "Antibodies, a Laboratory Manual". **Cold Spring Harbor Laboratory**. 1988.

Heddle, R.J. & Rowley, D. "Immunochemical characterization of dog serum, parotid saliva, calostrum, milk and small bowel fluid". **Immunology**. 1975. 29, 185-195.

Henning, D., & Nielsen, K. "Cross-reactivity of monoclonal antibodies to bovine immunoglobulins with immunoglobulins of other species". **Veterinary Immunology and Immunopathology**. 1992. 34, 235-243.

Herbs, L.H., & Klein, P.A. "Monoclonal antibodies for the measurement of class-specific antibody response in the green turtle, *Chelonia mydas*". **Veterinary Immunology and Immunopathology**. 1995. 46(3-4), 317-335.

Hibma, M. & Griffin, J.F.T. "Generation and characterization of murine monoclonal antibodies specific for cervine immunoglobulin light chain, IgM and IgG". **Veterinary Immunology and Immunopathology**. 1992. 31, 267-278.

Hirano, T., Miyajima, H., Kitagawa, H., Watanabe, N., Azuma, M., Taniguchi, O., Hashimoto, H., Hirose, S., Yagita, H., Furusawa, S., Ovary, Z., Okumura, K. "Studies on murine IgE with monoclonal antibodies. I. Characterization of rat monoclonal anti-IgE antibodies and the use of these antibodies for determinations of serum IgE levels and for anaphylactic antibodies" **International Archives of Allergy and Applied Immunology**. 1988. 85, 47-54.

Ho, E.A., Suong, T.H., Li, Y. “Comparative merits of sternum, spleen and liver puncture in the study of human visceral leishmaniasis”. **Trans. Research Society of Tropical Medicine and Hygiene**. 1948. 41: 629-636.

Ho, M., Leeuwenburg, J., Mbugua, G., Wamachi, A., Voller, A. “An enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for field diagnosis of visceral leishmaniasis”. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**. 1983. 32(5), 943-946.

Hollingshead, M.G., Tonkonogy, S.L., de Buysscher, E.V. “A method for the accurate determination of the specificity of monoclonal antibodies reactive with porcine immunoglobulins”. **Veterinary Immunology and Immunopathology**. 1985. 10, 167-175.

Hommel, M., Peters, W., Ranque, J., Quilici, M., Lanotte, G. “The micro-ELISA technique in the serodiagnosis of visceral leishmaniasis”. **American Journal of Tropical Medicine and Parasitology**. 1978. 72, 213-218.

Iskander, R., Das, P.K., Aalberse, R.C. “IgG4 antibodies in Egyptian patients with schistosomiasis”. **International Archives of Allergy and Applied Immunology**. 1981. 66, 200-209.

Jassim, A., Hassan, K., Catty, D. “Antibody isotypes in human schistosomiasis mansoni”. **Parasite Immunology**. 1987. 9, 627-650.

Jeanson, A., Cloes, J.M., Bouchet, M., Rentier, B. “Comparison of conjugation procedures for the preparation of monoclonal antibody-enzyme conjugates”. **Journal of Immunological Methods**. 1988. 111, 261-270.

Johnston, W.H., Acton, R.T., Weinheimer, P.F., Niedermeier, W., Evans, E.E., Shelton, E., Bennet, J.C. "Isolation and physico-chemical characterization of the IgM-like immunoglobulin from the stingray *dasyatis americana*". **Journal of fish diseases**. 1971. 107(3), 782-793.

Juntti, N., Larsson, B., Fossum, C. "The use of monoclonal antibodies in Enzyme Linked Immunosorbent Assays for detection of antibodies to bovine viral diarrhoea virus". **Journal of Veterinary Medicine**. 1987. 34, 356-363.

Kager, P.A. & Rees, P.H. "Splenic aspiration in the diagnosis of kala azar". **Procedures of 2nd Annual Conference of Kenya Medicine Research Institute**. 1982.

Kemeney, D.M., Urbanek, R., Richards, D., Greenall, C. "Development of a semi-quantitative enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for detection of human IgG subclass antibodies". **Journal of Immunological Methods**. 1987. 96, 47-56.

