

**UNIVERSIDAD DE ORIENTE
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES**



CENTRO DE ESTUDIOS DE BIOTECNOLOGÍA INDUSTRIAL

**TESIS EN OPCIÓN AL TÍTULO ACADÉMICO DE MASTER
EN BIOTECNOLOGÍA
MENCIÓN BIOTECNOLOGÍA AMBIENTAL**

*Obtención del conjugado roboflavina –
seroalbúmina bovina (GV – BSA) y su
evaluación como inmunógeno.*

Autor: Lic. Mayda E. Guerra Ortiz.

Tutores: Dra. Olimpia Carrillo Farnés
MSc. Humberto Morris Quevedo.

2002
Santiago de Cuba

- *A la memoria de mis padres.*
- *A mi hijo.*

Mi eterno agradecimiento a todos los que contribuyeron a la realización y culminación de este trabajo: tutores, investigadores del CEBI, colegas del Departamento de Química, estudiantes y amigos. A todos muchas gracias.

Mayda.

Índice.

1- Introducción

2- Revisión bibliográfica

- 2.1- Vitaminas. Breve esbozo histórico
- 2.2- Riboflavina
 - 2.2.1- Aislamiento
 - 2.2.2- Estructura
 - 2.2.3- Obtención
 - 2.2.4- Propiedades
 - 2.2.5- Fisiología
 - 2.2.6- Métodos de determinación
- 2.3- Haptenos. Generalidades
- 2.4- Conjugación de haptenos a proteínas
 - 2.4.1- Procedimientos para la conjugación
- 2.5- Determinación del grado de sustitución en la molécula de la proteína
- 2.6- Compuestos empleados como haptenos
- 2.7- Vitaminas como haptenos

3- Desarrollo

- 3.1- Reactivos, equipos y preparación de soluciones
 - 3.1.1- Reactivos
 - 3.1.2- Equipos
 - 3.1.3- Preparación de soluciones
- 3.2- Evaluación de la etapa de oxidación
 - 3.2.1 - Preparación del conjugado riboflavina (GV) - seroalbúmina bovina (BSA) para la optimización
 - 3.2.2- Variables experimentales establecidas para la reacción de oxidación
 - 3.2.3- Determinación cualitativa de grupos funcionales
 - 3.2.3.1- Reacción con 2,4- dinitrofenilhidracina
 - 3.2.3.2- Reacción con el reactivo de Tollens
 - 3.2.3.3- Reacción con el reactivo de Fehling
 - 3.2.3.4- Reacción con solución de cloruro de bario
 - 3.2.4- Determinación cuantitativa de riboflavina
 - 3.2.5- Curso de la reacción por cromatografía de capa fina
 - 3.2.6- Determinación de la cantidad de peryodato consumida
 - 3.2.7- Determinación de la cantidad de ácido fórmico producida
- 3.3- Preparación final del conjugado GV - BSA
- 3.4- Determinación cuantitativa de proteína
- 3.5- Registro de los espectros UV - Vis
- 3.6- Electroforesis sobre acetato de celulosa
- 3.7- Electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS - PAGE)
- 3.8- Evaluación de la inmunogenicidad del conjugado GV - BSA

- 3.8.1- Esquema de inmunización
- 3.8.2- Obtención del antisuero
- 3.8.3- Detección de los anticuerpos
 - 3.8.3.1- Preparación de las placas de vidrio
 - 3.8.3.2- Técnica de inmunodifusión radial simple de Ouchterlony
 - 3.8.3.3- Técnica de inmunodifusión radial doble de Ouchterlony
 - 3.8.3.4- Técnica de inmunodifusión radial simple de Mancini

4- Resultados y discusión

5- Conclusiones

6- Recomendaciones

7- Bibliografía

8- Anexos

Resumen.

En este trabajo se obtuvo el conjugado riboflavina - seroalbúmina bovina (GV-BSA) a partir de la reacción de condensación del producto principal de la oxidación de la riboflavina (GV) con seroalbúmina bovina (BSA) y posterior reducción con borohidruro de sodio. Este conjugado se semipurificó por los métodos de precipitación por salado y diálisis y se identificó por espectroscopia UV - Visible y electroforesis sobre acetato de celulosa y en gel de poliacrilamida (SDS – PAGE). La aparición de dos bandas en cada uno de los electroforegramas sugirieron la formación de un compuesto de masa molecular más elevado que la proteína, lo que indica la presencia de un enlace covalente entre la proteína y la riboflavina (GV). Se evaluó la actividad inmunogénica del conjugado GV - BSA desarrollando un esquema de inmunización en conejos F1, semigigantes blancos, las inoculaciones se realizaron por vía subcutánea aplicando una dosis inicial de 150 µg del conjugado GV – BSA. Para la detección de los anticuerpos se utilizó la técnica de inmunodifusión radial doble de Ouchterlony. La banda de precipitación antígeno – anticuerpo se hizo visible en el rango de concentraciones de riboflavina entre 0,6 y 0,9 mg/mL. Los resultados alcanzados demostraron la obtención de anticuerpos específicos contra la riboflavina.

Summary.

A riboflavin - bovine serum albumin (GV – BSA) conjugate was prepared by the condensation reaction of the oxidation product of riboflavin (GV) with bovine serum albumin (BSA) and reduction with sodium borohydride. This conjugate was semipurified by salting out and dialysis. Using ultraviolet spectrum, sodium dodecyl sulfate – polyacrilamide gel electrophoresis (SDS – PAGE) and cellulose acetate electrophoresis the conjugate GV – BSA was identified. The appearance of two bands in both electrophoregrams suggests the formation of higher molecular weight material, indicating the covalent linkage between protein and the riboflavin (GV). GV – BSA conjugate immunogenic activity was also evaluated. F1 white semigigantic rabbits were immunized with this conjugate. Inoculations were performed by subcutaneous route injecting an initial dose of 150 µg of GV – BSA conjugate. Antibodies were detected according to the Ouchterlony double radial immunodiffusion technique. Antigen – antibody precipitation band was observed at a riboflavin concentration of 0,6 – 0,9 mg/mL. Results showed the production of specific antibodies against riboflavin.

Glosario.

BPA: bisfenol A

BSA: seroalbúmina bovina

CDI: carboxidiimida

CMC: 1 - ciclohexil - 3 - (2 - morfoliniletil) carbodiimida

CMD: carboximetildextrana

CM Pul: carboximetilpullulan

DCC: N, N' - dicitclohexilcarbodiimida

DNA: ácido desoxirribonucleico

DNP - OVA: dinitrofenil ovalbúmina

DXR: doxorubicina

EDC: 1- etil - 3 - (3 - dimetilaminopropil) carbodiimida

EDTA: ácido etilendiaminotetraacético

EIA: ensayo inmunoenzimático

ELISA: ensayo inmunoenzimático en fase sólida

EMIT : ensayo inmunoenzimático múltiple

FAD: dinucleótido de flavina y adenina

FMN: mononucleótido de flavina

GC / MS: cromatografía gaseosa acoplada a espectrometría de masa

HMPT: hexametilfósforotriamida

HPLC: cromatografía líquida de alta resolución

HPTLC: cromatografía de capa delgada de alta resolución

HSA: seroalbúmina humana

HVA: ácido homovanilínico

IAC: cromatografía de inmunoafinidad

IgG: inmunoglobulina G

IR: infrarrojo

KLH:

LG: lactoglobulina

MALDI- MS: desorción e ionización por láser, auxiliado por matriz acoplado a espectrometría de masa

MALDI _ TOFMS: desorción e ionización por láser, auxiliado por matriz acoplado a espectrometría de masa con un analizador de tiempo de vuelo

M - 6 -HS : 6 - succinilmorfina

5MTHFA: ácido 5 - metiltetrahidrofólico

NAD: dinucleótido de nicotinamida y adenina

NADP: fosfato del dinucleótido de nicotinamida y adenina

NHS: N - hidroxisuccinimida

1, 25 (OH)₂ D₃: 1 α , 25 - dihidroxivitamina D₃

SDS: dodecilsulfato de sodio

SDS - PAGE: electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato de sodio

TNBS: ácido 2,4,6 - trinitrobencenosulfónico

UV: ultravioleta

VMA: ácido vanilmandélico

Parte 1

Introducción

1- INTRODUCCIÓN.

El estudio de las características de las inmunoglobulinas ha permitido el desarrollo del Inmunodiagnóstico a través de la producción de reactivos inmunológicos partiendo de anticuerpos de alta especificidad, producidos contra un gran número de antígenos que permiten el diagnóstico y el seguimiento de patologías de etiología inmunológica. Estos anticuerpos pueden ser de origen policlonal o monoclonal en dependencia de la finalidad del reactivo en cuestión.

El éxito de la aplicación de las técnicas del Inmunodiagnóstico está en función de la producción de anticuerpos específicos para un antígeno en particular. Estos anticuerpos se obtienen diseñando esquemas óptimos de inmunización, inoculando animales con antígenos problemas y realizando, posteriormente, su desangrado para obtener del suero el reactivo de interés, en este caso el antisuero policlonal. Este consiste en un amplio espectro de moléculas de inmunoglobulinas dirigidas contra diferentes regiones del antígeno que luego va a ser detectado por cualquiera de las técnicas incluidas en el Inmunodiagnóstico.

Los hibridomas, producidos por fusión de células de mieloma con linfocitos B de ratones inmunizados previamente con un antígeno determinado, son capaces de multiplicarse indefinidamente y de producir al mismo tiempo una variedad particular de anticuerpos, los monoclonales.

El anticuerpo monoclonal sólo reacciona con un epítipo del antígeno correspondiente y es la diferencia fundamental que existe con uno policlonal.

Si bien se ha demostrado la mayor especificidad de los anticuerpos monoclonales en relación con los anticuerpos policlonales, estos últimos siguen siendo de gran utilidad para el diagnóstico debido a la relativa facilidad de su obtención. Las firmas comerciales más potentes en el mercado de los Inmunodiagnosticadores comercializan anticuerpos policlonales obtenidos en diferentes especies de animales para ser utilizados en las técnicas inmunoenzimáticas, inmunohistológicas e inmunohematológicas.

La producción de reactivos inmunodiagnosticadores elaborados a partir de anticuerpos policlonales y monoclonales constituye hoy día una línea de investigación y producción de los Centros de Biotecnología.

La riboflavina, una de las vitaminas del complejo B, es un componente fundamental de los alimentos, de fluidos biológicos y de fórmulas farmacéuticas empleadas como suplemento vitamínico, lo que hoy en día es esencial para el tratamiento de las

neuropatías. También se encuentra presente en determinados desechos industriales como la vinaza de destilería, el suero de queso crema, entre otros, los cuales en muchas ocasiones, son objeto de caracterizaciones para valorar su tratamiento y/o aprovechamiento, teniendo en cuenta las tendencias actuales con respecto a la conservación y preservación del medio ambiente. De aquí su importancia desde el punto de vista biológico, farmacéutico y biotecnológico. Los métodos tradicionales empleados en la cuantificación de riboflavina presentan numerosas desventajas, pudiéndose citar en primer lugar su escasa especificidad y por otra parte se encuentran los problemas económicos, debido a los altos costos de los equipos que se requieren, entre otras limitaciones. Por lo que se hace necesario la búsqueda de una vía rápida, sencilla y sobre todo específica para su cuantificación.

Actualmente la determinación de muchas sustancias químicas y fundamentalmente las que poseen actividad biológica, están basadas en el Inmunoensayo, que como método diagnóstico presenta numerosas ventajas, entre ellas, elevadas sensibilidad y especificidad, sencillez y rapidez. Resultan muy útiles en la detección de sustancias que se encuentran en concentraciones muy pequeñas en diferentes tipos de muestras, donde a veces los métodos químicos y físico - químicos tradicionales pierden confiabilidad.

Para la aplicación del inmunodiagnóstico se hace necesario la producción de anticuerpos contra la sustancia que se va a detectar, la cual, la mayor parte de las veces, no es antigénica y debe ser conjugada a algún sustrato proteico e inmunogénico para que pueda comportarse como un inmunógeno.

DISEÑO METODOLÓGICO.

Necesidad: Encontrar una técnica analítica que permita la cuantificación de la riboflavina, de manera específica, sensible y sencilla, en sustratos de diferentes orígenes.

Problema: Preparar un antígeno por conjugación de la riboflavina con una proteína portadora.

Campo de acción: Los métodos diagnósticos basados en el inmunoensayo.

Objeto: La determinación cuantitativa de la riboflavina por inmunoensayo.

Hipótesis: Si se obtiene el conjugado riboflavina – seroalbúmina bovina podría disponerse de un inmunógeno para la obtención de un antisuero anti – riboflavina.

Objetivo general: Obtener el conjugado riboflavina – seroalbúmina bovina y evaluar su actividad como inmunógeno.

Objetivos específicos:

1. Realizar una revisión bibliográfica acerca del estado del arte de la conjugación de haptenos a proteínas portadoras y sus aplicaciones en el inmunoensayo.
2. Establecer una técnica experimental que permita el acoplamiento de la riboflavina a la seroalbúmina bovina y la semipurificación del conjugado resultante.
3. Identificar el conjugado riboflavina – seroalbúmina bovina mediante espectroscopia ultravioleta – visible y electroforesis.
4. Desarrollar un esquema de inmunización en conejos para la obtención del antisuero policlonal anti - riboflavina y titular los anticuerpos a través de técnicas de inmunoprecipitación.

Parte 2

Revisión Bibliográfica

2- REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.

2.1- VITAMINAS. BREVE ESBOZO HISTÓRICO.

Las vitaminas son sustancias de naturaleza orgánica, que desempeñan en el organismo funciones muy específicas, actuando a concentraciones relativamente bajas. Son vitales para muchas formas de vida, sin embargo, algunos organismos no las pueden sintetizar por lo cual deben ser suministradas en la dieta. Resultan indispensables en el proceso humano de transformación energética, pero no son fuentes de energía, ni participan como elementos estructurales del organismo. Varias de ellas actúan como componentes fundamentales de algunas coenzimas importantes en las rutas metabólicas centrales, así por ejemplo: la tiamina (vitamina B₁) es el componente activo del pirofosfato de tiamina, un coenzima necesario para la descarboxilación enzimática de los alfa - oxoácidos. La riboflavina (vitamina B₂) es un componente de los coenzimas: mononucleótido de flavina (FMN) y dinucleótido de flavina y adenina (FAD), que actúan como grupos prostéticos transportadores de hidrógeno en ciertas enzimas de oxidación. El ácido nicotínico es un componente del dinucleótido de nicotinamida y adenina (NAD) y del fosfato de dinucleótido de nicotinamida y adenina (NADP) que funcionan como transportadores de electrones para las deshidrogenasas dependientes de la piridina. El ácido pantoténico es un componente esencial del coenzima A, que actúa como transportador del grupo acilo durante la oxidación enzimática y síntesis de los ácidos grasos (Lehninger, 1986 y Gómez, Lauzardo y Martínez, 1989).

La carencia de vitaminas en el organismo, aún en las pequeñas cantidades que se necesitan, puede provocar ciertas enfermedades, lo que se conoce desde 1881 cuando Lunin anunció que los ratones eran incapaces de crecer normalmente con dietas experimentales que contuvieran solamente sales inorgánicas, proteínas, grasas y carbohidratos y que sólo crecían adecuadamente si dicha dieta se complementaba con pequeñas cantidades de leche, la cual contenía determinadas sustancias, denominadas entonces "factores accesorios" que contribuían al desarrollo normal de las ratas. Sin embargo, no es hasta 1920 que se acepta el hecho de que la falta de dichas sustancias podía producir enfermedades al hombre, cuando se aplicó al caso concreto de una enfermedad de los ojos (la oftalmía), del beriberi y del escorbuto (Fieser y Fieser, 1966^b).

La expresión "factores accesorios" fue cambiada por el término "vitamina" (del latín *vita*, vida y del genérico *amina*) por el científico polaco Casimiro Funk en 1911, cuando logró aislar el principio activo de esas sustancias, el que presentó carácter básico y pensando que la sustancia antiberiberi era una amina indispensable para la vida, la denominó de esa manera (Fieser y Fieser, 1966^b). Contrariamente a esto, sólo unas pocas entre las vitaminas son aminas, de las 21 que se conocen actualmente solamente 10 pueden ser consideradas como tales. Esto ha motivado que, al menos en la lengua inglesa, se modifique el vocablo (*vitamins* en vez de *vitamines*), lo que aún no tiene su equivalencia en nuestro idioma (Gómez, Lauzardo y Martínez, 1989).

Las diversas vitaminas fueron diferenciadas mediante letras del alfabeto: el factor soluble en grasas se le denominó vitamina A y al factor soluble en agua se la llamó vitamina B. Esta terminología resultó poco adecuada, pues posteriormente se comprobó que cada uno de ellos contenían dos o más factores, por lo cual fue necesario distinguirlos mediante las denominaciones vitamina B₁, vitamina B₂, etc., aún sin conocer sus constituciones químicas. La fracción termoestable e hidrosoluble del factor B se denominó originariamente B₂, G y también P-P (*pellagra preventive*), en consideración a que una falta de ella en las ratas producía alteraciones del crecimiento y una forma de dermatitis descrita originalmente como *pelagra* de las ratas, pero que en la actualidad se denomina *acrodinia*, pues carece de relación con la *pelagra* humana. En 1935 pudo aislarse el factor puro dotado del efecto de crecimiento, pero no del efecto antiacrodínico y para el cual se propuso conservar la designación de B₂, mientras que se indicó la de B₆ para el segundo factor, pues los subíndices 3, 4 y 5 habían sido atribuidos ya a factores hipotéticos. Vitamina C fue la denominación que se le dio a la sustancia que podía curar el escorbuto. Por otra parte, el factor liposoluble A resultó estar constituido por dos factores activos: el que actúa sobre los ojos, para el que se reservó la letra A, y otro que evita la aparición del raquitismo, al que se le asignó la letra D. Otros factores liposolubles fueron denominados E y K (Fieser y Fieser, 1966^b).

En 1931 se determina la constitución química de la vitamina A, en 1933 la de la C, en 1935 la de la B₂ y se aísla la H (biotina). En 1936 se establece la constitución química de la B₁ y la D, entre 1937 y 1938 la de la E, en 1937 se reconoce por primera vez el carácter vitamínico del ácido nicotínico y en 1938 se descubre el ácido pantoténico. En 1939 se produce el aislamiento y la síntesis de la vitamina K y en 1948 se aísla la B₁₂ (Fieser y Fieser, 1966^b).

2.2- RIBOFLAVINA.

[Lactoflavina; Vitamina B₂; Vitamina G; 6,7 - dimetil - 9 - (1' - D - ribitol) isoaloxazina].

La riboflavina es un componente esencial de todas las células vivas y se encuentra, por tanto, en mayor o menor cantidad en muchos alimentos. Es estable en los procesos de preparación de alimentos, excepto cuando hay una exposición excesiva a la luz. Los alimentos que aportan cantidades importantes de riboflavina a la dieta son: la levadura, el hígado, la leche y los huevos. Las hortalizas y las frutas contribuyen con un aporte pequeño, pero constante (Martin, Fullerton y col. 1965).

El hecho de que se encuentre presente en la levadura justifica que también pueda encontrarse en algunos residuales industriales como en la vinaza de destilería, residuo que se obtiene al destilar la miel final que ha sido sometida a una fermentación anaeróbica por la especie *Saccharomyces cerevisiae* para la producción de alcohol (Biar, Serrano y Conde, 1982; Blanco, 1982).

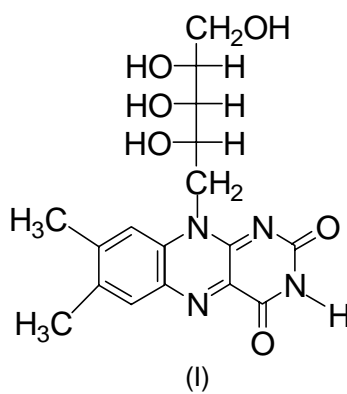
La riboflavina forma parte también de los componentes principales de muchos preparados farmacéuticos, fundamentalmente de formulaciones vitamínicas.

2.2.1- Aislamiento.

La vitamina B₂ se aisló por primera vez de la leche y tratándose de un derivado de la flavina (isoaloxazina) la sustancia fue entonces designada como lactoflavina. Flavinas biológicamente activas fueron aisladas de la clara del huevo y del hígado, denominándose en un comienzo como « ovoflavina » y « hepatoflavina ». Teniendo en cuenta que todas las flavinas con actividad biológica encontradas en la Naturaleza son idénticas, los nombres que indican su origen biológico han sido suprimidos, aceptándose oficialmente, desde 1937 a propuesta del Consejo de Química y Farmacia de la Asociación Americana, el de riboflavina, que indica la existencia de una unidad de D - ribita en la molécula (Fieser y Fieser, 1966^b). Ha sido llamada también vitamina G, en honor al investigador húngaro Golderberg, quien fue el primero en estudiar la pelagra, enfermedad por carencia de esta vitamina. Originalmente se conoció también como vitamina P-P (pellagra - preventive).

2.2.2- Estructura.

La estructura de esta vitamina (I) fue establecida por síntesis en 1935, merced a trabajos simultáneos de Kuhn y de Karrer (Fieser y Fieser, 1966^b). Es un derivado de la isoaloxazina [6,7 - dimetil - 9 - (1' - D - ribitol) isoaloxazina] y su estructura exhibe un anillo de pirimidina (1,3 - diazina), uno bencénico y uno de pirazina (1,4 - diazina). El sistema de anillos condensados formado por pirimidina y benceno es denominado pteridina y al sistema de los tres condensados como isoaloxazina (Suárez, Otazo y Pina, 1988).



2.2.3- Obtención.

La riboflavina es producida en gran escala por síntesis, a partir de 3,4 - xilidina (3,4 - dimetil-anilina), ribosa y ácido barbitúrico, para ser añadida al pan, harina, y otros productos alimenticios y farmacéuticos (Martin, Fullerton y col. 1965).

Algunas cantidades de ella se obtienen de los "caldos de destilería" que quedan como residuo de la destilación del alcohol del mosto de cereales fermentados. De esta manera se obtienen concentrados con un elevado contenido de riboflavina y que se usan extensamente como aditivos en los alimentos para animales (Martin, Fullerton y col. 1965).

La producción de riboflavina suele llevarse a cabo, igualmente, por fermentación, empleando varios tipos de microorganismos, entre ellos *Clostridium butylicum* y *C. acetobutylicum*. Sin embargo, se produce industrialmente mediante fermentación directa empleando los ascomicetes *Eremothecium ashbyii* y *Ashbya gossypii*. Desde el punto de vista industrial suele usarse la especie *Ashbya gossypii* por su mayor estabilidad en la producción de esta vitamina y porque puede sintetizar una cantidad

de riboflavina veinte mil veces superior a la que se necesita para su crecimiento (Herrera y Quintana, 1981, Sasson, 1985).

En la actualidad es posible obtener vitamina B₂ recombinante a gran escala, empleando fermentadores especiales de capacidades adecuadas. Este proceso ha podido ser optimizado en cuanto a los rendimientos de la vitamina (Horiuchi y Higara, 1999).

2.2.4- Propiedades.

La riboflavina es un polvo cristalino, de color amarillo o amarillo anaranjado, con un ligero olor característico. Funde aproximadamente a 280 °C. Es soluble en agua y en etanol, aunque en menor grado que en el agua; es insoluble en éter, cloroformo y otros disolventes orgánicos. Su solución acuosa saturada es neutra al tornasol y presenta una rotación específica de -112° a -122°. Cuando se encuentra en estado seco, la luz difusa no la afecta en forma apreciable, pero en solución, especialmente en presencia de álcali se deteriora con gran rapidez, formando principalmente lumilactoflavina, producto de degradación sin actividad biológica, soluble en cloroformo. La riboflavina es más estable al calor en solución ácida, particularmente a pH de 1,0 a 6,5, pero al irradiarse forma lumicromo, también biológicamente inactivo.

Las soluciones de riboflavina presentan una fluorescencia amarillo verdosa característica, que tiene absorción máxima a 565 nm en el campo ácido de pH. Bajo la acción de los rayos ultravioleta la fluorescencia es mucho más intensa.

Se reduce rápidamente con hidrosulfito o con hidrógeno (Zn/H⁺) a la forma leuco, que es incolora y no fluorescente (Martin, Fullerton y col. 1965; Harrow y Mazur, 1954; Finar, 1959).

2.2.5- Fisiología.

Los efectos de la deficiencia de la riboflavina han sido estudiados intensamente en las ratas, animales donde se manifiestan alteraciones del crecimiento, problemas en la piel y en los ojos.

La deficiencia de riboflavina en animales se caracteriza por un índice reducido de crecimiento, alopecia, dermatitis, queilosis (enrojecimiento de los labios y aparición de fisuras en las comisuras de la boca), cataratas, bradicardia y colapso general. En el hombre los síntomas más frecuentes observados son: queilosis, seborrea característica, conjuntivitis, vascularización de la córnea (invasión de la córnea por

capilares pequeños), fatiga visual, inflamación de la lengua, entre otras. En ocasiones estos estados pueden surgir por otras causas y no necesariamente por deficiencia de riboflavina (Martin, Fullerton y col. 1965).

Actualmente se ha postulado que la neuropatía epidémica puede estar relacionada con déficits nutricionales, como lo es por ejemplo el complejo de vitamina B (De la Fuente, Rodriguez y col. 1997).

2.2.6- Métodos de determinación.

El conocimiento sobre la abundancia y distribución de las vitaminas, en general, en todo tipo de materiales ha constituido uno de los principales problemas desde que se iniciaron las investigaciones sobre ellas, presentando gran interés los métodos para la detección y el análisis, fundamentalmente en productos naturales. Esta problemática actualmente se mantiene, pues sólo se logra la determinación de ellas de manera simultánea y con el empleo progresivo de dichas biomoléculas a nivel industrial ha devenido en una necesidad el uso de numerosos métodos de análisis y su continuo perfeccionamiento.

Para el análisis de la riboflavina, en particular, tradicionalmente se han empleado métodos químicos, físico - químicos y biológicos. Los primeros análisis de esta vitamina se hicieron empleando métodos biológicos. Snell y Strong (1939) fueron los pioneros en el uso de los microorganismos para dichas determinaciones. Esta vía todavía es empleada hoy, con cierto éxito, en algunas determinaciones de riboflavina. El *Lactobacillus casei* es uno de los microorganismos más empleados con tal fin. El mismo es incapaz de sintetizar la riboflavina que necesita para su propio crecimiento, medido por la producción de ácido o por la turbidez del medio de cultivo. Al agregar cantidades graduales de riboflavina a una serie de tubos de cultivo que contienen un medio deficiente en la vitamina, el crecimiento de *L. casei* es directamente proporcional a la cantidad de vitamina agregada, dentro de un cierto intervalo (Martin, Fullerton y col. 1965).

Con el efecto que provoca la riboflavina sobre los animales de experimentación fue posible valorar cuantitativamente la acción de los métodos biológicos. Estos poseen escasa especificidad, lo cual hace que a veces, se tengan que combinar los resultados de al menos dos métodos, sobre todo cuando las muestras a analizar son desconocidas. A pesar de la indiscutible ventaja que presentan, gracias a su elevada selectividad, su uso se ha venido limitando sucesivamente, ya que requieren de un

tiempo considerable para su ejecución, son normalmente caros y sus límites de error son con frecuencia muy amplios.

Los métodos químicos y físico - químicos han ido reemplazando en los últimos 60 años a los métodos biológicos, por ser más rápidos y porque sus límites de error son más pequeños, aunque también presentan desventajas. Dentro de estos métodos se encuentran: el fluorométrico, el fotométrico, el de la lumiflavina y el polarográfico. La elección del método adecuado puede proporcionar mejores resultados y mayor rapidez, ello depende de la naturaleza de la muestra a analizar y del contenido de riboflavina presente en dicha muestra.

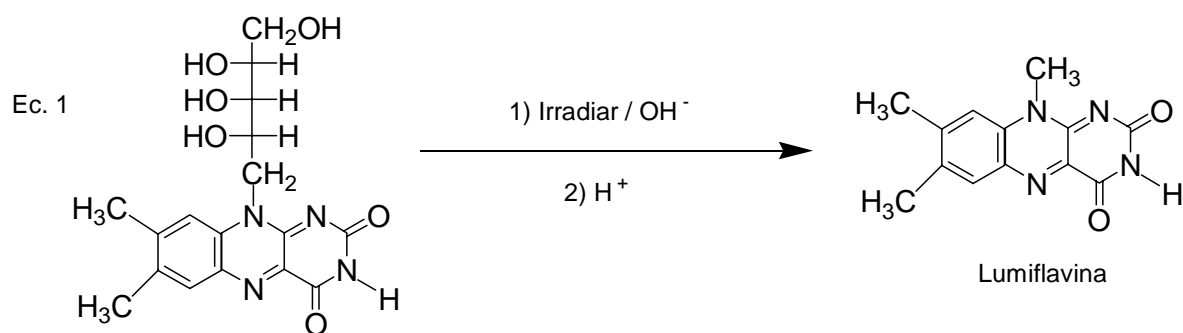
El método fluorométrico se basa en la fluorescencia amarillo - verdosa que produce la vitamina cuando es irradiada con luz ultravioleta (UV). Esta fluorescencia depende de la concentración de riboflavina y del pH de la solución. La máxima intensidad se halla en un rango de pH entre 6 y 7, sin embargo, habitualmente se mide entre 3 y 5, donde la fluorescencia es constante y depende únicamente de la cantidad de riboflavina presente. En la aplicabilidad de este método hay que considerar que altas concentraciones de Fe^{3+} reducen la fluorescencia y si la concentración salina es demasiado alta puede afectar la fluorescencia de los blancos. Los productos de la descomposición de la tiamina también interfieren en la medición (Strohecker y Hanning, 1967).

La fluorescencia de la riboflavina es específicamente apagada cuando a una solución de la misma se adicionan pequeñas cantidades de una solución de una proteína de enlace a riboflavina. A partir de tal valoración fluorescente se puede cuantificar esta vitamina ediferentes tipos de muestras. Hu, Senkbeil y White (1990) realizaron el análisis de riboflavina en soluciones con concentraciones desconocidas de la misma y en tabletas multivitamínicas por adición paulatina de una solución de una proteína de enlace a riboflavina hasta no observar cambio en el valor de la fluorescencia. Los resultados de este experimento demostraron la posibilidad de emplear esta vía para la determinación de la vitamina B₂.

El método fotométrico consiste en la medición fotométrica del color amarillo de la riboflavina. El espectro de absorción en solución neutra o débilmente ácida muestra máximos a 223, 267, 373 y 444 nm. La absorción es máxima a 267 nm, por lo que se recomienda la determinación de la vitamina pura en un espectrofotómetro a esta longitud de onda. Esta medición del color amarillo intrínseco de la riboflavina no es recomendable para todo tipo de muestra, no solamente porque a veces no poseen la concentración mínima de vitamina requerida, sino porque en muchos casos pueden

encontrarse presentes otras sustancias de color amarillo que interfieran con los resultados. Las absorciones interferentes hacen que el método no sea apropiado para la determinación en mezclas, especialmente las que contienen otras vitaminas del complejo B (Strohecker y Hanning, 1967).

En el método de la lumiflavina, la riboflavina, insoluble en cloroformo, se irradia en solución alcalina para formar lumiflavina, la cual se extrae con cloroformo a partir de la solución acidificada (Ecuación 1) y puede determinarse bien sea fotométricamente a 450 nm o fluorométricamente a 513 nm. Esta reacción es específica de la riboflavina, puesto que otras flavinas que intervienen en la determinación directa fluorométrica o fotométrica, no pueden convertirse en lumiflavina.



La determinación fotométrica de la lumiflavina se realiza cuando la muestra a analizar posee una concentración relativamente alta de vitamina B₂ y la medición fluorométrica cuando los niveles de ella suelen ser relativamente bajos.

Este método es el más específico de los procedimientos físico - químicos aplicables al análisis de esta vitamina. Puede emplearse para su detección tanto en productos farmacéuticos como en productos naturales y tiene la ventaja de que no interfiere la presencia de otras sustancias fluorescentes o de coloración amarilla. La mayor desventaja del método es que la escisión de la cadena lateral de ribosa, que conduce a la lumiflavina, no tiene lugar de forma cuantitativa. El rendimiento de lumiflavina depende de las condiciones experimentales y varía normalmente en el intervalo del 60 - 70%, de aquí que el método pierda en sensibilidad, de todas formas el método fluorométrico de la lumiflavina es más sensible que la medición de la fluorescencia intrínseca de la riboflavina (Strohecker y Hanning, 1967).

A este método de la lumiflavina hay que adicionarle como desventaja el propio procedimiento de la obtención de la lumiflavina, que lleva implícito operaciones de

extracción, lo que necesariamente alarga el tiempo de la determinación. Por otra parte, a veces hay que llevar a cabo hidrólisis enzimática, sobre todo cuando se trata de muestras de productos naturales donde además de riboflavina libre existe también su éster fosfórico, extendiendo aún más el proceso.

El método polarográfico tiene su basamento en que la riboflavina, a pH 7,5, presenta una onda característica con un potencial de semionda de -0,47 V, empleando un electrodo de goteo de mercurio. La corriente de difusión y la altura de la onda son proporcionales a la concentración de vitamina dentro del intervalo de 10^{-5} a 10^{-4} mol/L. Gracias a su especificidad y facilidad operacional, este método es particularmente útil para el análisis de riboflavina en preparados farmacéuticos como complejos vitamínicos B o preparados multivitamínicos. Las otras vitaminas no producen cambios significativos en el polarograma de la riboflavina (Strohecker y Hanning, 1967).

Actualmente la necesidad de determinar riboflavina en muestras de los más variados orígenes ha conllevado a la modificación de algunos de los métodos ya mencionados o a que se apliquen otros, buscando fundamentalmente precisión y especificidad, lo que constituye hoy día una de las grandes dificultades en el desarrollo de técnicas analíticas para complejos vitamínicos, principalmente si los métodos a utilizar se emplearan en estudios de estabilidad. En muchos casos se trata de estandarizar un procedimiento para la cuantificación de dicha vitamina.

Söderhjelm y Liudquist (1976) realizaron el análisis simultáneo de riboflavina, piridoxina y nicotinamida por polarografía diferencial de impulso. Wang, Luo y col. (1985) demostraron que era posible cuantificar cantidades significantes de riboflavina y de otras flavinas análogas controlando su acumulación adsorptiva sobre un electrodo de goteo de mercurio estático seguido de la medición voltamétrica de las especies en la superficie de la gota, se utilizó un electrodo de Ag/AgCl como electrodo de referencia, un electrodo de gota de mercurio estático como electrodo de trabajo y como electrodo auxiliar uno de alambre de platino. La alta sensibilidad de este método de voltametría de redisolución adsorptiva está acompañado de una buena reproducibilidad de los resultados. Sawamoto (1985) realizó el análisis de riboflavina por esta misma vía pero utilizó como electrodo de referencia uno de calomel saturado.

Park y Cho (1988) determinaron cuantitativamente tiamina, riboflavina, piridoxina y nicotinamida en preparados multicomponentes mediante análisis espectrofotométrico UV.

Pérez (1994) reportó la determinación fotocinética de riboflavina y de 5 - fosfato de riboflavina. El método se basa en la fotorreducción de los compuestos enlazados por el ácido etilendiaminotetraacético (EDTA). El desarrollo de dicha reacción fotoquímica fue monitoreada haciendo uso de la reacción quimiluminiscente peróxido - luminol.

El empleo de técnicas combinadas ha sido también reportado. Yang, Han y col. (1999) emplearon un filtro raíz cuadrada de Kalman combinado con espectrometría para la determinación simultánea de concentraciones de vitamina B₁, vitamina B₂ y nicotinamida en mezclas sintéticas y en tabletas comerciales compuestas por vitaminas del complejo B. Con las mezclas sintéticas los resultados obtenidos fueron satisfactorios, lográndose recobrados entre 97 - 103,3% y con las tabletas comerciales los resultados también fueron buenos de acuerdo con el contenido de vitaminas indicado en la etiqueta. Yang y Chang (1996) realizaron la determinación simultánea de tiamina y riboflavina en preparados multivitamínicos empleando análisis espectrofotométrico y de inyección de flujo. Otles (1991) se basó en una combinación de la fluorometría y la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) para la determinación comparativa de tiamina y riboflavina en frutas, vegetales, jugos de frutas, leche y harina.

La cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) ha sido empleada desde hace mucho tiempo en el análisis de vitaminas, al respecto se encuentran los trabajos de Toma y Tabeckia (1979), para el análisis de riboflavina en arroz y productos del arroz, los de Camella y Bichi (1983) para la determinación simultánea de vitaminas hidrosolubles (tiamina, riboflavina, cianocobalamina, piridoxina, etc.) contenidas en preparados multivitamínicos empleando un detector UV y los de Ichinose y Adachi (1986) que también emplearon HPLC pero con un detector fluorescente para el análisis de tiamina y riboflavina en fluidos biológicos. La determinación cuantitativa de riboflavina y de nicotinamida en tabletas por HPLC fue llevada a cabo por Fang (1990). Hou y Wang (1999) realizaron la detección de la vitamina B₂ empleando como fase estacionaria una columna de Nucleoside C18 y realizando la detección por amperometría. Moncado y Ruíz (2000) encaminaron sus trabajos a la estandarización y validación de un método para la determinación simultánea de tiamina, riboflavina, niacina y ácido fólico empleando igualmente HPLC. Con el mismo objetivo, en cuanto a validación, Díaz y Fariñas (2000), investigadores del Centro de Investigación y Desarrollo de Medicamentos de la Ciudad de la Habana, reportaron los resultados de la medición de mononitrato de tiamina, clorhidrato de piridoxina y nicotinamida por HPLC en el suplemento nutricional neovitamin II, empleando una columna de fase reversa y un detector UV - Visible. El método se empleó para el control de la calidad y

estabilidad del fármaco, obteniéndose resultados satisfactorios en las tres vitaminas estudiadas.

Por la necesidad imperante que tienen muchos médicos cubanos de conocer el estado vitamínico de sus pacientes y porque en la gran mayoría de los centros hospitalarios no existen técnicas para su detección, Pérez, Hernández y Amador (2000) del Instituto Superior de Medicina Militar "Dr. Luis Díaz Soto" de la Ciudad de la Habana, propusieron una vía para instrumentar y estandarizar un procedimiento para la cuantificación de riboflavina sérica por el método fluorométrico desarrollado por Natelson y col., éste a pesar de ser un método laborioso y de no constituir una micro técnica, demostró poseer precisión y exactitud, además de que los reactivos que se emplean son de fácil adquisición y preparación. Por los resultados obtenidos se decidió implementar la técnica en el servicio de Laboratorio Clínico del Hospital de referencia.

Todo lo anterior demuestra las deficiencias que existen actualmente con los métodos para la cuantificación de vitaminas y en especial, la riboflavina en sustratos de diferente naturaleza con un elevado grado de sensibilidad, especificidad y a la vez de manera sencilla y rápida. Dentro de las limitaciones más importantes, de forma general, se pueden destacar:

- escasa especificidad
- límites de error amplios
- altos costos, en unos casos por los reactivos y en otros por el equipamiento que se requiere
- determinación simultánea con otras vitaminas
- interferencias de sustancias coloreadas
- no posibilidad de hacer análisis de rutina
- elevada laboriosidad, que se traduce en tiempos considerablemente largos para la ejecución de la determinación.

Los aspectos antes expuestos permiten avalar la necesidad de buscar un método específico, de alta sensibilidad, rapidez y confiabilidad para el análisis de riboflavina. En este sentido el inmunoensayo cumple con dichos requerimientos. La obtención de un anticuerpo que reconozca a la riboflavina y que pueda ser acoplado a técnicas inmunoenzimáticas o cromatográficas permitiría la detección de esta vitamina en sustratos complejos, como son fórmulas farmacéuticas, residuales industriales, líquidos biológicos, etc. Los anticuerpos específicos aislados por ejemplo por una cromatografía de afinidad, a partir de antisueros policlonales, permite elevar

considerablemente la especificidad y sensibilidad de los métodos en los que se utilicen.

Es muy conocido actualmente el uso de los kits diagnósticos visuales que usan antígenos, tanto recombinantes, sintéticos como naturales, con niveles de sensibilidad y especificidad muy elevados, para el uso manual o automatizado, que permiten procesar bajos y altos números de muestras y que son diseñados, precisamente, para aquellos lugares donde se procesan muestras con condiciones mínimas de laboratorio.

2.3- HAPTENOS. GENERALIDADES.

El término hapteno fue sugerido por primera vez por Landsteiner en 1921. Según sus investigaciones, en los órganos de varias especies de animales se encontraban presentes sustancias que provocaban la producción de anticuerpos, tal como la hemolisina, cuando se inyectaba a otras especies. Esa sustancia podía dividirse en dos fracciones, una porción soluble en álcali, probablemente de naturaleza lipídica, que tenía la propiedad de reaccionar específicamente *in vitro* pero, desprovista de propiedades antigénicas. Para este tipo de sustancias sugirió el término hapteno, planteando que solamente el complejo completo (hapteno + proteína) actuaba como un antígeno.