Killingsworth, C.R., Walshaw, R., Reimann, K.A., Rosser, E.J. "Thyroid and immunologic status of dogs with perianal fistula". **American Journal of Veterinary Research**. 1988. 49, 1742-1745.

Kleinbeck, M.L., Hites, M.J., Loker, J.L., Halliwell, R.E.W. and Lee, K.W. "Enzyme-linked immunosorbent assay for measurement of allergen-specific IgE antibodies in canine serum. **American Journal Veterinary Research**. 1989. 50, 1831-1839.

Kobayashi, K., Tomonaga, S., Kajii, T. "A second class of immunoglobulin other than IgM present in the serum of a cartilaginous fish, the

skate, *Raja kenoei*, isolation and characterization". **Molecular Immunology**. 1984. 21(5), 397-404.

Kuiken, T., Heckert, R.A., Riva, J., Leighton, F.A., Wobeser, G. "Excretion of pathogenic Newcastle disease virus by double-crested cormorants (*Phalacrocorax auritus*) in absence of mortality or clinical signs of disease". **Avian Pathology**. 1998. 27, 541-546.

Lewis, R.M., Henry, W.B., Thornton, G.W., Gilmore, C.E. "A syndrome of autoimmune hemolytic anemia and thrombocytopenia in dogs". **Scientific Procedures of Journal American Veterinarian Association**. 1963. 1, 140-145.

Lewis, R.M., Schwartz, R.S., Henry W.B. "Canine systemic lupus erythematosus". **Blood**. 1965. 25, 143-146.

Lindmark, R., Thoren-Tollin, K., Sjoquist, J. "Binding of immunoglobulins to protein A and immunoglobulins levels in mammalian sera". **Journal of Immunological Methods**. 1983. 62, 1-13.

Longbottom, J.L. "Enzymed-linked immunosorbent assay-ELISA". **International Congress of Allergy and Clinical Immunology**. 1983. 11, 233-238.

Lowe, J., Bird, P., Hardie, D., Jeffries, R., Ling, N.R. "Monoclonal antibodies (McAbs) to determinants on human gamma chains: properties of antibodies showing subclass restriction or subclass specificity". **Immunology**. 1982. 47, 329-336.

Lun, D.P., Holmes, M.A., Schram, B., Duffus, W.P. “*Monoclonal antibodies specific for equine IgG sub-isotypes including an antibody which recognizes B lymphocytes*”. **Veterinary Immunology and Immunopathology**. 1995. 47(3-4), 239-251.

Madewell, B.R., Hills, D.L., Franti, C.E. “*Serum concentrations of immunoglobulins G, A, and M in dogs with neoplastic disease*”. **American Journal of Veterinary Research**. 1980. 41, 720-722.

Mancini, G., Carbonara, A.O., Heremans, J.F. “*Immunochemical quantitation of antigens by single radial immunodiffusion*”. **Immunochemistry**. 1965. 2, 235-254.

Mansueto, S., Miceli, M.D., Quartarato, P. “*Counter immunoelectrophoresis (CIEP) and ELISA test in the diagnosis of canine leishmaniasis*”. **Annal of Tropical Medicine and Parasitology**. 1982. 76, 229-231.

Mazza, G., Duffus, P.H., Elson, C.J., Stokes, C.R., Wilson, A.D., Whiting, A.H. “*The separation and identification by monoclonal antibodies of dog IgG fractions*”. **Journal of Immunology Methods**. 1993. 161, 193-203.

Mazza, G., Whiting, A.H., Day, M.J., Duffus, W.P.H. “*Development of an enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of IgG subclasses in the serum of normal and diseased dogs*”. **Research in Veterinary Science**. 1994a. 57, 133-139.

Mazza, G., Whiting, A.H., Day, M.J., Duffus, W.P.H. “*Preparation of monoclonal antibodies specific for the subclasses of canine IgG*”. **Research in Veterinary Science**. 1994b. 57, 140-145.

McGuire, T.C., Perryman, L.E., Davis, W.C. "Analysis of serum and lymphocyte surface IgM of healthy and immunodeficient horses with monoclonal antibodies". **American Journal of Veterinary Research**. 1983. 44, 1284-1288.