Fieser y Fieser (1966^a) se refiere al término hapteno como la fracción no proteínica de un antígeno, responsable de su especificidad para el anticuerpo.

Davis, Dulbecco y col. (1980) definieron a los haptenos como sustancias carentes de capacidad inmunológica, que reaccionan selectivamente con anticuerpos específicos. Esta definición no hace referencia alguna a la masa molecular, ya que según se plantea existen macromoléculas que pueden funcionar como haptenos. Aunque desde el punto de vista formal exista una clara diferencia entre antígenos y haptenos, en la práctica resulta difícil, a veces, decidir si una sustancia es débilmente inmunogénica o si carece totalmente de propiedades inmunológicas. Sin embargo, lo más corriente es que las moléculas de pequeño tamaño (masas moleculares menores de 1000) no posean propiedades de este tipo, a menos que se encuentren unidas de forma covalente a proteínas, *in vivo* o *in vitro*. Ciertas macromoléculas tan sólo se hacen inmunogénicas en caso de hallarse unidas a proteínas, no siendo necesario que la unión sea del tipo covalente, probablemente debido al efecto acumulativo de los numerosos enlaces no covalentes entre estas moléculas de considerable tamaño que dan lugar a complejos estables (no disociables).

Según Stryer (1988) los haptenos son moléculas foráneas y pequeñas que no tienen la posibilidad de estimular la formación de anticuerpos, sin embargo pueden intervenir en dicha formación si se encuentran enlazados a especies moleculares portadoras de grupos químicos o determinantes antigénicos.

Piatkin y Krivoshein (1986) se refieren a los haptenos como antígenos incompletos que no provocan la formación de anticuerpos, ni sensibilización de los linfocitos. La adición de proteínas, aún en cantidades insignificantes, le transmite a los haptenos propiedades de antígenos completos, sustancias que se caracterizan por tener una información extraña y provocar la formación de anticuerpos o sensibilización de los linfocitos en el organismo, reaccionando con los mismos, *in vivo* como *in vitro*. A estas proteínas se les denominan transportadoras.

De lo anterior puede plantearse que los haptenos son sustancias de naturaleza química sencilla, casi siempre de bajas masas moleculares, que son incapaces de activar, por sí solas, el sistema inmunológico del organismo, pero, en cambio, si se acoplan o conjugan a algún sustrato proteico e inmunogénico pueden comportarse como inmunógenos. A estas proteínas se les conocen como proteínas portadoras o carrier.

Los haptenos se clasifican, según Cushing y Campbell (1960) en haptenos complejos y haptenos sencillos. Los haptenos complejos se combinan con moléculas del anticuerpo y forman un complejo antígeno - anticuerpo insoluble, mientras que los sencillos se combinan pero sin experimentar precipitación. Un antisuero obtenido por inmunización de conejos con un antígeno artificial, preparado por reacción química del hapteno, ejemplo ácido arsanílico, con una proteína (ácido arsanílico - azoproteína), contendrá anticuerpos que reaccionarán específicamente con el ácido arsanílico, lo mismo si está libre que combinado con otras moléculas proteicas homólogas o heterólogas. Cuando se adiciona al antisuero el antígeno provisto de dos o más grupos arsanílicos, se produce un precipitado específico del anticuerpo y del antígeno. Esto constituye un ejemplo de hapteno complejo. Si el antisuero se mezcla con ácido arsanílico puro no ocurre nada a simple vista, porque el hapteno simple reacciona sólo con un punto combinante del anticuerpo. Si posteriormente se añade el antígeno a esa mezcla no habrá formación de precipitado.

Los anticuerpos que son específicos para determinados haptenos se obtienen, generalmente, a partir de sustancias con capacidad inmunológica, preparados uniendo el hapteno de forma covalente a una proteína (Davis, Dubelcco y col. 1980).

Son clásicos los primeros estudios realizados por Landsteiner (1922, 1927), investigaciones que estuvieron basadas en el hecho de que los antisueros dirigidos contra una proteína conjugada, tal como la azoglobulina - sulfanilato, forman complejos insolubles y específicos con otras proteínas conjugadas con el mismo sustituyente azo, por ejemplo, azoalbúmina - sulfanilato, pero no los forma con la propia albúmina. De aquí que la reacción sea específica para el grupo azosulfanilato. Los anticuerpos reaccionan con mayor eficacia con el antígeno que estimula su formación que con los otros antígenos, dentro de este contexto, el primer antígeno suele denominarse antígeno homólogo y los otros antígenos, heterólogos. De manera semejante, los haptenos sensiblemente parecidos a los grupos hapténicos del inmunógeno, fueron denominados haptenos homólogos (Davis, Dubelcco y col. 1980).

Algunos anticuerpos en presencia de un conjugado hapteno - proteína reaccionan exclusivamente con el grupo hapteno, pues no pueden combinarse mejor con el inmunógeno que con los conjugados del mismo hapteno con proteínas afines. No obstante, muchos otros anticuerpos muestran "especificidad de portador"; para la reactividad máxima (afinidad máxima) se requiere no sólo del grupo hapteno y del residuo de aminoácido a que está fijado, sino también, aunque en grado variable, de los residuos contiguos y no sustituidos del inmunógeno (Davis, Dubelcco y col. 1980).

En 1933, Medveczky hizo referencia a la nomenclatura de los haptenos y denominó N - haptenos a aquellos que no manifestaban reacción con un antisuero, por el contrario si tenía lugar una reacción evidente, por ejemplo una precipitación, lo designó como R - hapteno. Planteó, además, que los compuestos derivados de los haptenos podían ser llamados haptidas y podían ser tanto del tipo N como R, si el compuesto podía estimular la formación de anticuerpos se designaba como A - haptida. Al parecer esta forma de hacer referencia a los haptenos no fue muy empleada, pues estos términos no son comunes en la literatura.

2.4- CONJUGACIÓN DE HAPTENOS A PROTEÍNAS.

Los haptenos se caracterizan por presentar en sus moléculas una gran diversidad de grupos reactivos, los cuales pueden ser utilizados para la conjugación, pero frecuentemente son sus inmunodeterminantes específicos los que distinguen a los

haptenos de otras moléculas relacionadas. El uso de estos grupos funcionales para formar el enlace en el conjugado disminuye la especificidad de los anticuerpos anti - haptenos. Esto puede ser ilustrado a partir de las pruebas realizadas con la morfina, en donde se pudieron obtener los anticuerpos contra la 3 - O - carboximetilmorfina acoplada a la seroalbúmina bovina (BSA), los mismos reconocieron mejor a la codeína que a la morfina (Bartos, 1988).

Un gran número de macromoléculas han sido conjugadas a haptenos para la preparación de:

- complejos inmunogénicos hapteno - proteína para la producción de anticuerpos anti - haptenos,
- reactivos para la detección de haptenos mediante ensayo inmunoenzimático (EIA),
- y reactivos, los cuales, conjuntamente con los anticuerpos anti - haptenos, restringen o incrementan la aplicabilidad del EIA en fase sólida (Bartos, 1988).

Muchas de las reglas básicas para la conjugación de haptenos a portadores fueron establecidas por Landsteiner en 1945. Para poder realizar una inmunización es necesario un determinado número de grupos haptenos por cada molécula de proteína (ejemplo 8 - 25 por molécula de BSA), lo cual puede ser diferente para un EIA. Landsteiner observó que el anticuerpo es dirigido primeramente a la parte del hapteno que se encuentra más alejado del sitio donde se encuentra el enlace con la proteína. Sin embargo, inmunógenos preparados por conjugación de haptenos a proteínas generan, frecuentemente, anticuerpos contra dicho enlace. Ello conllevó a definir tres tipos de heterologías, cualquiera de ellas mejora la detectabilidad:

- 1- heterología de puente, diferentes agentes de entrecruzamiento para los haptenos usados en inmunización y EIA ;
- 2- heterología de sitio, enlaces por diferentes posiciones del hapteno;
- 3- haptenos diferentes, pero relacionados entre sí, unidos al mismo sitio a través del mismo tipo de enlace (Bartos, 1988).

En la conjugación de haptenos, es importante la elección del portador. Los más comunes son seroalbúminas de varias especies, generalmente las solubles en agua, como la hemocianina (KLH), tiroglobulina, ovalbúmina o fibrinógeno.

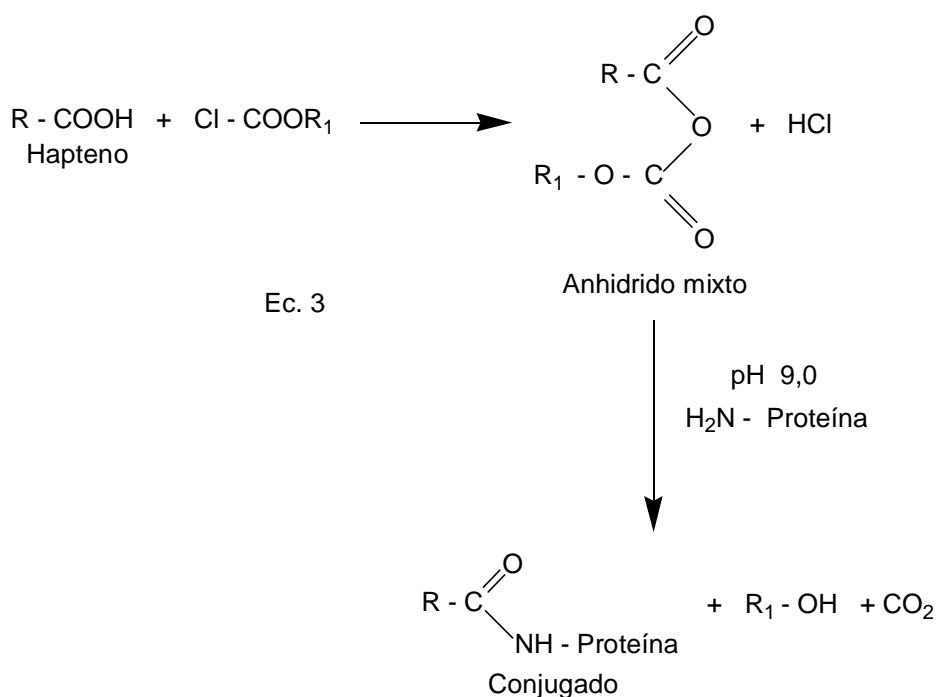
2.4.1- Procedimientos para la conjugación.

La unión de los haptenos a las proteínas generalmente ocurre por los grupos más reactivos de las proteínas: ϵ - y α - amino (pKa 10 y 8 respectivamente), fenólico, sulfhidrilo (pKa 9), imidazólico (pKa 7) y carboxilo (pKa 2-4) (Bartos, 1988).

anteriores, se emplean fundamentalmente tres métodos para su conjugación con las proteínas (Bartos,1988):

- 1- método del anhídrido mixto,
- 2- método de la carboxidiimida (CDI);
- 3- método del éster N - hidroxisuccinimida (NHS).

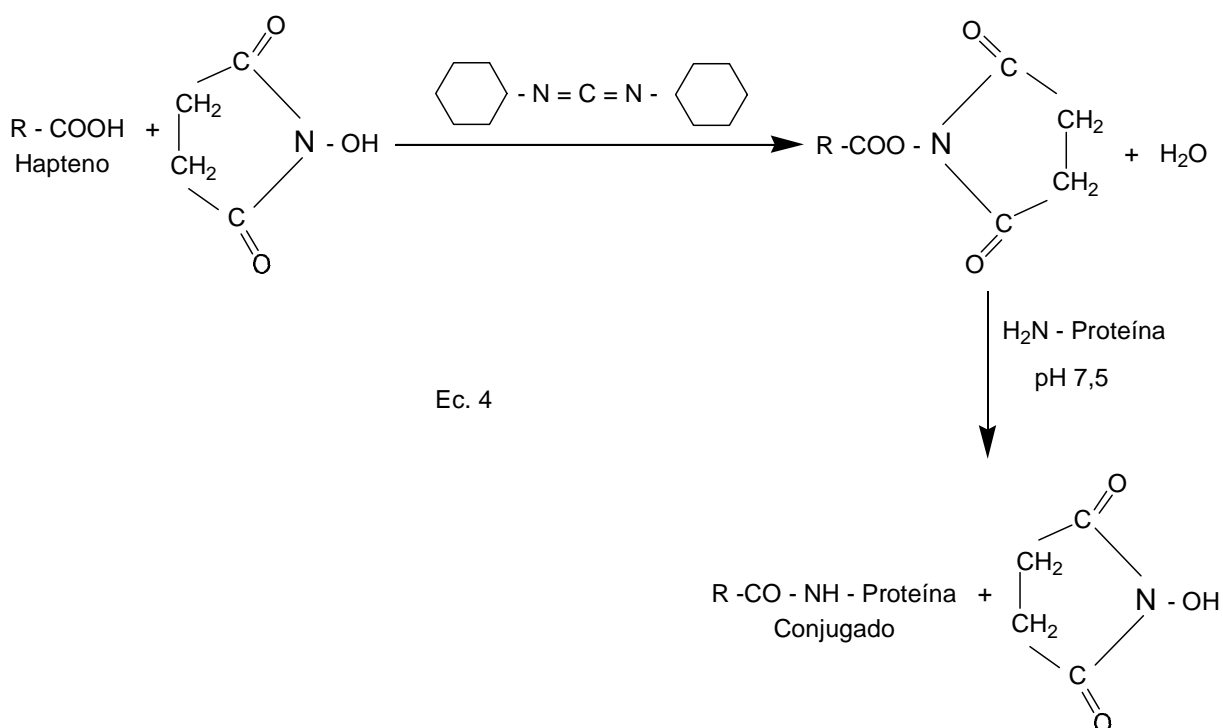
El más utilizado es el método del anhídrido mixto, por su sencillez y por ser un procedimiento directo. Consiste en hacer reaccionar el hapteno con un clorofornato de alquilo (Ecuación 3), el anhídrido de ácido formado se hace reaccionar con los grupos aminos libres de la proteína a pH 9. Usualmente se emplean de 10 - 20 mol del hapteno por molécula de proteína.



En el método de la carboxidiimida (CDI) se emplean como reactivos: 1- etil - 3 - (3 - dimetilaminopropil) carbodiimida (EDC); N, N' - dicitlohexilcarbodiimida (DCC) y p - toluenosulfonato de 1 - ciclohexil - 3 - (2 - morfoliniletíl) carbodiimida (CMC), entre otros.

Las condiciones para la conjugación son simples: el portador, un exceso del hapteno, el reactivo, pH 6 y agitación por menos de 30 min. Se obtiene aproximadamente un 20% del conjugado (Bartos, 1988).

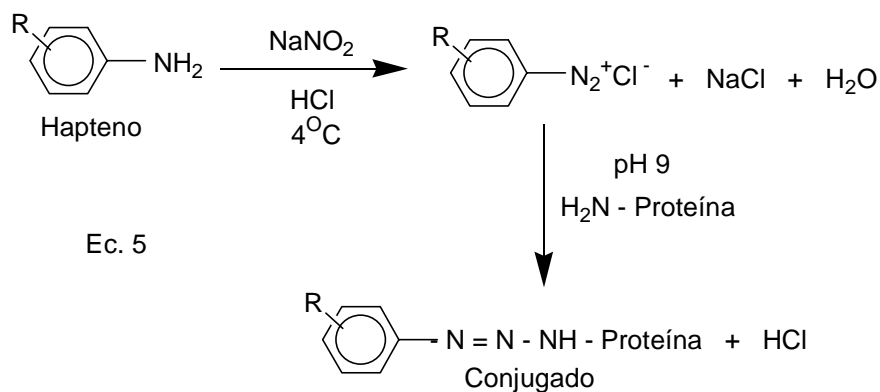
Una variante del método de la CDI es el procedimiento del éster N - hidroxisuccinimida (NHS), en el cual el hapteno conteniendo el grupo carboxilo se acopla a la NHS en presencia de DCC, el éster NHS obtenido se purifica y a pH 7,4 se realiza la reacción con la proteína (Ecuación 4). El aislamiento del éster NHS antes del acoplamiento con la proteína permite controlar el radio molar hapteno/ proteína y la eliminación de las interferencias por la presencia de CDI libre. Por otra parte, el éster NHS es estable si se mantiene anhidro (Bartos, 1988).



Haptenos con grupos amino o grupos nitro reducibles.

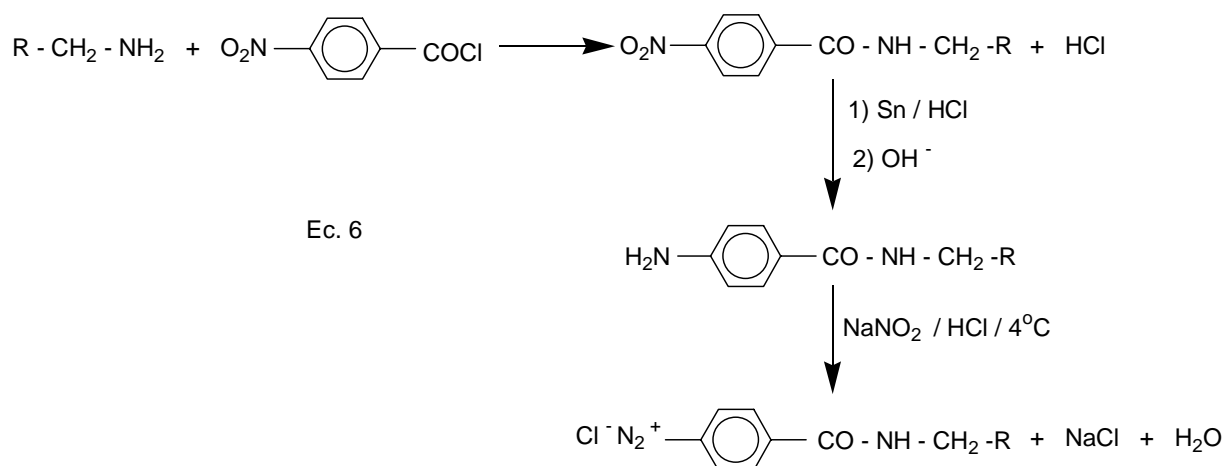
Los haptenos que presentan en su constitución grupos amino ($-NH_2$) pueden ser de naturaleza, tanto aromática como alifática.

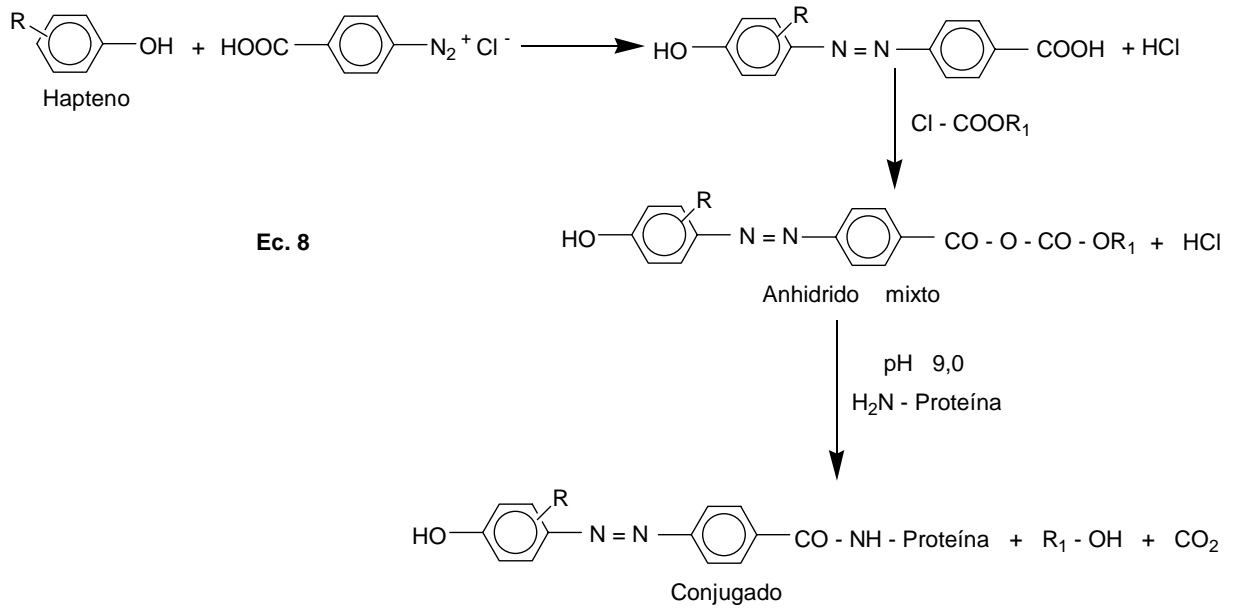
Los trabajos clásicos de Landsteiner fueron realizados con aminas aromáticas primarias. Estas son convertidas a las correspondientes sales de diazonio por reacción lenta con ácido nitroso (reacción de diazotación) y posteriormente se lleva a efecto la conjugación con la proteína a pH 9 (Bartos, 1988) (Ecuación 5).