Molina, J.M. "Utilización de suero policlonal antiproduitos de excreción-secreción (ES) de vermes adultos para la detección de *Dirofilaria immitis* mediante técnicas inmunohistoquímicas". **Medicina Veterinaria**. 1997. 4 (6).

Mortimer, G.E. & Widdowson, J.P. "Predominance of immunoglobulin G subclass 3 among the complement-fixing antibodies to streptococcal M associated protein". **Clinical and Experimental Immunology**. 1979. 37, 247-256.

Newton, C.D., Lipowitz, A.J., Halliwell, R.E., Allen, H.L., Biery, D.N., Schumacher, H.R. "Rheumatoid arthritis in dogs". **Journal of American Veterinary Association**. 1976. 168, 113-120.

Nieto, C.G., Garcia-Alonso, M., Requena, J.M., Mirón, C., Soto, M., Alonso, C., Navarrete, I. "Analysis of the humoral immune response against total and recombinant antigens of *Leishmania infantum*: correlation with disease progression in canine experimental leishmaniasis". **Veterinary Immunology and Immunopathology**. 1999. 67, 117-130.

Ownby, D.R. "Allergy testing: in vivo versus in vitro". **Pediatric Allergic Disease**. 1988. 35, 995-1006.

Paré, J., Hietala, S.K., Thurmond, M.C. "An enzyme-immunosorbent assay (ELISA) for serological diagnosis of *Neospora sp.* infection in cattle". **Journal of Veterinary Diagnosis and Investigation**. 1995. 7, 352-359.

Pastoret, P.P., Griebel, P., Bazinand, H., Goraents, A. **Handbook of Vertebrate Immunology**. 1998. Academic Press. Cap. 7, 261-288.

Patel, M., Selinger, D., Mark, G.E., Hickey, G.J., Hollins, G.F. "Sequence of the dog immunoglobulin alpha and epsilon constant region genes". **Immunogenetics**. 1995. 41, 282-286.

Paul, P.S., Mengeling, W.L., Malstrom, C.E., Van Deusen, R.A. "Production and characterization of monoclonal antibodies to porcine immunoglobulin gamma, alpha, and light chains". **American Journal of Veterinary Research**. 1989. 50, 471-477.

Peters, J.E., Hirshman, C.A., Malley, A. "The Basenji-Greyhound dog model of asthma: leukocyte histamine release, serum IgE, and airway response to inhaled allergen". **Journal of Immunology**. 1982. 1245-1249.

Peters, W. & Killick-Kendrick, R. "The Leishmaniasis in Biology and Medicine". **Academic Press**. Vol. I, II. p. 941.

Peng, Z., Simons, F.E.R., Becker, A.B. "Measurement of ragweed-specific IgE in canine serum by use of enzyme-linked immunosorbent assays, containing polyclonal and monoclonal antibodies". **American Journal of Veterinary Research**. 1993. 54, 239-243.

Peña, J. **Inmunología. Bases moleculares y celulares**. Cap. 4 y 5. 1994. Ed. Ciencia y Técnica.

Perlmutter, R., Hansburg, D., Briles, D.E., Nicolotti, R., Davie, J.M. "Subclass restriction of murine anticarbohydrate antibodies". **Journal of Immunology**. 1978. 121, 556-561.

Pinelli, E., Killick-Kendrick, R., Wagenaar, J., Bernadina, W., del Real, G., Ruitenbergh, J. “*Cellular and humoral immune responses in dogs experimentally and naturally infected with Leishmania infantum*”. **Infective Immunology**. 1994. 62, 229-235.

Rapacz, J. & Hasler-Rapacz, J. “*Immunogenetic studies on polymorphism, postnatal passive acquisition and development of immunoglobulin gamma (IgG) in swine*”. **Proc. 2nd World Congress on Genetics Applied to Livestock Production**. 1982. Vol. VIII. 601-606.

Reed, S.G., Shreffler, W.G., Burns Jr, J.M., Scott, J.M., Orge, M.G., Ghalib, H.W., Sidding, M., Badaro, R. “*An improved serodiagnostic procedure for visceral leishmaniasis*”. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**. 1990. 43(6), 632-639.