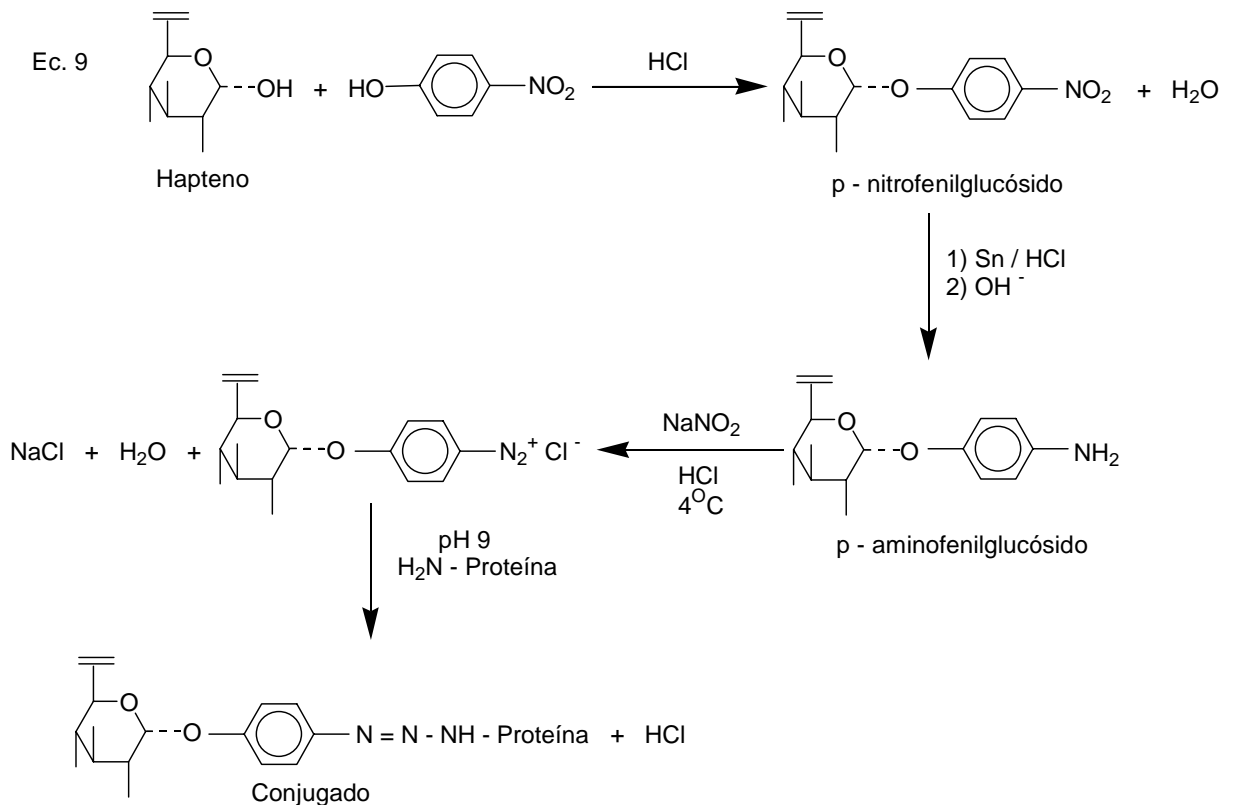
Los haptenos con grupos amino alifáticos pueden ser conjugados a las proteínas por varios métodos. Entre ellos adaptaciones de los ya mencionados, tal como el de la CDI. En algunos casos, se recurre a la conversión de la amina alifática en amina aromática por tratamiento con cloruro de p - nitrobenzoilo y posterior reducción a la p - aminobenzoilamida. Luego de la correspondiente diazotación, este producto puede acoplarse a la proteína (Bartos, 1988) (Ecuación 6).

Los haptenos que presentan grupos nitro (-NO₂) pueden ser acoplados a proteínas una vez reducidos a aminas y posterior formación de la sal de diazonio correspondiente.

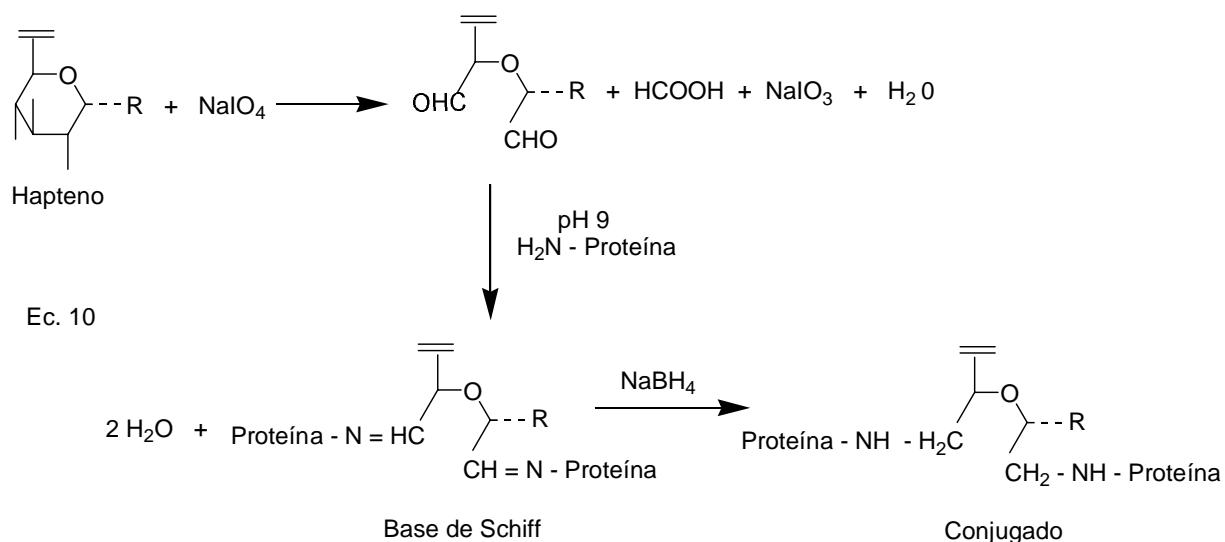




Los azúcares pueden ser activados por el método de Landsteiner establecido en 1945. Esta vía incluye la formación del p - nitrofenilglucósido, seguido de una reducción del grupo nitro, la diazotación del grupo amino y por último la copulación con la proteína (Bartos,1988) (Ecuación 9).

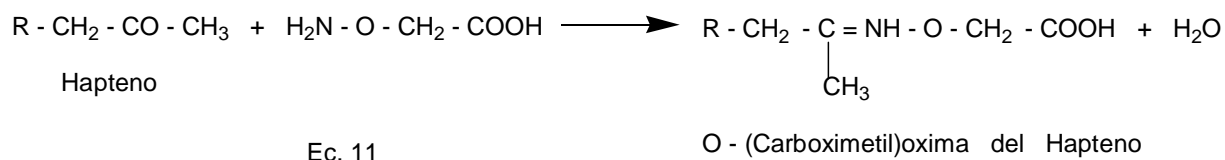


Un método sencillo de conjugación de azúcares a portadores es el que está basado en la oxidación de los grupos hidroxilo vecinales de la molécula del azúcar a grupos formilo, mediante un agente reductor selectivo como lo es el metaperiodato de sodio. El aldehído así obtenido se hace reaccionar con la proteína a pH 9,0, formándose una base de Schiff, la que posteriormente se somete a un proceso de reducción (Bartos, 1988) (Ecuación 10).



Haptenos con grupos carbonilo.

Cuando en la molécula del hapteno se encuentra presente un grupo carbonilo (-CO), bien sea de aldehído o de cetona, éste puede ser transformado en grupo carboxilo mediante la formación de O - (carboximetil)oximas. La reacción se efectúa tratando el hapteno con O - (carboximetil)hidroxilamina (Ecuación 11). La reacción del ácido carboxílico formado con la proteína se continúa por uno de los métodos antes mencionados (Bartos, 1988).



Los haptenos que presentan grupos formilo pueden ser acoplados directamente a través de la formación de las bases de Schiff, las cuales son transformadas a aminas por reducción con borohidruro de sodio (Ecuación 10).

2.5- DETERMINACIÓN DEL GRADO DE SUSTITUCIÓN EN LA MOLÉCULA DEL PORTADOR.

Para llevar a efecto un ensayo inmunoenzimático (EIA) es importante establecer el grado de sustitución en la proteína portadora. El número de grupos amino sustituidos con haptenos en las moléculas de los portadores puede establecerse, convenientemente, por determinación del número de grupos amino libres antes y después de la sustitución (Bartos, 1988). Con este fin se emplean diversos métodos, como el establecido por Habeeb (1966), que tiene su basamento en el desarrollo de un color por reacción del ácido 2,4,6 - trinitrobenzenosulfónico (TNBS) con los grupos ϵ - amino libres de las proteínas. Este método emplea dodecilsulfato de sodio (SDS) para solubilizar la proteína y evitar su precipitación cuando se acidifica el medio. La lectura se realiza a 335 nm.

Yoshioka, Kobayashi - Iwase y col. (1987) y Yoshioka, Iwai - Yamasaki y col. (1987) emplearon el reactivo de Doty para la determinación del número de moléculas de L - epinefrina y de L - norepinefrina, respectivamente, que se conjugaron por mol de BSA. También es un método espectrofotométrico y la lectura se realiza a 550nm,

Yoshioka, Aso y col. (1987) prepararon antígenos por conjugación del ácido vanilmandélico (VMA) y del ácido homovanilínico (HVA) con seroalbúmina humana (HSA). En este caso los radios molares hapteno/proteína en los conjugados fueron determinados por mediciones de las densidades ópticas de soluciones del antígeno, de los haptenos y de la HSA a 280 nm. De igual manera, por valoración espectrofotométrica pero a 480 nm, Nogusa, Yano y col. (1995) estimaron el contenido de doxorubicina (DXR) en conjugados carboximetilpullulan - péptido - doxorubicina.

Shoyama, Fukada y col. (1993) determinaron de forma directa el contenido de tebaína, codeína y morfina en conjugados tebaína - BSA, codeína - BSA y morfina - BSA empleando el método de desorción e ionización por láser, auxiliado por matriz acoplado a espectrometría de masa (MALDI- MS). Por esta misma técnica pero utilizando un espectrofotómetro con un analizador de tiempo de vuelo (MALDI _

TOFMS), Hashimoto, Yamashita y col. (1996) pudieron calcular de forma muy rápida el número de moléculas de haptenos enlazadas a la BSA.

2.6- COMPUESTOS EMPLEADOS COMO HAPTENOS.

La conjugación de haptenos a proteínas data del año 1921, como resultado de las investigaciones desarrolladas por Landsteiner. A partir de aquí y hasta la actualidad han sido empleados como haptenos un gran número de compuestos de estructuras muy diversas. Dentro de ellos se pueden citar a los carbohidratos, según los trabajos realizados por Stanley (1950); Glynn y Holborow (1953); Borek, Silverstein y Gell (1964); Allen, Goldstein y Iyer (1967); Jolley, Glaudemans y col. (1974). Kato, Mifuru y col. (1992) reportaron la obtención de los conjugados dextrana - caseína y galactomanana - caseína mediante la reacción de Maillard, la formación de un enlace covalente entre los polisacáridos y la proteína fue confirmado por electroforesis en gel de poliacrilamida empleando dodecilsulfato de sodio (SDS - PAGE) y cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). Se demostró que la actividad emulsificante de ambos conjugados era 1,5 veces mayor que la de la caseína y la estabilidad de la emulsión 10 veces superior a la de la caseína.

Hattori, Imamura y col. (1994) prepararon el conjugado carboximetildextrana - lisozima empleando el método de la carboxidiimida (CDI). El enlace entre el carbohidrato y la proteína fue confirmado por SDS - PAGE, focalización isoelectrica y espectro infrarrojo (IR). Se demostró que el conjugado mantenía alrededor del 60% de la actividad enzimática de la lisozima nativa a 4 y 80 °C, que era más estable a la proteólisis que la proteína nativa y que la temperatura de desnaturalización era la misma que para la lisozima, 73 °C.

Con el objetivo de obtener un antisuero específico para digitoxina, un glucósido cardíaco natural, Fujii, Ikeda y col. (1994) reportaron la obtención de cuatro nuevos tipos de conjugados hapteno - seroalbúmina bovina (BSA) a partir de digitoxina. Los haptenos fueron enlazados a la proteína portadora a través de puentes hemisuccinato y hemisuccinilglicina con las posiciones C - 3' y C - 3" de la cadena de la digitoxina. El antisuero fue obtenido por inmunización de conejos con cada uno de los conjugados digitoxina - BSA, y las propiedades de los antisueros fueron investigadas mediante radioinmunoensayo (RIA).

Nagasawa, Takahashi y Hattori (1996) prepararon dos conjugados β - lactoglobulina (β - LG) - carboximetildextrana (CMD) (10 A y 10 B) por el método de la

carboxidiimida (CDI) empleando como reactivo 1 - etil - 3 - (3 - dimetilaminopropil) carbodiimida (EDC). La diferencia entre ambos conjugados radicó en el procedimiento experimental utilizado para su preparación. La purificación de los mismos se efectuó mediante precipitación por salado, diálisis y cromatografía de intercambio iónico. Se evaluaron las propiedades emulsificantes de los conjugados β - LG - CMD, resultando ser más alta que la correspondiente a la β - LG bajo las mismas condiciones de calentamiento. Se llevó a efecto, también, un análisis conformacional de los conjugados mediante los espectros fluorescentes y medición de la capacidad para formar enlaces con retinol, indicando que la molécula de la β - LG en cada conjugado mantenía su estado nativo. Sin embargo, se encontró un cambio parcial en la conformación cuando se realizó el análisis mediante un espectro de dicroísmo circular y afinidad de enlace de los anticuerpos monoclonales con los epitopes en las regiones $^{15}\text{Val} - ^{29}\text{Ile}$ (cadena β) y $^{125}\text{Thr} - ^{135}\text{Lys}$ (α - hélice). En el conjugado 10 A, la conformación alrededor del sitio $^{15}\text{Val} - ^{29}\text{Ile}$ resultó ser similar a la forma nativa, mientras que en $^{125}\text{Thr} - ^{135}\text{Lys}$ hubo un cambio, lo cual sugiere una destrucción de la conformación alfa - hélice de la proteína. En el conjugado designado como 10 B, la conformación alrededor del sitio $^{125}\text{Thr} - ^{135}\text{Lys}$ mantuvo su forma nativa, mientras que la región $^{5}\text{Val} - ^{29}\text{Ile}$, la cual está en el interior de la molécula nativa de β - LG, se encontraba expuesta.

Hattori, Nagasawa y col. (1994) estudiaron otras propiedades de estos conjugados β - LG - BSA (10 A y 10 B). Para la confirmación de un enlace covalente entre la proteína y el polisacárido realizaron focalización isoeléctrica y SDS - PAGE. Se determinaron los puntos isoeléctricos de cada conjugado, resultando valores de 4,7 para 10 A y de 4,8 para 10 B, muy por debajo del de la β - LG nativa (5,2). Los radios molares CMD :

β - LG fueron de 7 : 2 para el conjugado 10 A y de 1 : 1 para 10 B. Esta composición fue determinada por medición de la absorbancia a 280 nm y por el método del fenol - sulfúrico. La masa molecular resultó ser de 450 000 y 240 000 para 10 A y 10 B, respectivamente, siendo las masas moleculares de la β - LG y de la CMD 18 400 y 13 000, respectivamente. La temperatura de desnaturalización de cada conjugado fue aproximadamente de 89 °C, muy por encima de la de la β - LG nativa.

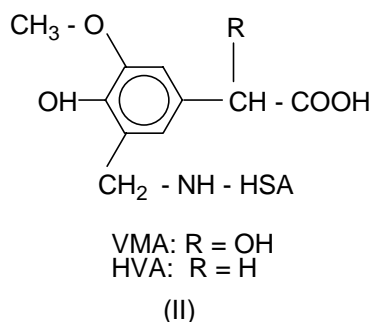
Teniendo en cuenta el criterio de que la glicosilación en ausencia de enzimas involucrando cadenas de sacáridos con más de 3 ó 4 residuos de azúcares era una reacción extremadamente improbable, Berry, Chuen y Andrew (1998) obtuvieron conjugados polipéptido - polisacáridos vía formación de la base de Schiff, involucrando el rearrreglo de Amadori.

Más recientemente, Shao - jie, Tanaka y Yukijiro (1999) trabajaron en el establecimiento de un método para la detección de glucurónidos de ácido glicirrético empleando un Western blotting. En membranas de difluoruro de polivinilideno se prepararon los conjugados glucurónidos - BSA, de esta manera se obtuvieron manchas de anticuerpos monoclonales contra glicirrizina, esta vía empleando inmunomarcadores para glucurónidos fue más sensible que otros métodos de marcaje.

Otros compuestos que han sido empleados como haptenos son los ácidos carboxílicos. En este caso se pueden citar las investigaciones realizadas por Karush y Marks (1957), donde fueron preparadas azoproteínas, por acoplamiento de ácido fenil (p - aminobenzoilamino) acético a la gamma - globulina bovina, para la inmunización de conejos. Por otra parte Baner (1964) empleó como hapteno ácido p - aminobenzoico y Schechter, Schechter y Sela (1970) utilizaron conjugados péptido - ácido ϵ - aminocaproico como inmunógenos y como antígenos en reacciones cruzadas, con el objetivo de evaluar en qué extensión los métodos de inhibición de haptenos reflejan la medida y la naturaleza del determinante antigénico al cual el animal se encuentra expuesto.

Los ácidos vanilmandélico (VMA) y homovanilínico (HVA) son metabolitos ácidos de las catecolaminas excretados en la orina y su detección es útil en el diagnóstico de neuroblastoma, un tipo de cáncer del sistema nervioso central, en niños y adultos. Existen varios métodos diagnósticos para la detección de estos ácidos. El VMA puede ser cuantificado mediante el método colorimétrico usando un reactivo diazocoplante, pero determinados constituyentes de la orina provocan interferencias. Para el HVA el método fluorométrico resulta inconveniente por el pretratamiento que se debe realizar a la muestra de orina. La técnica de HPLC es exacta para la cuantificación de estos ácidos, pero no resulta fácil la medición de muchas muestras en un lapso de tiempo corto. El uso de la cromatografía gaseosa conjuntamente con la espectrometría de masas es la más conveniente, sin embargo, el equipamiento es altamente costoso y tiene que ser operado por técnicos muy expertos. Por las razones anteriores Yoshioka, Aso y col. (1987) aplicaron el inmunoensayo. Los antígenos fueron preparados por conjugación del VMA y del HVA con seroalbúmina humana (HSA) [VMA - HSA y HVA - HSA (II)] mediante la reacción de Mannich. La conjugación fue confirmada por electroforesis sobre acetato de celulosa. El antígeno se inyectó a ratones Balb/C. 10 hibridomas del VMA y 8 del HVA fueron analizados mediante un ensayo inmunoenzimático en fase sólida (ELISA). El anticuerpo monoclonal fue purificado y examinado por un ELISA. 6 anticuerpos del VMA tuvieron una alta afinidad por el VMA, más que otros metabolitos de la catecolamina, 2 tuvieron afinidad por la HSA y

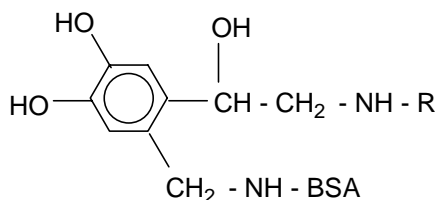
otros 2 tuvieron igual afinidad por ambos metabolitos, VMA y HVA. Por otra parte 6 anticuerpos del HVA tuvieron alta afinidad por el HVA. Las curvas construidas con los anticuerpos de elevada afinidad para VMA o para HVA fueron lo suficientemente sensibles como para medir niveles de VMA o de HVA en muestras de orina.



Los ácidos grasos por poseer bajas masas moleculares, cadenas carbonadas alifáticas y lineales y por encontrarse en todas las células vivientes no son capaces de inducir una respuesta inmune. Maneta - Peyret, Picard y col. (1992) examinaron, precisamente, la posibilidad de producir anticuerpos dirigidos contra la cadena lineal de los ácidos palmítico, esteárico y oleico. Para la preparación de los conjugados hapteno - proteína, los ácidos grasos fueron convertidos en sus correspondientes cloruros de ácido y mezclados con BSA empleando como disolvente hexametilfósforo triamida (HMPT). La valoración de la formación del enlace covalente en los conjugados se llevó a efecto mediante cromatografía de capa delgada de alta resolución (HPTLC) empleando ácidos grasos radioactivos (^{14}C). Se realizaron, también, pruebas para detectar interacciones de tipo hidrofóbicas entre los ácidos grasos y la proteína. Los antisueros fueron obtenidos por inmunización de conejos con los diferentes conjugados ácido graso - BSA. Se demostró que los anticuerpos anti - ácido oleico reconocieron los diferentes conjugados ácido graso - BSA, no así con el patrón de la proteína, lo que sugirió que los ácidos grasos son reconocidos independientemente del largo de la cadena carbonada y que los anticuerpos son dirigidos, en forma más efectiva, contra la cadena carbonada del cloruro de ácido que contra el portador o los enlaces covalentes. Por otra parte, los conjugados ácidos grasos - BSA fueron usados para evidenciar la presencia de auto anticuerpos anti - ácido graso en pacientes con esclerosis, detectándose la existencia de los mismos en el suero de múltiples personas padeciendo dicha enfermedad.

Aminas, como las catecolaminas, compuestos simpático miméticos (que reproducen o evocan los efectos de la estimulación nerviosa simpática) también han sido usados como haptenos. Yoshioka, Iwai - Yamasaki y col. (1987) y Yoshioka, Kobayashi -

Iwase y col. (1987) prepararon antígenos (III) por conjugación de L - norepinefrina y L - epinefrina, respectivamente, con BSA mediante la reacción de Mannich.



Norepinefrina: R = H

Epinefrina: R = CH₃

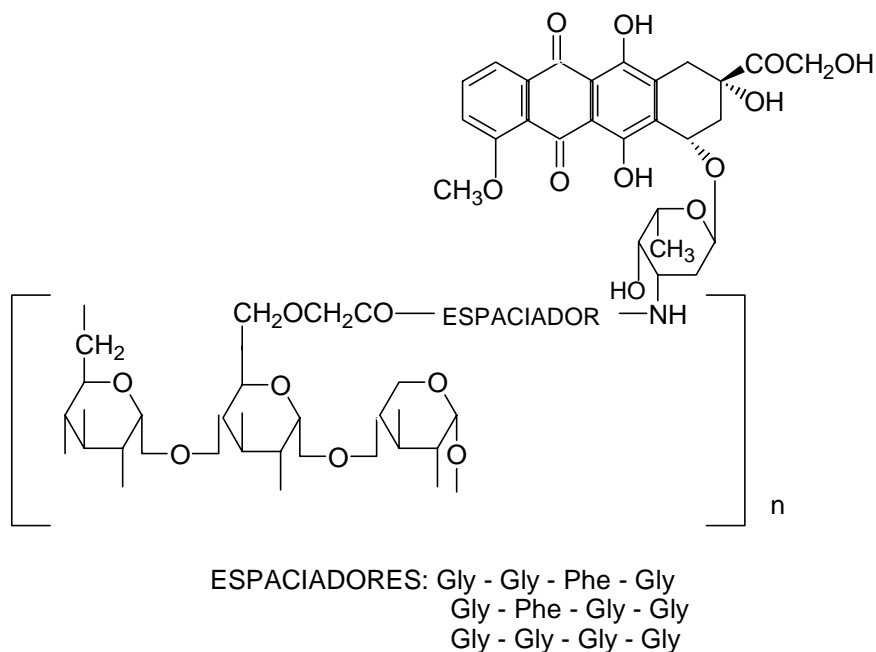
(III)

Inicialmente protegieron el grupo amino de las catecolaminas con el grupo maleilo por reacción con anhídrido maleico, la que se siguió por cromatografía de capa fina, obteniéndose las correspondientes N - maleil - L - catecolaminas, purificadas mediante cromatografía de intercambio iónico y tratadas posteriormente con formaldehído y BSA. Para cada antígeno se desarrollaron esquemas de inmunización empleando 30 conejos, a partir de la 2^{da} y hasta la 4^{ta} inmunización los intervalos de tiempo fueron de 7 días. A todos los antiseros se les realizó un screening por RIA. Para ambos antígenos (L - norepinefrina - BSA y L - epinefrina - BSA) solamente un conejo produjo alto título de anticuerpos. Se trazaron curvas estándares para ambas catecolaminas y fueron determinadas, mediante RIA, concentraciones de ellas en muestras de orina humana, resultando esta vía tan sensible como la cromatografía líquida de alta resolución o la detección electroquímica.

Nogusa, Yano y col. (1995) reportaron la síntesis y propiedades de los conjugados carboximetilpullulan - doxorubicina (CM Pul - DXR). La DXR es un antibiótico de la familia de las antraciclinas, muy empleado como droga en la quimioterapia del cáncer por tener un espectro de acción más amplio que todos los fármacos antineoplásicos. Para la preparación de los conjugados el grupo amino de la DXR fue enlazado al grupo carboxilo del polisacárido, tanto de forma directa o utilizando espaciadores tetrapéptidos: Gly - Gly - Phe - Gly, Gly - Phe - Gly - Gly o Gly - Gly - Gly - Gly (IV). Los péptidos marcados, N - trifenilmetiltetrapéptidos (N - tritiltetrapéptidos), fueron condensados con DXR en presencia de diciclohexilcarbodiimida (DCC) y N - hidroxisuccinimida (NHS) para dar lugar a los N - tritilaminoacilderivados; los mismos después de desprotegidos se hicieron reaccionar con la sal de sodio del carboximetilpullulan. El conjugado CM Pul - Gly - Gly - Phe - Gly - DXR fue identificado por HPLC. El contenido de DXR en el conjugado fue de 6,1 - 7%, medido

según la absorbancia a 480 nm (anillo de antraciclina). Ratas con 6 semanas de nacidas fueron inoculadas con un carcinosarcoma i.m., tres días después se les administró por vía intravenosa soluciones salinas de los conjugados y de DXR, a los cuatro días posteriores el tumor fue extirpado de cada grupo de ratas tratadas, además de las que sirvieron de control. El efecto antitumoral *in vivo* de cada conjugado y de la DXR fue monitorizado a partir de las masas de cada tumor. Los conjugados CM Pul - Gly - Gly - Phe - Gly - DXR y CM Pul - Gly - Phe - Gly - Gly - DXR mostraron un efecto antitumoral mayor que con la DXR.

Con el objetivo de mejorar la selectividad y la toxicidad de los agentes antitumorales se han diseñado sistemas portadores de drogas con proteínas. Fratz, Beller y col. (1998) obtuvieron cuatro conjugados de derivados de la DXR con seroalbúmina humana (HSA), los cuales difieren en cuanto a la estabilidad del enlace químico entre la droga y el espaciador. Los conjugados preparados con hidrazonas de la DXR exhibieron una eficacia inhibitoria comparable con la de la droga libre para la línea celular de cáncer de mama MDA - MB 468 y la línea celular de leucemia U937. Los resultados obtenidos de estas investigaciones demostraron que la actividad antiproliferativa depende de la naturaleza del enlace químico entre la DXR y la proteína portadora.



(IV)

Otras aminas han sido empleadas como haptenos, tal es el caso de la metanfetamina, donde se han investigado los antígenos que reconocen sitios de anticuerpos contra haptenos mediante el uso de anticuerpos monoclonales contra metanfetamina,

(REDACCION ???) así lo reportan Uda, Hifumi y col. (1997). La N¹, N⁸ - diacetilpermidina, una poliamida, ha sido acoplada a la BSA mercaptosuccinilada y el conjugado obtenido fue empleado para levantar anticuerpos específicos contra la N¹, N⁸ - diacetilpermidina en conejos, según los trabajos de Hiramatsu, Miura y col. (1997). La selectividad por la diacetilpermidina sobre otras especies de poliaminas fue elevada. Se demostró la posibilidad de, empleando un ELISA competitivo, medir la concentración de diacetilpermidina en orina humana.

Los alcaloides constituyen otro tipo de compuestos orgánicos que han sido acoplados a portadores para la síntesis de conjugados hapteno - portador. Wainer, Fitch y col. (1973) llevaron a cabo estudios con el objetivo de determinar si anticuerpos reactivos con morfina podían inhibir o anular satisfactoriamente la acción biológica de esta droga. El ensayo tuvo su basamento en la acción depresante de la morfina sobre las contracciones, eléctricamente estimuladas, de los intestinos de conejillos de India. se obtuvieron anticuerpos en conejos por inmunización con 6 - succinilmorfina (M - 6 - HS) conjugada a BSA. El anticuerpo anti - M - 6 - HS - BSA fue introducido al músculo 1 min después de la adición de morfina. Estos anticuerpos fueron capaces de contrarrestar el efecto inhibitorio de la morfina sobre las contracciones de los intestinos de los conejillos de India.

Capelle, Fournier y col. (1974) para un RIA de morfina, inmunizaron conejos con dos conjugados morfina - BSA. En uno de ellos la formación del enlace con la proteína se llevó a efecto por reacción de la 3 - O - (carboximetil) morfina y en el otro con la 6 - O - (hemisuccinil) morfina. El enlace con el antígeno fue inhibido por heroína, codeína y codeinona, no siendo así con normorfina y nalorfina. La inhibición debida a otros derivados de la morfina indicó que semejante al grupo N - metilo, la porción de fenantreno con un grupo -OH en la posición 6 era esencial para el enlace con el anticuerpo.

Schneider (1975) empleó el conjugado N - carboximetilmorfina - proteína en un inmunoensayo para la detección de morfina en presencia de metabolitos de la morfina o de codeína. El antisuero fue preparado en conejo y el ensayo se llevó a cabo en carnero.

Shoyama, Fukada y col. (1993) conjugaron alcaloides del opio (tebaína, codeína y morfina) con BSA mediante la reacción de N - (2 - carboxietil) - nortebaína, N - (2 - carboxietil) norcodeína y N - (carboxietil) normorfina con BSA.

Basmadjian, Singh y col. (1996) sintetizaron seis estados de transición análogos de la cocaína, los que fueron acoplados a una proteína inmunogénica, el toxoide de la difteria. Estos conjugados fueron usados en la inmunización de ratones. La presencia y el título de anticuerpos policlonales anti - estados de transición se determinó empleando un ELISA. Resultados preliminares mostraron altos títulos de anticuerpos policlonales.

Otros compuestos considerados como haptenos lo constituyen los esteroides. Hoffmann, Samarajeewa y col. (1975) en sus investigaciones valoraron la habilidad de sueros anti - estradiol para formar enlaces con estrógenos libres, derivados de estrógenos y estrógenos conjugados. Los resultados obtenidos demostraron la formación enlaces entre anti - 6 - (O - carboximetil) oxima del estradiol y estradiol libre con una elevada especificidad, sin presentar reactividad cruzada con ninguno de los glucurónidos de estrógenos investigados. Por otra parte, el anti - 3 - glucurónido del estradiol se enlazó al 3 - glucurónido del estradiol, al 3 - glucurónido de la estrona y a estradiol y estrona libres con la misma extensión.

Castro, Coll y col. (1990) trabajaron en la síntesis de cinco haptenos esteroidales del tipo carboximetiloxima y mercapto acetato para usos en técnicas de radioinmunoensayo (RIA). A partir de la progesterona prepararon la 3 - (O - carboximetil) oxima de la progesterona y el 6 - (carboximetil) tioéter de la progesterona. Del propionato de testosterona obtuvieron el 6 - (carboximetil) tioéter de la testosterona y el 6 - (carboximetil) tioéter de la androstendiona. Partiendo del acetato de 16 - dehidropregmolona sintetizaron el 16 - (carboximetil) tioéter de la pregnolona.

Ikegawa, Murai y col. (1992) prepararon antisueros conteniendo anti - ácido 1β - hidroxicólico por inmunización de conejos con el conjugado ácido N - (1β , 3α , 7α , 12α - tetrahidroxi - 5β - colan - 24 - oil) - 2 - amino propiónico - BSA. El antisuero presentó elevadas afinidad y especificidad para el ácido 1β - hidroxicólico, la reactividad cruzada para el ácido glico 1β - hidroxicólico fue del 100%. De esta manera se pudo determinar las concentraciones de ácido 1β - hidroxicólico conjugado en muestras de orina empleando el RIA.

Prácticamente no se encuentra registrado en la literatura consultada el empleo de los glicoles como haptenos, sin embargo, recientemente Nodake y Yamasaki (2000) reportaron algunas de las propiedades del conjugado: derivado del monometoxipolietilenglicol - lisozima. El conjugado fue preparado por modificación de la lisozima presente en la clara del huevo con el succiniléster del

monometoxipolietilenglicol y purificación mediante cromatografía de filtración en gel. Según los resultados obtenidos 1,05 moles del éster del monometoxipolietilenglicol fueron enlazados covalentemente a la molécula de lisozima, este tipo de enlace incrementó grandemente la termoestabilidad de la proteína sin ningún cambio en su conformación. Se demostró, que en el conjugado, el residuo de lisina en la posición 33 (Lys 33) de la proteína es el que de manera significativa es modificado por el succiniléster del monometoxipolietilenglicol.

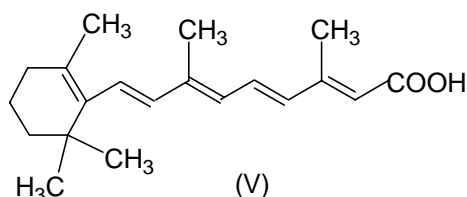
Merlín, Villaescusa y col. (1999) prepararon un conjugado con peroxidasa a partir de los anticuerpos específicos aislados de un antisuero de cabra anti IgG de ratón (anti IgG de ratón - peroxidasa). Los anticuerpos fueron aislados por cromatografía de afinidad y el conjugado se preparó por el método de la oxidación con peryodato, el mismo presentó una relación molar IgG - peroxidasa de 1,31 y resultó evaluado satisfactoriamente en cuanto a su especificidad y reactividad en los ensayos inmunoenzimáticos que se realizaron. Estos mismos investigadores (2001) prepararon de manera similar otro conjugado con peroxidasa pero a partir de los anticuerpos específicos aislados de un suero de conejo anti cadenas γ de la IgG humana (peroxidasa - anti IgG humana). La utilización de anticuerpos aislados por cromatografía de afinidad para la preparación de conjugados con peroxidasa se ha generalizado rápidamente entre los diferentes productores comerciales, pues este procedimiento posibilita la obtención de conjugados que poseen un nivel de calidad muy alto. Sin embargo, se ha demostrado que estos conjugados pueden ser preparados por el método de oxidación con peryodato en los laboratorios donde van a ser empleados.

Los fenoles han sido otro tipo de compuestos orgánicos que se han empleado para la conjugación con proteínas. Así por ejemplo, el bisfenol A (BPA) usado como materia prima para la producción de resinas epoxi y de policarbamatos, puede determinarse por cromatografía gaseosa acoplada a un espectrómetro de masa (GC/MS), método que requiere de un equipamiento caro y además el tiempo que dura el proceso es considerable, pues se necesita realizar extracción, concentración y derivatización. Nishii, Soya y col. (2001) desarrollaron un método analítico rápido, sencillo y altamente sensible para la determinación de BPA mediante inmunoensayo enzimático en fase sólida (ELISA) usando un solvente orgánico resistente al anticuerpo monoclonal anti - BPA. Para la producción de este anticuerpo las células de hibridoma fueron producidas por fusión de células de mieloma de ratón y células del bazo de ratones que habían sido inmunizados con un conjugado BPA - BSA. Algunos anticuerpos anti - BPA reaccionaron selectivamente con BPA y no mostraron reacción cruzada con compuestos de estructura relacionada.

2.7- VITAMINAS COMO HAPTENOS.

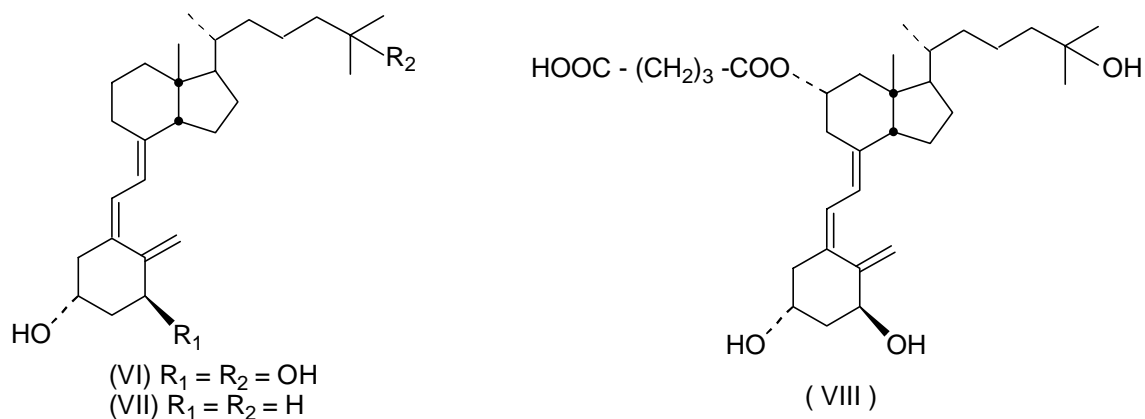
Las vitaminas, al igual que otras biomoléculas, presentan las propiedades características de los haptenos y por ende pueden ser acopladas a proteínas portadoras con fines inmunológicos.

Dentro de las vitaminas liposolubles se ha logrado conjugar la vitamina A - ácido (ácido retinoico) (V) a la seroalbúmina bovina, por la reacción del anhídrido mixto, así lo reportan Conrad y Wirtz (1973). Según las investigaciones de estos autores la absorbancia en la región ultravioleta y la dinitrofenilación demostraron que de 25 - 40 moléculas de ácido retinoico fueron conjugadas por mol de proteína. Con este conjugado fueron inmunizados conejos y en el antisuero resultante se encontró aproximadamente un 70% del retinol añadido. Otros derivados de la vitamina A fueron ensayados por sus posibilidades para desplazar retinol de los anticuerpos.

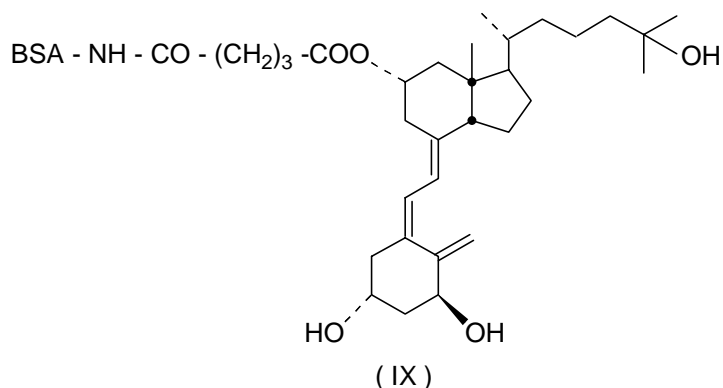


El desarrollo de los métodos inmunoquímicos para la determinación en muestras clínicas de $1\alpha, 25$ - dihidroxivitamina D_3 [$1, 25$ (OH) $_2$ D_3] (VI), el metabolito activo de la vitamina D_3 , (VII), que juega un papel importante en la regulación del metabolismo del calcio y del fósforo, ha conllevado a que se realicen toda una serie de investigaciones con el propósito de obtener anticuerpos monoclonales anti - $1, 25$ (OH) $_2$ D_3 . De esta manera Bauwens, Kint y col. (1987) para desarrollar un radioinmunoensayo (RIA) sensible para $1\alpha, 25$ - dihidroxivitamina D_3 usaron anticuerpos contra el 3 - hemisuccinato del $1\alpha, 25$ - dihidroxicolecalciferol conjugado con BSA, dichos anticuerpos fueron obtenidos en huevos por inmunización de pollos y caracterizados por inmunoelectroforesis y RIA. Los mismos mostraron una elevada afinidad para $1\alpha, 25$ - dihidroxivitamina D_3 , pero hubo reactividad cruzada con otros metabolitos de la vitamina D. Kobayasht, Kitahori y col. (1993) lograron la producción de anticuerpos altamente específicos para la $1, 25$ (OH) $_2$ D_3 , empleando como antígeno un derivado hapténico hasta ese momento no reportado, el 11α -

hemiglutariloxi - 1, 25 (OH)₂ D₃, (VIII), el cual fue sintetizado a partir del 11 α , 25 - dihidroxicolesterol, mediante una secuencia de reacciones de 21 pasos, los que incluían reacciones de sililación selectiva, acetilación, desililación, reducción, formación de aducto de Diels - Alder, epoxidación selectiva, isomerización y deacetilación.