Reynolds, H.Y. & Johnson, J.S. “*Quantitation of canine immunoglobulins. IV. Copro-Immunoglobulins*”. **Journal of Immunology**. 1970. 105, 698-703.

Riesen, W.F., Skvaril, F., Braun, D.G. “*Natural infection in class, subclass, and type; and clonal appearance of polysaccharide group-specific antibodies*”. **Scandinavian Journal of Immunology**. 1976. 5, 383.

Roitt, I.M. “*Inmunología Esencial*”. 6^a edición. 1980. **Editorial JIMS S.A.**

Roitt, I.M., Brostoff, J., Male, D. “*Immunology*”. 5th Edition. 1998. **Mosby, London.**

Roitt, I.M., Brostoff, J., Male, D. “*Immunology*” **Ed. Churchill Livingstone.**

Rosenshein, I.L. & Marchalonis, J.J. “*The immunoglobulines of carcharhine sharks: a comparison of serological and biochemical properties*”. **Comparative Biochemistry and Physiology.** 1987. 86B, 737-747.

Rup, B.J. “*Production of large numbers of hybridomas producing monoclonal antibodies against rat IgE using mast cell-deficient w/w^v and sl/sl^d strains of mice*”. **Journal of Immunological Methods.** 1989. 122, 137-142.

Salimonu, L.S., Williams, A.I.O., Osunkoya, B.O. “*IgG subclass levels in Malaria-infected nigerians*”. **Vox Sanguine.** 1982. 248-251.

Sánchez, C., Coll, J., & Domínguez, J. “*One-step purification of the major rainbow trout immunoglobulin*”. **Veterinary Immunology and Immunopathology.** 1991. 27, 383-392.

Sánchez, C., López-Fierro, P., Zapata, A., Domínguez, J. “*Characterization of monoclonal antibodies against heavy and light chains of trout immunoglobulins*”. **Fish & Shellfish Immunology.** 1993. 3, 237-251.

Sánchez-Madrid, F., Morago, G., Corbi, A.L., Carreira, J. “*Monoclonal antibodies to three distinct epitopes of human IgE: their use for determination of allergen-specific IgE*”. **Journal of Immunological Methods.** 1984. 73, 367-378.

Schaw, R.J., Grimmett, D.J., Donaghy, M.J., Gatehouse, T.K., Shirer, C.L., Douch, P.G. “*Production and characterization of monoclonal*

antibodies recognising ovine IgE". **Veterinary Immunology and Immunopathology**. 1996. 1;51(3-4), 235-251.

Schultz, K.T. & Halliwell, R.E.W. "The induction and kinetics of an anti-DNP IgE response in dogs". **Veterinary Immunology and Immunopathology**. 1985. 10, 205-214.

Schwartzman, R.M., Rockey, J.H., Halliwell, R.E.W. "Canine reagenic antibody. Characterization of the spontaneous anti-ragweed and induced anti-dinitrophenyl reagenic antibodies of the atopic dog. **Clinical Experimental Immunology**. 1971. 9, 549-569.

Scott, M.G., Briles, D.E., Nahm, M.H. "Selective IgG subclass expression: biological, clinical and functional aspects". **In: The Human IgG Subclasses**. Ed. F. Shakib. Oxford, Pergamon Press. 1990. pp. 161-183.

Scott, M.A., Davis, J.M., Schwartz, K.A. "Staphylococcal protein A binding to canine IgG and IgM". **Veterinary Immunology and Immunopathology**. 1997. 59, 205-212.

Seppala, I.J., Routonen, N., Sarnesto, A., Mattila, P.A., Makela, O. "The percentage of six immunoglobulin isotypes in human antibodies to tetanus toxoid: standardization of isotype specific second antibodies in solid phase assays". **European Journal of Immunology**. 1984. 14, 868-873.

Shakib, F., McLaughlan, P., Stanworth, D.R., Smith, E., Fairnburg, E. "Elevated serum IgE and IgG4 in patients with atopic dermatitis". **British Journal of Dermatology**. 1979. 97, 59-68.