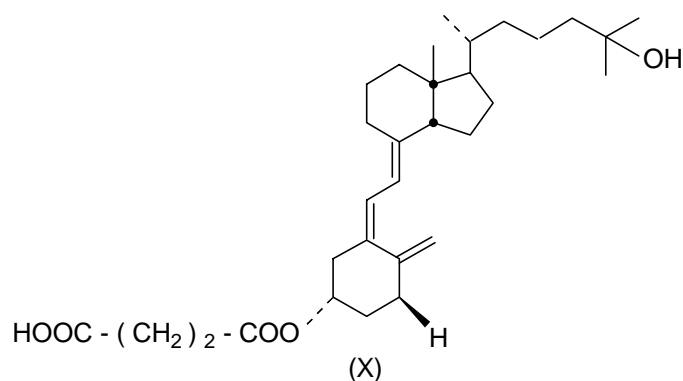


La estructura del hapteno (VIII) fue confirmada por datos espectroscópicos. El mismo fue copulado con BSA empleando el método del éster N - hidroxisuccinimidilo. Se realizaron varias inmunizaciones a conejos con el conjugado (IX) [hapteno (VIII) - BSA]. Las propiedades de los anticuerpos policlonales obtenidos fueron examinadas mediante RIA. Todos los anticuerpos mostraron altos títulos y constantes de afinidad y reconocieron fácilmente, tanto el anillo A como la cadena lateral de la 1, 25 (OH)₂ D₃ y son altamente específicos al metabolismo comparados con los anticuerpos convencionales.



Kobayashi, Imazu y col. (1997) emplearon este mismo conjugado 11 α - hemiglutariloxi - 1 α , 25 - (OH)₂ D₃ - BSA (IX) en la inmunización de ratones Balb/c, A/J y C57BL/6, así como también ratas Wistar y SD, determinándose el título de anticuerpos anti - 1, 25 (OH)₂ D₃ presentes en el suero. Las células del bazo de los

ratones A/J o de las ratas SD, que mostraron altos títulos, fueron fusionadas con células de mieloma P3/NS1/1-Ag4-1. Luego de un screening mediante ELISA y RIA fueron establecidos 16 tipos de clones de hibridomas secretores de diferentes anticuerpos anti - 1, 25 (OH)₂ D₃. Se demostró que 12 de los 16 anticuerpos poseían suficiente afinidad por la 1, 25 (OH)₂ D₃. Los anticuerpos monoclonales obtenidos pueden ser utilizados no solamente en el desarrollo de la cromatografía de inmunoafinidad (IAC) sino también en varios procedimientos de inmunoensayo. Posteriormente Kobayashi, Sato y col. (1997) lograron obtener dos nuevos conjugados hapteno - proteína: el primero 3 - hemisuccinato de la 25 - hidroxivitamina D₃ - BSA (hapteno 3 HS - BSA) (X) y el ácido 1 α - hidroxí - 25, 26, 27 - trinorvitamina D₃ - 24 oico - BSA (hapteno 24 - OA - BSA), los cuales fueron utilizados para la inmunización de ratas SD. o de ratones Balb/c.



Los anticuerpos monoclonales anti - 1, 25 (OH)₂ D₃ fueron investigados mediante un RIA usando 1, 25 (OH)₂ D₃ marcado con tritio. Se demostró que los anticuerpos monoclonales obtenidos en el antisuero de las ratas derivados del hapteno 3 HS y los presentes en el antisuero de los ratones provenientes del hapteno 24 - OA podían ser aprovechables para el desarrollo de sistemas analíticos prácticos.

Hoffman, y col. (1990) obtuvieron un anticuerpo monoclonal contra la vitamina D humana enlazada a proteína para el análisis de variaciones genéticas. Al respecto Umetsu, Suzuki y col. (1995), así como Yuasa, Kofler y col. (1995) realizaron estudios electroforéticos de las principales bandas que aparecen en la vitamina D enlazada a proteína.

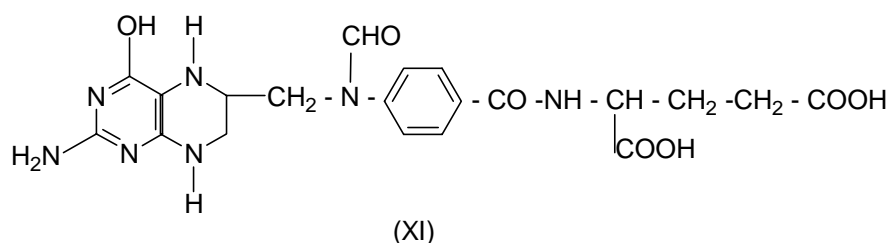
Recientemente se han reportado otras técnicas para el análisis de la vitamina D y de sus metabolitos. Arakawa, Kokado y col. (2000) desarrollaron un sistema acoplado que comprende una reacción en cadena de la polimerasa biluminiscente - polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción - ELISA (PCR - RFLP - ELISA), sensible y rápido, empleando acetato de quinasa y luciferaza de luciérnaga como

sistema detector para el análisis del polimorfismo del gen receptor de la vitamina D. Como resultado de esta investigación se concluyó que los tipos de polimorfismo del DNA del gen receptor de la vitamina D pueden ser determinados por medición de la intensidad de la bioluminiscencia.

Teniendo en cuenta que la vitamina D juega un papel fundamental en la homeostasis del calcio sérico, las mediciones de las concentraciones de los metabolitos de la vitamina D en fluidos biológicos son importantes para diagnósticos clínicos y nutricionales. Al respecto Higashi y Shimada (2000) realizaron estudios en cuanto a la identificación y cuantificación de estos metabolitos en fluidos biológicos.

En el caso de las vitaminas hidrosolubles, se encuentran reportados en la literatura los trabajos realizados por Jatón y Ungar - Waron (1967), los cuales prepararon macromoléculas inmunogénicas a partir de ácido fólico, como hapteno, y el polipéptido sintético no antigénico poliAla - poliLys. Este conjugado fue capaz de producir anticuerpos en conejos dirigidos específicamente contra el hapteno.

Simon, Burrows y Little (1973) obtuvieron anticuerpos específicos para el ácido formiltetrahidrofólico (ácido folínico) (XI), un derivado del ácido fólico, inmunizando conejos con un conjugado covalente ácido folínico - proteína. Las propiedades



enlazantes de los anticuerpos anti - ácido folínico fueron analizadas por fluorescencia entre otras técnicas. La unión del ácido fólico a estos anticuerpos dio por resultado un corrimiento hipocrómico y batocrómico en el espectro de absorción. La reacción con 5 - metiltetrahidrofolato también fue estudiada con vistas a desarrollar un radioinmunoensayo para folatos reducidos en sueros de animales y humanos.

Desde hace varios años la firma comercial Sigma Immunochemical (1992) produce el anticuerpo monoclonal anti - ácido fólico, el cual reacciona con folato libre, folato conjugado a una proteína portadora tal como KLH o BSA o con ácido fólico en plasma humano. Este producto no muestra reacción cruzada con el ácido tetrahidrofólico, ácido folínico, ácido hidrofólico o vitamina B₁₂. Se produce, también, el anti - ácido 5

- tetrametilhidrofólico (5MTHFA) y es específico para 5MTHFA y no muestra reactividad cruzada con el ácido fólico, ácido dihidrofólico o vitamina B₁₂.

Gerald, Falb y col. (1974) acoplaron el disulfuro de tetrahidrofurfuriltiamina con seroalbúmina bovina y con polilisina, estos antígenos fueron empleados para la inmunización de conejos, obteniéndose anticuerpos específicos contra el derivado de la tiamina.

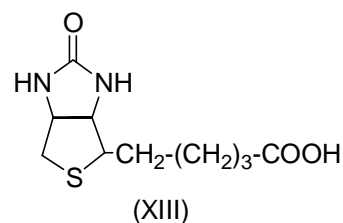
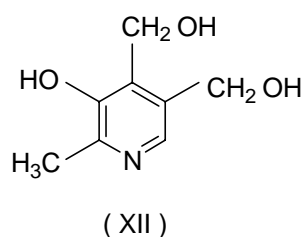
Gerhsman, Nathanson y col. (1972) prepararon anticuerpos contra derivados de la vitamina B₁₂ (cobalamina), la que posee la más compleja fórmula estructural de todas las vitaminas. La preparación se efectuó por inmunización de conejillos de India con carboxipropil - B₁₂ enlazada covalentemente a polilisina, inmunógeno que fue obtenido por la vía del 1 - etil - 3 - (3 - dimetilaminopropil) carbodiimida. Fue sugerido que la porción correspondiente al fosfato de 5, 6 - dimetilbenzimidazolribosa era la inmunodominante, aunque también se consideró una pequeña especificidad para la posición a través de la cual la carboxipropil - vitamina B₁₂ se enlaza a la polilisina. Se aisló el complejo anticuerpo - hapteno sobre filtros de membrana de nitrocelulosa. Se demostró que para derivados de la vitamina como: cianocobalamina, hidroxocobalamina, metilvitamina B₁₂ y desoxiadenosil - cobalamina (coenzima B₁₂), los sitios de enlace de los anticuerpos receptores no tenían relación con la posición que ocupan dichos grupos dentro de la molécula, no existiendo competencia por estos sitios para el enlace. Análogos metálicos de la hidroxocobalamina fueron también ensayados, derivados en los que el átomo de cobalto fue sustituido por átomos de cinc, cobre o un no metal, cuyas estructuras son muy semejantes a la de la cianocobalamina, con algunos cambios en el tamaño, la forma o el grado en que se pliega el sistema de anillos, inducido por el cambio del metal. Los anticuerpos reaccionan con menor efectividad con estos compuestos, lo que indicó que los anticuerpos tienen una especificidad moderada por el tamaño o forma del sistema de anillos de la molécula de la vitamina.

Dentro de los anticuerpos que comercializa la firma Sigma Immunochemical (1992), para la realización de RIA o de ELISA, se encuentra el anti - vitamina B₁₂, el cual reacciona con vitamina B₁₂ cristalina, vitamina B₁₂ conjugada con proteínas, como KLH o BSA y vitamina B₁₂ en suero y plasma humano. El anticuerpo también reacciona con coenzima B₁₂ y metilvitamina B₁₂, pero no con ácido fólico o con 5MTHFA.

Doke, Inagaki y col. (1997) investigaron los efectos de la deficiencia de vitamina B₆ (piridoxina) (XII) sobre la producción de anticuerpos específicos en ratones Balb/c. La

producción de inmunoglobulina E (IgE) contra la dinitrofenilovalbúmina (DNP - OVA) fue medida por un ELISA. El contenido de anticuerpos anti DNP - IgE en el suero de los ratones, alimentados con una dieta carente de vitamina B₆, incrementó significativamente comparado con el control, ratones que ingirieron una dieta conteniendo vitamina B₆. Del estudio realizado se evidenció que la deficiencia de vitamina B₆ en ratones ha de estar relacionada con la producción de anticuerpos específicos IgE contra la DNP - OVA.

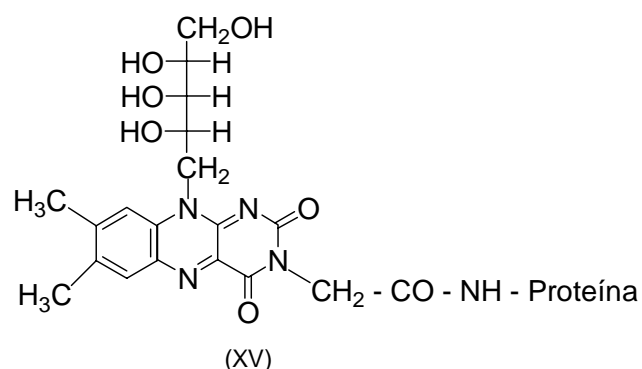
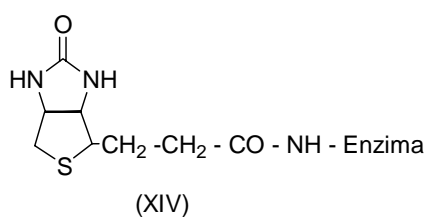
Berger (1975) desarrolló métodos para el acoplamiento de biotina (vitamina H) (XIII) a seroalbúmina bovina y a gamma - globulina bovina empleando carboxidiimida soluble en agua. Los conjugados resultaron ser altamente inmunogénicos y los anticuerpos con el mismo grupo biotinilo fueron detectados por su capacidad para precipitar portadores biotinilados heterológicos, pero no portadores heterológicos sin modificar.



Con el incremento del uso de enzimas marcadas como alternativas para los radioisótopos en el desarrollo del inmunoensayo, han sido introducidos diferentes tipos de ensayos relacionados con enzimas para la detección selectiva de moléculas biológicamente importantes, como: hormonas, vitaminas y proteínas. Tales métodos se han clasificado en homogéneos y heterogéneos. Los homogéneos, como el de la técnica de ensayo inmunoenzimático múltiple (EMIT), son preferidos debido a que no es necesario un tiempo para la separación de la enzima marcada. Estos métodos están basados en la habilidad de los agentes de unión específicos del analito, ejemplos anticuerpos o proteínas de unión, para inhibir o activar la actividad de los conjugados enzima - anticuerpos en solución. Cuando se encuentran presentes moléculas libres del analito la competencia por un número limitado de sitios de enlace causa un incremento en la actividad de la enzima y este incremento es proporcional a la concentración del analito presente en la mezcla de ensayo.

Kim, Kim y col. (1995, 1996) reportaron el uso de conjugados sintéticos en el desarrollo de ensayos tipo homogéneo. El método propuesto utiliza conjugados

enzima - biotina y avidina - riboflavina como generadores y moduladores de señales, respectivamente. Los conjugados glucosa - 6 - fosfato deshidrogenasa - biotina, fosfatasa alcalina - biotina y adenosina desaminasa - biotina (XIV) fueron preparados por el método del éster de la N - hidroxisuccinimida (NHS) haciendo reaccionar las enzimas con N - hidroxisuccinimidilbiotina, se les determinó la actividad enzimática y el por ciento de inhibición, resultando que los conjugados altamente inhibidos poseen la suficiente actividad residual como para poder ser empleados en los ensayos tipo homogéneo. También fueron preparados conjugados avidina - riboflavina (XV) mediante la reacción de la avidina, con sus sitios activos protegidos por reacción con la 2 - iminobiotina, con ésteres de la N - hidroxisuccinimida activada por reacción con 3 - carboximetilriboflavina. Conjugados a los que se les determinó el radio molar riboflavina/avidina y el por ciento de inhibición. Los resultados demostraron la factibilidad de su aplicación en los ensayos tipo homogéneo.



Los estudios realizados por Kim, Kim y col. (1995, 1996) también incluyeron la valoración de la posible utilidad analítica del método, para lo cual se llevó a cabo un estudio preliminar de la determinación de la cantidad de riboflavina presente en dos tipos de tabletas multivitamínicas comerciales. Los ensayos requieren únicamente de la dilución de las muestras originales. La concentración de riboflavina se calcula gráficamente a partir de los valores de inhibición y de los correspondientes valores en la curva dosis - respuesta. Se demostró la alta selectividad con respecto a otras biomoléculas como mononitrato de tiamina, clorhidrato de piridoxina, cianocobalamina, acetato de tocoferol, ácido fólico, ácido ascórbico y ácido pantoténico, así como una elevada precisión en la determinación analítica.

El sistema avidina - biotina está basado en la elevada afinidad de la avidina, presente en la clara del huevo, por la biotina (vitamina H), en el cual cuatro moléculas de biotina se enlazan por molécula de avidina mediante una interacción no covalente, la

cual es esencialmente irreversible (Sigma Immunochemical, 1992). Esa elevada afinidad es muy utilizada en el inmunoensayo, en técnicas como: el ensayo inmunoenzimático en fase sólida (ELISA), immunoblotting, inmunohistoquímica, etc. Dentro de los reactivos pertenecientes a este sistema avidina - biotina que la firma Sigma Immunochemical (1992) comercializa se encuentran el Anticuerpo Monoclonal Anti - Biotina y Anti - Biotina.

El Monoclonal Anti - Biotina es obtenido usando el conjugado biotina - KLH como inmunógeno. El anticuerpo reconoce biotina libre empleando un ELISA competitivo. Puede reconocer también biotina conjugada con varias inmunoglobulinas mediante el empleo de un ELISA indirecto o una tinción inmunohistoquímica.

El antisuero para biotina (Anti - Biotina) fue obtenido en cabra empleando como inmunógeno biotina acoplada a una proteína portadora. La especificidad y la reactividad fueron determinadas por medio de la técnica de difusión doble de Ouchterlony y por electroforesis del complejo biotina - proteína portadora. No se observó reactividad contra la proteína portadora.

Paganelli, Songini y col. (1995) realizaron ensayos con el sistema avidina - biotina para su empleo en inmunogammagrafía, que se aplica a pacientes con distintos tipos de cáncer. El método demostró ser seguro, confiable y de utilidad clínica, con un 88% de sensibilidad, 94% de especificidad y 84% de precisión.

La revisión bibliográfica realizada demuestra el interés actual en la búsqueda de métodos que permitan realizar el análisis de vitaminas, y específicamente de riboflavina, por métodos de alta sensibilidad y confiabilidad. Por otra parte, queda evidenciada la importancia de la conjugación de haptenos a proteínas con diferentes fines.

Parte 3

Parte Experimental

3 – PARTE EXPERIMENTAL.

3.1. - REACTIVOS, EQUIPOS Y PREPARACIÓN DE SOLUCIONES.

3.1.1. - Reactivos.

Acetona	Panreac	España
Ácido acético	Panreac	España
Ácido sulfosalicílico	ANALAR	Inglaterra
Ácido sulfúrico	Panreac	España
Ácido tricloroacético	Merck	Alemania
Acrilamida	BDH	Inglaterra
Adyuvante completo de Freund	Sigma	Cuba
Adyuvante incompleto de Freund	Sigma	Cuba
Agar noble	Merck	Alemania
Almidón	Merck	Alemania
Azul de Coomasie R-250	SIGMA	USA.
Benceno	Merck	Alemania
Borohidruro de sodio	BDH	Inglaterra
Bromofenol Azul	BDH	Inglaterra
Buffer veronal sódico	BDH	Inglaterra
Carbonato de sodio	MINSAP	Cuba
Cloruro de bario	BDH	Inglaterra
Dihidrogenofosfato de potasio	Panreac	España
2,4- dinitrofenilhidracina	Merck	Alemania
Dodecilsulfato de sodio	Merck	Alemania
Etilenglicol	BDH	Inglaterra
Fenoltaleína	Merck	Alemania
Glicerol	Merck	Alemania
Hidrogenocarbonato de sodio	MINSAP	Cuba
Hidrogenofosfato de sodio	Panreac	España
Hidróxido de amonio	Panreac	España
Hidróxido de sodio	Merck	Alemania
Ioduro de potasio	Merck	Alemania
Metanol	Panreac	España
Metaperyodato de sodio	BDH	Inglaterra

Nitrato de plata	BDH	Alemania
N,N ¹ -metilen-bis-acrilamida	Merck	Inglaterra
N,N,N,N ¹ tetrametiletildiamina	BDH	Inglaterra
Ponceau 3R	BDH	Inglaterra
Reactivo de Folin Ciocalteu	Merck	Alemania
Riboflavina	BDH	Inglaterra
Seroalbúmina bovina. Fracción V	BDH	Inglaterra
Solución salina fisiológica 0,9 %	Imefa	Cuba
Sulfato de amonio	BDH	Inglaterra
Sulfato de cobre pentahidratado	Merck	Alemania
Tartrato de sodio y potasio	Merck	Alemania
Tiosulfato de sodio	BDH	Inglaterra

3.1.2 - Equipos.

Balanza analítica "NAGEMA"	RDA
Centrifuga CLAY-ADAMS CO. INC.	New York
Equipo de electroforesis "CENIC"	Argentina
Espectrofotómetro UV "PHARMACIA LKB"	Suecia
Espectrofotómetro UV/Vis "PYE UNICAM PHILIPS"	Holanda
Estufa "MSU"	Alemania
Fluorímetro experimental Dpto. Física UO	Cuba
Fuente reguladora "FER 304"	Argentina
Fuente reguladora "KAGAYAKI PS - 250"	Japón
Incubadora "MYTRON"	Alemania
Lámpara ultravioleta "CAMAG"	Holanda
pH metro "PACITRONIC"	RDA
Termostato "MLW"	RDA
Zaranda "THYS - 2"	RDA

3.1.3 - Preparación de Soluciones.

Solución de hidróxido de sodio de concentración molar 1 mol/L:

Se pesaron 20 g de hidróxido de sodio, se disolvieron en la menor cantidad de agua destilada, se traspasó a un frasco volumétrico de 500 mL de capacidad y se enrasó con agua destilada.

Solución de carbonato de sodio de concentración molar 0,2 mol/L:

Se pesaron 21,2 g de carbonato de sodio, secado previamente en una estufa a 110 °C durante 2 h, se disolvieron en la menor cantidad de agua destilada posible, se traspasó a un frasco volumétrico de 1000 mL de capacidad y se enrasó con agua destilada.

Solución de hidrogenocarbonato de sodio de concentración molar 0,2 mol/L:

Se pesaron 16,8 g de hidrogenocarbonato de sodio, secado previamente en una estufa a 110 °C durante 2 h, se disolvieron en la menor cantidad de agua destilada, se traspasó a un frasco volumétrico de 1000 mL de capacidad y se enrasó con agua destilada.

Solución tampón de carbonato pH 9,5:

Se midieron 13 mL de la solución de carbonato de sodio 0,2 mol/L y 37 mL de la solución de hidrogenocarbonato de sodio 0,2 mol/L, se mezclaron bien y se diluyó con agua destilada hasta completar un volumen de 200 mL. Se comprobó el valor del pH de la solución (Fasman, 1990).

Reactivo 2,4 - dinitrofenilhidracina:

Se pesó 1 g de 2,4 - dinitrofenilhidracina, se disolvió en 7,5 mL de ácido sulfúrico concentrado, esta solución se adicionó a 250 mL de alcohol al 30 % y se agitó hasta total disolución.

Reactivo de Tollens:

Se adicionaron 5 gotas de solución de hidróxido de sodio al 5 % a 5 mL de una solución de nitrato de plata al 5 %, se agitó y se le agregó disolución diluida de amoníaco (1 mL de amoníaco concentrado se diluyó hasta 10 mL con agua destilada) hasta que el precipitado de hidróxido de plata formado se disolvió.

Solución de hidróxido de sodio al 5 % (m:v):

Se pesaron 2,5 g de hidróxido de sodio y se disolvieron en 50 mL de agua destilada.

Solución de nitrato de plata al 5 % (m:v):

Se pesaron 2,5 g de nitrato de plata y se disolvieron en 50 mL de agua destilada.

Reactivo Fehling A:

Se pesaron 7 g de sulfato de cobre pentahidratado y se disolvieron en 100 mL de agua destilada.

Reactivo Fehling B:

Se pesaron 35 g de tartrato de sodio y potasio y 25 g de hidróxido de potasio y se disolvieron en 100 mL de agua destilada.

Solución de cloruro de bario al 10% (m:v):

Se pesaron 10 g de cloruro de bario y se disolvieron en 100 mL de agua destilada.

Solución de riboflavina 1 mg/mL:

Se pesaron 100 mg de riboflavina, se disolvieron en una pequeña cantidad de agua destilada, se traspasó a un frasco volumétrico de 100 mL de capacidad y se enrasó con agua destilada.

Solución de riboflavina 0,112 mg/mL:

Se midieron 5,6 mL de la solución madre de riboflavina 1 mg/mL, se traspasaron a un frasco volumétrico de 50 mL de capacidad y se enrasó con agua destilada.

Solución de riboflavina 0,00112 mg/mL:

Se midieron 22,4 mL de la solución de riboflavina 1 mg/mL, se traspasaron a un frasco volumétrico de 100 mL de capacidad y se enrasó con agua destilada. De esta solución se midió 0,5 mL se llevó a un frasco volumétrico de 100 mL y se enrasó con agua destilada.

Reactivo A (para la determinación de proteínas por método de Lowry):

Se pesaron 20 g de carbonato de sodio y se disolvieron en 100mL de solución de hidróxido de sodio de concentración molar en equivalente 0.1 mol/L.

Reactivo B (para la determinación de proteínas por método de Lowry):

Se pesaron 0,5 g de sulfato de cobre pentahidratado y 1 g de citrato de sodio y se disolvieron en 100mL de agua destilada.

Reactivo C (para la determinación de proteínas por método de Lowry):

Se mezclaron 50 mL del reactivo A con 1 mL del reactivo B exactamente en el momento de ser utilizado.

Reactivo D (para la determinación de proteínas por método de Lowry):

Se midieron 5 mL del reactivo comercial de Folin - Ciocalteu y se diluyeron con 5 mL de agua destilada.

Solución madre de BSA 1 mg/mL:

Se pesaron 100 mg de BSA, se disolvieron en la menor cantidad de agua destilada, se transfirió a un frasco volumétrico de 100 mL y se enrasó con agua destilada. Esta solución se corrigió espectrofotométricamente, resultando una concentración de 0,995 mg/mL.

Solución de ácido sulfúrico de concentración molar en equivalente 1 mol/L:

Se midieron 13,9 mL de ácido sulfúrico concentrado ($d = 1,8355 \text{ g/mL}$, 96% en peso), se transfirieron a un volumétrico de 500 mL de capacidad y se enrasó con agua destilada.

Solución de yoduro de potasio al 20 % (m:v):

Se pesaron 40 g de yoduro de potasio y se disolvieron en 200 mL de agua destilada.

Solución de tiosulfato de sodio de concentración molar en equivalente 0.1 mol/L:

Se pesaron 24,8 g de tiosulfato de sodio pentahidratado, se disolvieron en agua destilada y hervida, la solución se transfirió a un matraz aforado de 1 L, se enrasó con agua destilada y hervida y se añadió 1 mL de cloroformo para su conservación .

Valoración: Se pesaron 3,567 g de yodato de potasio, se disolvieron en agua destilada, se pasó a un matraz aforado de 1 L y se enrasó con agua destilada. A 25 mL de esta solución se le añadió 1 g de yoduro de potasio y 3 mL de ácido sulfúrico de concentración molar en equivalente 2 mol/L. El yodo liberado se tituló con la solución de tiosulfato, cuando el color de la solución se tornó a un amarillo pálido, se diluyó a 200 mL con agua destilada, se agregaron 2 mL de solución de almidón y se continuó la titulación hasta que el color azul viró a incoloro. La determinación se repitió 3 veces y se escogió el promedio de las 3 determinaciones. Se calculó la concentración de la solución de tiosulfato considerándose que $1 \text{ mL de Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 = 0,03567 \text{ g de KIO}_3$ (Vogel, 1971). La concentración calculada fue de 0,987 mol/L.

Solución indicadora de almidón soluble al 1% (m:v):

Se pesó 1 g de almidón soluble y con una pequeña cantidad de agua destilada se hizo una pasta. Se agregaron 100 mL de agua a ebullición (conteniendo 0,1 g de timol para la conservación de la solución) con agitación constante, se hirvió durante 1 min, se dejó enfriar y se agregaron 3 g de yoduro de potasio (Vogel, 1971).

Solución de hidróxido de sodio de concentración molar en equivalente 0,05 mol/L:

Se pesaron 2 g de hidróxido de sodio, se disolvió en la menor cantidad de agua destilada, se transfirió a un matraz aforado de 1L y se enrasó con agua destilada hervida.

Valoración: 25 mL de esta solución se vertieron en un Erlenmeyer de 250 mL, se diluyó con 10 mL de agua destilada y se añadieron 2 gotas de heliantina. Se tituló con solución de ácido clorhídrico de concentración molar en equivalente 0.05 mol/L. La determinación se repitió 3 veces y se escogió el promedio de las 3 determinaciones (Vogel, 1971). La concentración calculada fue de 0,0497 mol/L.

Solución saturada de sulfato de amonio:

Se pesaron 300 g de sulfato de amonio y se disolvieron en 500 mL de agua destilada, teniendo en cuenta que la solubilidad del sulfato de amonio es de 60 g / 100 mL de agua.

Solución de sulfato de amonio al 40 % (m:v):

Se pesaron 40 g de sulfato de amonio y se disolvieron en 100 mL de agua destilada.

Solución de fosfato de sodio monobásico de concentración molar 0,2 mol/L:

Se pesaron 24 g de fosfato de sodio monobásico, previamente secado en una estufa a 110 °C por espacio de 2 h, se disolvieron en la menor cantidad de agua destilada, se transfirió a un frasco volumétrico de 1000 mL de capacidad y se enrasó con agua destilada.

Solución de fosfato de sodio dibásico de concentración molar 0,2 mol/L:

Se pesaron 28,38 g de fosfato de sodio dibásico, previamente secado en una estufa a 110 °C por espacio de 2 h, se disolvieron en la menor cantidad de agua destilada, se transfirió a un frasco volumétrico de 1000 mL de capacidad y se enrasó con agua destilada.

Solución tampón fosfato pH 7:

Se midieron 39 mL de la solución de fosfato de sodio monobásico 0,2 mol/L y 61 mL de la solución de fosfato de sodio dibásico 0,2 mol/L, se mezclaron bien y se diluyó hasta un volumen total de 200 mL con agua destilada. Se verificó el pH de la solución (Fasman, 1990).

Solución de ácido tricloroacético al 6 % (m:v):

Se pesaron 30 g de ácido tricloroacético y se disolvieron en 500 mL de agua destilada.

Solución de Ponceau 3R al 0,8 %:

Se pesaron 2 g del colorante Ponceau 3R y se disolvieron en 250 mL de solución de ácido tricloroacético al 6 %.

Solución de ácido acético al 1 % (v:v):

Se midieron 5 mL de ácido acético glacial y se disolvieron en 500 mL de agua destilada.

3.2 – EVALUACIÓN DE LA ETAPA DE OXIDACIÓN.

3.2.1 - Preparación del conjugado riboflavina (GV) - seroalbúmina bovina (BSA) para la optimización de la reacción de oxidación.

Se empleó una modificación de la técnica de Ragupathi (1991). En un frasco color ámbar de 30 mL de capacidad se disolvieron 22,6 mg de riboflavina (60 μ mol) en 2 mL de agua destilada, se añadió metaperyodato de sodio, también disuelto en agua destilada (la masa del mismo dependió de las relaciones molares establecidas para la optimización, Tabla 1) y el frasco se tapó con una tapa de color oscuro. La mezcla se agitó ocasionalmente durante el tiempo seleccionado, según el diseño, a temperatura ambiente y se mantuvo en la oscuridad. Posteriormente se adicionó una pequeña cantidad de etilenglicol acorde a la de metaperyodato de sodio (Tabla 1) y se agitó ocasionalmente durante 25 minutos a temperatura ambiente. Se ajustó el pH de la mezcla a 9,5 con solución de hidróxido de sodio de concentración molar 1 mol/L, a continuación se añadieron 66 mg de BSA (1 μ mol) disueltos en 3 mL de buffer carbonato pH 9,5 y se agitó en una zaranda durante 120 min a temperatura ambiente. Se adicionaron 2,6 mg de borohidruro de sodio (60 μ mol) disueltos en 1 mL de agua destilada. La mezcla se incubó a 37 °C en un termostato durante 3 horas. Al final la mezcla se dializó contra agua destilada, con cambios sucesivos de la misma,

durante 24 horas. Tanto el dializado como las aguas de diálisis se conservaron en pomos color ámbar.

Tabla 1. Variables experimentales establecidas para la optimización de la reacción de oxidación.

Relac. Molar Ribo. : NaIO ₄	Cantidad de Riboflavina (μmol)	Cantidad de NaIO ₄ (μmol)	m (NaIO ₄) (mg)	Tiempo de oxidación (min)	Volumen Etilenglicol (μL)
1:1	60	60	12,80	75	7,5
1:3	60	180	38,50	75	22,5
1:6	60	360	77,04	75	45
1:6	60	360	77,04	90	45
1:6	60	360	77,04	100	45

3.2.2 - Determinación cualitativa de grupos funcionales.

3.2.2.1 - Reacción con 2,4 - dinitrofenilhidracina.

El ensayo se llevó a cabo según Mc Elvain (1970). En un tubo de ensayos se añadieron 2 mL del reactivo 2,4 - dinitrofenilhidracina, se agregaron 2 gotas de la mezcla final de la reacción de oxidación y se dejó en reposo a temperatura ambiente.

3.2.2.2 - Reacción con el reactivo de Tollens.

El ensayo se llevó a cabo según Mc Elvain (1970). En un tubo de ensayos se adicionaron 2 mL del reactivo de Tollens y gotas de la mezcla final de la reacción de oxidación, luego se calentó en baño de agua durante unos minutos.

3.2.2.3 - Reacción con el reactivo de Fehling.

El ensayo se llevó a cabo según Mc Elvain (1970). En un tubo de ensayos se añadieron 1 mL del reactivo Fehling A y 1 mL del reactivo Fehling B, se agitó, se agregaron gotas de la mezcla final de la reacción de oxidación y se calentó en baño de agua durante unos minutos.

3.2.2.4 - Reacción con solución de cloruro de bario.

En un tubo de ensayos se añadió 1 mL del dializado final y 1 mL de solución de cloruro de bario al 10%.

3.2.3 - Determinación cuantitativa de riboflavina.

La cuantificación de riboflavina en agua de diálisis se realizó por el método fluorométrico, para lo cual se empleó el Fluorímetro Experimental construido en el Departamento de Física de la Facultad de Ciencias Naturales y Matemáticas de la Universidad de Oriente. Las mediciones de las muestras se efectuaron a longitudes de onda de máxima excitación y emisión (460 y 525 nm, respectivamente). La curva de calibración se construyó con soluciones patrones de riboflavina con concentraciones de 6, 16, 26, 36, 46, 56, 76 y 86 $\mu\text{g/mL}$. Para lo cual se midieron 150, 400, 650, 900, 1150, 1400, 1900 y 2150 μL , respectivamente, de una solución de riboflavina 1 mg/mL.

3.2.4 – Monitoreo del curso de la reacción por cromatografía de capa fina.

A partir de que se mezclaron las soluciones de riboflavina y de metaperyodato de sodio ($t = 0$) y a diferentes intervalos de tiempo se aplicaron, con capilares muy finos, muestras de las mezclas de reacción en placas de sílica - gel 60F 254 (20 x 1,5 cm). Como sistema de solventes se empleó ácido acético : acetona : metanol : benceno en la proporción 5 : 5 : 20 : 70 (v/v). La cromatografía se desarrolló por el método ascendente, en la oscuridad, el frente del solvente se dejó correr 19 cm. y se reveló con luz ultravioleta de longitud de onda corta. Se empleó como patrón una solución de riboflavina 0,112 mg/mL.

3.2.5 - Determinación de la cantidad de peryodato consumido.

La determinación se realizó por modificación de la técnica de Clark (1966). Se pesaron 282, 5 mg de riboflavina y se transfirieron a un frasco color ámbar. Se añadieron 25 mL de agua destilada y se agitó hasta total disolución. Se pesaron 1,926 g de metaperyodato de sodio y se disolvieron en 25 mL de agua destilada. Esta solución se mezcló con la de riboflavina y se mantuvo en la oscuridad a temperatura ambiente. A intervalos de tiempo (30, 70 y 100 min) se midieron, para cada uno, 3 alícuotas de 1

mL, se traspasaron a 3 Erlenmeyers de 125 mL de capacidad que contenían, cada uno, 5 mL de ácido sulfúrico de concentración molar en equivalente 1 mol/L y 5 mL de yoduro de potasio al 20 %. El yodo formado se valoró inmediatamente con solución de tiosulfato de sodio de concentración molar en equivalente 0.987 mol/L. Esta solución se añadió lentamente hasta que se obtuvo un color amarillo tenue, se adicionó entonces 1 mL de solución indicadora de almidón soluble al 1% y se continuó agregando solución de tiosulfato hasta la desaparición del color azul. Se anotó la cantidad de tiosulfato consumida en la valoración del yodo. Se calculó la cantidad de peryodato consumido para cada tiempo de reacción seleccionado según la fórmula indicada por Clark. Se consideró el valor promedio de 3 determinaciones para cada tiempo. Se empleó un blanco reactivo.

3.2.6 - Determinación de la cantidad de ácido fórmico producida.

La determinación se realizó por modificación de la técnica de Clark (1966). Transcurridos los 100 min. de la reacción de oxidación se añadieron a la mezcla 45,2 μ L de etilenglicol, se agitó ocasionalmente durante 25 min a temperatura ambiente y en la oscuridad. Posteriormente se midieron 3 alícuotas de 5 mL cada una, se transfirieron a 3 Erlenmeyer de 250 mL de capacidad y se añadió 1 gota de fenolftaleína a cada uno. Se tituló con solución de hidróxido de sodio de concentración molar en equivalente 0,0497 mol/L. Esta solución se adicionó hasta la aparición del color rosa tenue. Se anotaron los volúmenes de base consumidos en las valoraciones. Se calculó la cantidad de ácido fórmico producida según la fórmula indicada por Clark. Se consideró el valor promedio de las 3 determinaciones. Se empleó un blanco reactivo.

3.3 - PREPARACIÓN FINAL DEL CONJUGADO GV - BSA.

Se empleó una modificación de la técnica de Ragupathi (1991). En un frasco color ámbar de 60 mL de capacidad se disolvieron 67,8 mg de riboflavina en 6 mL de agua destilada, se añadió, gota a gota, una solución de 231,12 mg de metaperyodato de sodio en 3 mL agua destilada y el frasco se tapó con una tapa de color oscuro La mezcla se agitó ocasionalmente durante 100 min. a temperatura ambiente y en la oscuridad. Posteriormente se adicionaron 135 μ L de etilenglicol y se agitó ocasionalmente durante 25 min a temperatura ambiente, manteniendo la mezcla en la oscuridad. Se ajustó el pH de la mezcla a 9,5 con solución de hidróxido de sodio de concentración molar 1 mol/L, a continuación se añadieron 198 mg de BSA disueltos en 7 mL de solución tampón carbonato pH 9,5 y se agitó en una zaranda durante 120

min a temperatura ambiente. Se adicionaron 7,8 mg de borohidruro de sodio disueltos en 3 mL de agua destilada. La mezcla se incubó a 37 °C en un termostato durante 3 horas. La mezcla se dializó contra agua destilada, con cambios sucesivos de la misma, durante 24 horas. Al dializado se le añadió, gota a gota desde una bureta, solución saturada de sulfato de amonio hasta la precipitación de la proteína. Se enfrió a 4 °C durante 30 min y se centrifugó a 1500 rpm durante 15 min. El sobrenadante se separó del precipitado por decantación y se le repitió el tratamiento con la solución saturada de sulfato de amonio. Los precipitados se reunieron, se lavó 2 veces con solución de sulfato de amonio al 40 %, se centrifugó a 1500 g durante 15 min y se separó el precipitado por decantación. El mismo se disolvió en solución tampón fosfato pH 7 y se dializó contra agua destilada durante 12 h. El conjugado, contenido en el dializado, se guardó en un frasco color ámbar a 4 °C. La concentración de proteína en el dializado se determinó por el método de Lowry (1951).

3.4 - DETERMINACIÓN CUANTITATIVA DE PROTEÍNAS.

La cuantificación de proteína se realizó por el método de Lowry (1951). En un tubo de ensayos se adicionaron 0,5 mL del dializado, 2,5 mL del reactivo C, se mezclaron y se dejó en reposo durante 10 min a temperatura ambiente. Se añadió 0,25 mL del reactivo D, se agitó la mezcla inmediatamente y se dejó reposar durante 30 min. Se leyó la absorbancia a 700 nm usando un blanco reactivo.

Para la confección de la curva patrón, a partir de la solución madre de BSA 0,995 mg/mL, se midieron alícuotas de 2,5; 5; 7,5; 10 y 12,5 mL, se transfirieron a 5 frascos volumétricos de 50 mL de capacidad y se enrasó con agua destilada, resultando así soluciones patrones de concentraciones: 50, 100, 150, 200 y 250 µg/mL, las que fueron tratadas de la misma manera que la muestra de dializado.

3.5 - REGISTRO DE LOS ESPECTROS UV - VIS.

Todos los espectros fueron registrados en un espectrofotómetro UV - Vis, bajo las siguientes condiciones:

- BSA: concentración = 0,66 mg/mL; pH 8,1 - 8,2; intervalo de longitud de onda: 205 - 295 nm.
- Riboflavina: concentración = $1,12 \cdot 10^{-3}$ mg/ mL; pH 7,7; intervalo de longitud de onda: 205 - 500 nm.

- Riboflavina oxidada: concentración = $1,12 \cdot 10^{-3}$ mg/ mL; pH 5,0 - 5,7; intervalo de longitud de onda: 205 - 500 nm.
- Dializado: concentración de proteína = 0,66 mg/mL; pH 7,8 - 8,0; intervalo de longitud de onda: 260 - 400 nm.

3.6 - ELECTROFORESIS SOBRE ACETATO DE CELULOSA.

Esta electroforesis se le realizó al conjugado presente en el dializado de la segunda diálisis practicada. Se aplicó sobre el papel 1 μ L del dializado. La corrida electroforética se llevó a cabo empleando tampón veronal sódico a pH 8,6, un voltaje de 150 V y una corriente de 10 mA durante 20 min. Para la detección del conjugado GV - BSA el papel se tiñó con una solución de Ponceau 3R al 0,8 % en ácido tricloroacético al 6 % durante 10 min. Posteriormente se aplicó solución de ácido acético al 1 % durante 10 min para la decoloración.