Shakib, F. "Basic and clinical aspect of IgG subclasses". **Monographs in Allergy**. 1986. Basle, Karger. p. 19.

Sheared, M.H., Jenson, H.B., Carey, K.D., Chanh, T.C., Kennedey, R.C. "Production and characterization of murine monoclonal antibodies specific for baboon IgG heavy and light chain epitopes". **Journal of Medical Primatology**. 1994. 23(7), 382-387.

Siber, G.R., Schur, P.H., Aisenberg, A.C., Weitzman, S.A., Sciffman, G. "Correlation between serum IgG2 concentrations and the antibody response to bacterial polisaccharide antigens". **New England Journal of Medicine**. 1980. 303, 178-163.

Siwicki, A.K., Vergnet, C., Charlemagne, J., Dunier, M. "Monoclonal antibodies against goldfish (*Carassius auratus*) immunoglobulin: application to the quantification of immunoglobulin and antibody-secreting cells by ELISPOT and serum immunoglobulin and antibody levels by ELISA in carp (*Cyprinus carpio*)". **Veterinary Research**. 1994. 25(5), 458-467.

Skavril, F. & Schilt, U. "Characterization of the subclass and light chain types of IgG antibodies to rubella". **Clinical of Experimental Immunology**. 1984. 55, 671-677.

Slack, J.H., Der-Balian, G., Nahm, M.H., Davie, J.M. "Subclass restriction of murine antibodies. II. The IgG plaque-forming response to thymus-independent type 1 and type 2 antigen in normal mice and mice expressing an X-linked immunodeficiency". **Journal of Experimental Medicine**. 1980. 151, 853-858.

Sorjonen, D.C., Warren, J.N., Schultz, R.D. "Qualitative and quantitative determination of albumin IgG, IgM and IgA in normal cerebrospinal fluid of dogs". **Journal of the American Animal Hospital Association**. 1981. 17, 833-839.

Sousa, C.A. & Norton, A.L. "Advances in methodology for diagnosis of allergic skin disease". **Veterinary Clinic of North America in Small Animal Practice**. 1990. 20, 1419-1427.

Srikumaran, S., Guidry, A.J., Goldby, R.A. "Production and characterization of monoclonal bovine immunoglobulins G1, G2 and M from bovine X murine hybridomas". **Veterinary Immunology and Immunopathology**. 1983. 5, 323-342.

Srikumaran, S., Goldsby, R.A., Guidry, A.J., Hague, B., Onisk, D.V., Srikumaran, P. "Library of monoclonal bovine immunoglobulins and monoclonal antibodies to bovine immunoglobulins". **Hybridoma**. 1987. 6, 527-533.

Stevens, R.D., Dicken, D., Keld, B., Heiner, D. "IgG₁ is the predominant subclass of in vivo and in vitro produced antitetanus toxoid antibodies and also serves as the membrane IgG molecule for delivery of inhibitory signals to anti-tetanus antibody-producing B cells". **Journal of Clinical Immunology**. 1983. 3, 65-69.

Suter, M. & Fey, H. "Isolation and characterization of equine IgE". **Veterinary Immunology and Immunopathology**. 1981. 28, 414-420.

Suter, M. & Fey, H. "Allergen-specific ELISA for horse IgE". **Veterinary Immunology and Immunopathology**. 1983a. 4, 555-564.

Suter, M. & Fey, H. "Further purification and characterization of horse IgE". **Veterinary Immunology and Immunopathology**. 1983b. 4, 545-554.

Suter, M. "The potential of molecular biology for the production of monoclonal antibodies derived from outbred veterinary animals". **Veterinary Immunology and Immunopathology**. 1992. 33, 285-300.

Shaw, R.J., Grimmett, D.J., Donaghy, M.J., Gatehouse, T.K., Shirer, C.L., Douch, P.G.C. "Production and characterization of monoclonal antibodies recognising ovine IgE". **Veterinary Immunology and Immunopathology**. 1996. 51, 235-251.

Thatcher, E.F. & Gershwin, L.J. "Generation and characterization of murine monoclonal antibodies specific for bovine immunoglobulin E". **Veterinary Immunology and Immunopathology**. 1988. 18, 53-66.

Tippold, A., Psfister, H., Vandevelde, M. "Determination of the IgG index for the detection of intrathecal immunoglobulin synthesis in dogs using an ELISA". **Research in Veterinary Science**. 1993. 54, 40-44.

Tizard, I. **Inmunología Veterinaria**. Cap.4 y 6. 1989. Ed. Interamericana. McGraw-Hill.

Vaerman, J.P., Heremans, J.F., Van Kerckhoven, G. "Identification of IgA in several mammalian species. **Journal of Immunology**. 1969. 103, 1421-1249.

Vaerman, J.P., Querinjean, P., Heremans, J.P. "Studies on the IgA system of the horse". **Immunology**. 1971, 443-454.

Van der Giessen, M. & Groeneboer-Kempers, O. “*The subclass of human IgG antibodies against tetanus toxoid*”. **Clinical and Experimental Immunology**. 1976. 25, 117-123.

Van der Heijden, M.H., Rooijackers, J.B., Booms, G.H., Rombout, J.H., Boon, J.H. “*Production, characterisation and applicability of monoclonal antibodies to European eel (*Anguilla anguilla* L., 1758) immunoglobulin*”. **Veterinary Immunology and Immunopathology**. 1995. 45(1-2), 151-164.

Van Nerom, A., Ducatelle, R., Haesebrouck, F., Arnouts, S., Goddeeris, B., Davison, T.F. and Kaspers, B. “*Monoclonal antibodies to chicken immunoglobulin isotypes specifically detect turkey immunoglobulin isotypes*”. **Veterinary Immunology and Immunopathology**. 1997. 57(3-4), 305-314.

Van Zaane, D., Ijzerman, J., De Leeuw, P.W. “*Intestinal antibody response after vaccination and infection with rotavirus of calves fed colostrum with or without rotavirus antibody*”. **Veterinary Immunology and Immunopathology**. 1986. 11, 45-51.

Van Zaane, D. & Hult, M.M. “*Monoclonal antibodies against porcine immunoglobulin isotypes*”. **Veterinary Immunology and Immunopathology**. 1987. 16, 23-36.

Wagner, B., Radbruch, A., Richards, C., Leibold, W. “*Monoclonal equine IgM and IgG immunoglobulins*”. **Veterinary Immunology and Immunopathology**. 1995. 47, 1-12.

Ward, D.C., Jackson, S., Eldridge, J.H., Radl, J.H., Michalek, S.M. "Generation of monoclonal antibodies to *Macaca mulatta* (reshus) IgA. **Journal of Medical Primatology**. 1995. 24(2), 74-80.

Warr, G. W. & Hart, I.R. "Binding of canine IgM and IgG to Protein A of *Staphylococcus aureus*: A simple method for the isolation of canine immunoglobulins from serum and the lymphocyte surface". **American Journal of Veterinary Research**. 1979. 40, 922-926.

Willemse, A., Noordzij, A., Van den Brom, W.E. "Allergen specific IgG_d antibodies in dogs with atopic dermatitis as determined by the enzymed linked immunosorbent assay (ELISA)". **Clinical and Experimental Immunology**. 1985. 59, 359-363.

Williams, D.J.L., Newson, J., Naessen, J. "Quantitation of bovine immunoglobulin isotypes and allotypes using monoclonal antibodies". **Veterinary Immunology and Immunopathology**. 1990. 24, 267-283.

Yang, M., Becker, A.B., Simons, F.E., Peng, Z. "Identification of a dog IgD-like molecule by a monoclonal antibody". **Veterinary Immunology and Immunopathology**. 1995. 47(3-4), 215-224.

Yount, W.J., Dorner, M.M., Kunkel, H.G., Kabat, E.A. "Studies on human antibodies. VI. Selected variations in subgroup composition and genetic markers". **Journal of Experimental Medicine**. 1968. 127, 633-639.

Zykan, J., Sima, P. and Tuckova, L. "Cross-reactivity of human and a putative pig IgD. Pig IgD-like molecules as serum and lymphocyte components. **Folia Microbiology. (Praha)**. 1983. 28: 474-481.