3.7 - ELECTROFORESIS EN GEL DE POLIACRILAMIDA (SDS - PAGE).

Se realizó de acuerdo con el método de Laemmli (1970). Como gel separador se usó acrilamida al 15% y como gel concentrador acrilamida al 5% conteniendo 0,1% de SDS. Las muestras fueron preparadas en buffer Tris - glicina a pH 8,8 conteniendo 2 % de SDS, 11,6% (v:v) de glicerol y 0,001% de bromofenol azul y se calentaron en un baño de agua a ebullición durante 3 min. La corrida electroforética se llevó a cabo aplicando primero 20 mA para concentrar hasta que el bromofenol azul alcanzó el límite superior del gel separador, luego se aplicaron 30 mA para lograr la separación. Después de 5 horas de corrida las proteínas se fijaron con solución de ácido tricloroacético al 10% y ácido sulfosalicílico al 5% durante 30 min. Posteriormente los geles se tiñeron con azul de coomasie R- 250 durante 30 min. Por último, se aplicó la solución decolorante de ácido acético al 10%.

3.8 - EVALUACIÓN DE LA INMUNOGENICIDAD DEL CONJUGADO.

3.8.1 - Esquema de inmunización.

Modelo animal:

Para desarrollar el esquema de inmunización se escogieron 3 conejos F1, semigigantes blancos, del sexo masculino y con un peso entre 2 y 2,5 kg. A estos

biomodelos se les determinó parámetros de salud y control de calidad y poseían los certificados de control microbiológicos emitidos por el Centro Nacional para la Producción de Animales de Laboratorio (CENPALAB, La Habana).

Inmunógeno:

Se utilizó el conjugado riboflavina - seroalbúmina bovina (GV - BSA) y se ajustó la concentración de proteína según la dosis de inoculación para el esquema escogido.

Protocolo de inmunización:

La inmunización se llevó a cabo durante 42 días y se realizaron las inoculaciones cada 7 días por la vía subcutánea. 150 microgramos del inmunógeno se disolvieron en solución salina fisiológica 0,9 % y se mezcló con igual volumen de adyuvante completo de Freund y se agitó vigorosamente hasta lograr una emulsión. Para la primera inmunización se inyectaron los animales con 1 mL de esta emulsión. A partir de la segunda inoculación se aplicó la misma dosis del inmunógeno pero se mezcló con adyuvante incompleto de Freund. Bajo estas condiciones se realizaron 5 inoculaciones. Al final del esquema de inmunización se aplicó un "booster", para lo cual se inyectó, por vía intravenosa en la vena marginal de la oreja, una dosis de 0,5 mL del inmunógeno (1 mg/mL) disuelto en solución salina fisiológica 0,9 %. A los 3 días del "booster" se sacrificaron los animales.

3.8.2 - Obtención del antisuero.

Durante el esquema de inmunización se realizaron sangramientos parciales por la vena central de la oreja de cada animal a los 7 días de efectuadas la 4^{ta}, 5^{ta} y 6^{ta} inoculaciones. Las muestras de sangre extraídas a cada animal se mantuvieron a 37 °C durante 1h y luego a 4 °C durante 24 h. Se centrifugó a 2 500 g durante 10 min, se separó el suero por decantación y se conservó a 4 °C. Para la obtención del suero al final del esquema de inmunización se realizó el sangramiento a través de la punción cardíaca. La muestra de sangre obtenida se trató de la misma manera que las muestras anteriores.

3.8.3 - Detección de los anticuerpos.

3.8.3.1 - Técnica de inmunodifusión bidimensional de Ouchterlony(1948).

Preparación de las placas de vidrio. Se disolvieron 3 g de agar noble en 100 mL de agua destilada mediante calentamiento y se pintaron las placas de vidrio (98 x 60 mm). 1,25 g de agar noble se disolvieron en 100 mL de agua destilada mediante calentamiento, 10 mL de esta solución caliente se derramaron sobre las placas cuidadosamente sin detener la caída. Se dejó enfriar a temperatura ambiente hasta la solidificación total y se realizó la apertura de los pocillos en el agar.

Desarrollo de la técnica. Se realizaron diluciones dobles seriadas de los antisueros obtenidos en las diferentes etapas del esquema de inmunización (1/2, 1/4, 1/8, 1/16 y 1/32) y se colocaron en los pocillos laterales de las placas de vidrio según las manecillas de un reloj. En los pocillos centrales se colocaron 10 μ L: de antígeno (riboflavina) C = 1 mg/L y de los controles, conjugado GV - BSA con una C(BSA) = 1mg/mL y BSA pura con una C = 1mg/mL. Las placas se colocaron en cámara húmeda durante 48 - 72 h. Se consideró como resultado positivo la aparición de una banda de precipitación lineal, cóncava o convexa entre los pocillos centrales y laterales.

Por otra parte, se realizaron diluciones de riboflavina desde 1 hasta 0,02 mg/mL y se colocaron 10 μ L de cada una de estas disoluciones en los pocillos laterales de las placas de vidrio. En los pocillos centrales se colocaron 10 μ L de muestras del antisuero puro obtenido al final del esquema de inmunización. Las placas se colocaron en cámara húmeda durante 48 - 72 h.

3.8.3.2 - Técnica de inmunodifusión radial de Mancini (1965).

Preparación de las placas. Se mezclaron bien 9,4 mL de agar noble con 0,6 mL de antisuero puro obtenido al final del esquema de inmunización a 56 °C. Esta mezcla se derramó sobre la placa de vidrio (98 x 60 mm) cuidadosamente, se dejó solidificar a temperatura ambiente y se hicieron los pocillos.

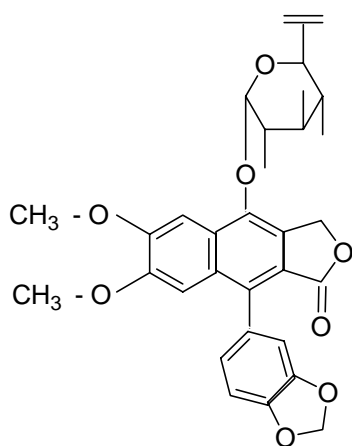
Desarrollo de la técnica. En cada uno de los pocillos se colocaron 10 μ L: de los controles conjugado GV - BSA con una C(BSA) = 1 mg/mL y BSA pura C = 1mg/mL y como muestra riboflavina pura C = 1 mg/mL. La placa se colocó en cámara húmeda durante 48 - 72 h. Se consideró como evidencia positiva la aparición de un anillo de precipitación alrededor del pocillo.

Parte 4

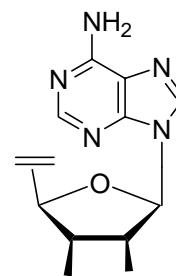
Resultados y Discusión

4- RESULTADOS. DISCUSIÓN.

El establecimiento de la secuencia de reacciones para la conjugación de la riboflavina (I) a la seroalbúmina bovina tuvo su basamento en los trabajos realizados por Ragupathi (1991) y Lauer y Erlanger (1971). Ragupathi, empleando el método de la oxidación de dioles vecinales con peryodato de sodio, logró conjugar a la seroalbúmina bovina (BSA) el Clei - B, un glucósido que posee en su estructura, además de la molécula de glucosa, un sistema de tres anillos condensados (XVI), características estructurales que son similares a las de la riboflavina. Experimentalmente estableció una secuencia de pasos que incluyó reacciones de oxidación, de adición nucleofílica (condensación) y reducción selectiva, empleando 60 μ moles de Clei - B, de metaperyodato de sodio (agente oxidante) y de borohidruro de sodio (reductor selectivo) y 1 μ mol de BSA. Empleando la misma secuencia de reacciones, aunque bajo condiciones diferentes, Lauer y Erlanger conjugaron la B Gase con adenosina, (XVII), compuesto que también tiene características estructurales parecidas a las de la riboflavina pues posee una molécula de ribosa enlazada a un átomo de nitrógeno del sistema de anillos de la adenina.

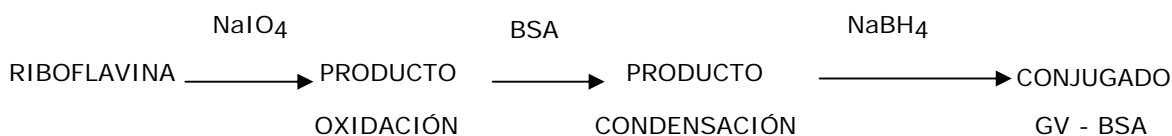


(XVI)



(XVII)

En este trabajo y según lo anterior, se estableció la misma secuencia de reacciones para la obtención del conjugado riboflavina - seroalbúmina bovina (GV - BSA):



En esta secuencia la etapa de la oxidación es fundamental en el proceso de preparación del conjugado, pues es precisamente el producto oxidado quien se acopla con la proteína. Tsang, Greene y Pilcher (1995) en las investigaciones que llevaron a cabo al conjugar la peroxidasa de rábano picante (POD) a anti - IgG humana plantearon, que al parecer, el paso más crítico dentro del procedimiento de conjugación era precisamente el de la oxidación de la POD con peryodato de sodio. Teniendo en cuenta lo anterior, en este trabajo se realizó primeramente un estudio detallado de dicha etapa.

La evaluación de la misma tuvo como objetivos establecer las condiciones óptimas para lograr que toda la riboflavina se oxidara y que la mayor parte de ella se conjugara con la proteína, así como también, a priori, predecir la fórmula estructural del producto de oxidación. Con estos propósitos el estudio consistió en:

- la determinación de la razón molar vitamina : agente oxidante y tiempo de oxidación óptimos,
- la verificación de la oxidación siguiendo su curso por cromatografía de capa fina y por determinación cualitativa de grupos funcionales,
- la determinación de las cantidades de peryodato consumido y de ácido fórmico producido y
- el registro del espectro UV - Vis de la riboflavina oxidada.

En función de mejorar el desempeño de los sistemas químicos, de transformarlos en algo "perfecto, efectivo o funcionalmente lo mejor posible" se han desarrollado varios métodos de optimización, especialmente en química. Dentro de ellos se encuentran el método univariado, el método simplex, el simplex modificado, el simplex super modificado y el de planeamiento factorial (De Paula, Renée, De Andrade y col. 2000).

El método univariado es clasificado como un método secuencial, es conocido también como método clásico de investigación, método del factor único o de estrategia de un factor-por-vez. En el mismo se fijan, a un cierto nivel, todos los factores que están siendo investigados, menos uno de ellos. Posteriormente éste último es variado hasta que se encuentre la mejor respuesta, después de esto este factor es fijado y un nuevo factor sufre variación. El proceso se repite hasta que todos los factores hallan sido

adecuados para dar la mejor respuesta. Este método puede ser empleado tanto para maximizar como para minimizar una respuesta.

En este trabajo, para poder encontrar la mejor razón molar riboflavina : metaperyodato y el mejor tiempo de oxidación en el proceso de conjugación de la vitamina a la seroalbúmina bovina (BSA) se empleó una aproximación del método univariado, y para ello se definió como función objetivo (respuesta) la concentración de riboflavina oxidada en el agua de diálisis, en este caso el método univariado se empleó para minimizar la respuesta, es decir se buscaron las condiciones experimentales que dieron lugar a una menor concentración de riboflavina oxidada (GV - CHO) en el agua de diálisis, es de suponer que mientras menor sea la concentración de riboflavina que se encuentre en el agua de diálisis mayor será la que se habrá conjugado a la BSA. Esta valoración fue completada siguiendo el curso de la oxidación por cromatografía de capa fina.

En un proceso de oxidación influyen de manera significativa la concentración del agente oxidante, la temperatura, el tiempo y el pH de la mezcla de reacción. En este estudio se determinaron como variables o factores la concentración del agente oxidante según las razones molares riboflavina : metaperyodato de sodio, 1 : 1; 1 : 3 y 1 : 6 (factor r_m) y el tiempo de oxidación, 75, 90 y 100 min (factor t). El resto de los parámetros del proceso de conjugación como: cantidad de BSA, tiempo, temperatura y pH de condensación, cantidad de borohidruro de sodio, tiempo y temperatura de reducción se mantuvieron constantes, según el trabajo de Ragupathi (1991).

Las concentraciones de riboflavina (respuesta) en las aguas de diálisis para las diferentes variables fueron determinadas por el método fluorométrico, la curva de calibración se muestra en la Figura 1. Los resultados de estas mediciones se muestran en la Tabla 2. La superficie de respuestas obtenida como función de las variables r_m y t se representa en la Figura 2. El tiempo de oxidación de la vitamina se fijó, inicialmente, a un valor de 75 min y la razón molar vitamina : agente oxidante se varió a lo largo del segmento AC (1 : 1, 1 : 3, 1 : 6). Como se puede observar, en la Tabla 2, la respuesta en el punto A fue de 51,76 $\mu\text{g} / \text{mL}$, esto significa que de los 22500 μg de riboflavina de partida se eliminan sin reaccionar en el agua de diálisis 19927,6 μg , lo que representa un 88,17 % que al menos no reaccionó con la proteína. La respuesta en el punto B fue mejor que en A, puesto que la concentración de riboflavina disminuyó a 39,30 $\mu\text{g} / \text{mL}$, saliendo sin reaccionar con la BSA, al menos, 15130,5 μg , para un 66,95 %, esto corresponde a vitamina tanto oxidada como sin oxidar. Al cambiar la razón molar a 1 : 6 (punto C) la respuesta mejoró algo más,

pues la concentración bajó a un valor de 30,53 $\mu\text{g} / \text{mL}$ (11754,05 μg). Para esta variante, prácticamente, la mitad de la riboflavina se elimina en el agua de diálisis (52,01 %), esta cantidad incluye también vitamina oxidada y sin oxidar. En este punto, teniendo en cuenta que ya se había empleado un exceso considerable de agente oxidante y que la diferencia entre las dos últimas respuestas no era tan significativa, se decidió mantener constante la razón molar en 1 : 6 y variar el factor tiempo de oxidación (t) a lo largo del segmento CE. En el punto D, la respuesta fue mucho mejor que en los casos anteriores considerando que la concentración de vitamina que se elimina en el agua de diálisis es muy pequeña, 9,2 $\mu\text{g} / \text{mL}$ (3542 μg), esto significa que no reacciona con la proteína el 15,67 % de la riboflavina oxidada, fundamentalmente. Al aumentar el tiempo hasta 100 min (punto E) se logró minimizar aún más la cantidad de riboflavina oxidada en el agua de diálisis, eliminándose solamente el 12,69 %.

El curso de la reacción de oxidación de la riboflavina, cuando se emplearon las razones molares 1 : 3 y 1 : 6, fue seguido mediante cromatografía de capa fina a los diferentes intervalos de tiempo. En la Figura 3 se muestran los resultados para la razón molar 1 : 3. Como se puede observar a partir de los 30 min de reacción aparecen en los cromatogramas dos manchas fluorescentes, una al nivel del patrón de riboflavina y la otra por encima de ésta, indicando la formación del producto de oxidación, a los 75 min la cantidad de riboflavina sin oxidar es considerable según las dimensiones de la mancha correspondiente y por la intensidad de la fluorescencia de la misma. Esto pone de manifiesto que la concentración de riboflavina determinada en el agua de diálisis en el punto B (Figura 2) incluya tanto riboflavina oxidada como sin oxidar, de aquí que más del 50 % de la vitamina se pierde en el agua de diálisis. Es de notar que aún a los 90 min de reacción la cantidad de vitamina sin oxidar es grande. La Figura 4 muestra los resultados alcanzados cuando se siguió el curso de la oxidación para la razón molar 1 : 6. En este caso y según el cromatograma el proceso ocurre mucho mejor. A los 75 min de reacción todavía aparecen las dos manchas, indicando al igual que en el caso anterior la existencia de vitamina sin oxidar, por lo que la cantidad calculada en el punto C (Figura 2) incluye vitamina oxidada y sin oxidar. A los 90 min la cantidad de riboflavina sin oxidar es mínima, no sólo por el tamaño de la mancha, sino también por la intensidad de la fluorescencia. A los 100 min no aparece mancha de la vitamina sin oxidar, por lo cual bajo estas condiciones, el proceso de oxidación es completo. De este resultado es que se puede asegurar que en el punto E (Figura 2) el 12,75 % de riboflavina que se elimina en la diálisis corresponde solamente a la oxidada que no reaccionó con la BSA.

Se calcularon los valores de R_f para cada mancha en el caso de la variante 1 : 6 (Figura 4), los resultados se dan en la Tabla 3, correspondiendo a la riboflavina

oxidada (GV - CHO) un valor de 0,46, superior al de la riboflavina, 0,39 (Guerra, Martínez, Cobas y col. 2002).

La oxidación de la riboflavina debe conllevar a la introducción en la molécula de un grupo formilo (- CHO), por lo cual para verificar la existencia de riboflavina oxidada, tanto en la mezcla de reacción final, como en el dializado y en el agua de diálisis, en todas las variantes experimentales establecidas, se realizaron los ensayos cualitativos clásicos para la detección de los grupos funcionales carbonilo y formilo. Para todas las variantes y en los tres casos se obtuvieron los siguientes resultados: con el reactivo 2,4 - dinitrofenilhidracina se obtuvo un precipitado de color amarillo naranja, indicativo de la presencia del grupo carbonilo, con el reactivo de Tollens se obtuvo el espejo de plata y con el reactivo de Fehling un precipitado de color pardo rojizo, lo que evidenció la presencia del grupo formilo, corroborándose la ocurrencia de la reacción y la presencia del producto de oxidación tanto en el dializado como en el agua de diálisis (Guerra, Martínez, Cobas y col. 2002).

Tsang, Greene y Pilcher (1995) para llevar a efecto la conjugación de peroxidasa de rábano picante (POD) a anti - IgG humana realizaron un proceso de optimización que incluyó todas las etapas de la secuencia de reacciones para la preparación del conjugado. Para la oxidación consideraron como variables: la razón molar NaIO_4 / POD (10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 y 100), la temperatura (25 y 37 °C), el tiempo (5, 10, 15, 30 y 60 min) y el pH (3; 3,5; 4; 4,5; 5; 5,5; 6; 6,5; 7; 7,5 y 8). Para el acoplamiento escogieron como variables: la temperatura (4, 25 y 37 °C), el tiempo (0,5; 1; 5 y 22 h), el pH (7; 7,5; 8; 8,5; 9; 9,5; 10; 10,5 y 11) y la razón molar POD / IgG (0,5; 1; 2; 3; 4; 5; 6; 7; 8; 9 y 10). Para la reacción de reducción consideraron las concentraciones de NaBH_3CN (0,1; 0,01 y 0,001 mol/L). Para cada variable fue determinada la actividad enzimática del conjugado y como condiciones experimentales óptimas del proceso fueron escogidas aquellas donde la actividad fue mayor. Las mejores condiciones encontradas fueron: para la oxidación: relación molar NaIO_4 / POD: 40 : 1, tiempo: 5 min, temperatura: 37 °C, pH 5,0. Para el acoplamiento: radio molar POD : anti - IgG humana: 6 :1, tiempo: 24 h, temperatura: 4 °C y pH: 10,0.

La reacción de los dioles vecinales con metaperyodato de sodio es cuantitativa, pudiendo calcularse el número de enlaces carbono - carbono escindidos según la cantidad de peryodato consumida y la cantidad de ácido fórmico producida en la reacción, todo lo cual está relacionado directamente con la estructura del diol. Por estas razones y para predecir, a priori, la estructura del producto de oxidación de la riboflavina se determinaron, tanto, el consumo de metaperyodato de sodio, como la

cantidad de ácido fórmico que se obtiene en la reacción, escogiéndose para ello la variante donde la razón molar riboflavina : agente oxidante fue de 1 : 6. La Tabla 4 muestra los resultados alcanzados al determinar la cantidad de metaperyodato de sodio consumida en la oxidación. Como era de esperar, a medida que aumenta el tiempo de reacción aumenta el consumo del agente oxidante y a los 100 min han reaccionado 3,02 moles, lo que indica el rompimiento de los tres enlaces carbono - carbono unidos a los grupos hidroxilos vecinales presentes en el resto de la molécula de ribitol que posee la riboflavina. La cantidad, en moles, de ácido fórmico producida al final de la oxidación fue de 2,01; lo que está acorde con la estructura de la riboflavina y corrobora que la ruptura de la cadena del resto de ribitol fue completa, por lo que, teniendo en cuenta además los resultados de los ensayos cualitativos practicados a la mezcla de oxidación, puede plantearse, de forma general, que la estructura del producto de oxidación corresponde a R - CH₂ - CHO, donde R = sistema de anillos de isoaloxazina (Anexo A).

Para culminar la investigación de la reacción de oxidación se realizó un estudio espectroscópico con el objetivo de verificar si existían diferencias apreciables en cuanto a la absorción ultravioleta - visible entre la riboflavina nativa y la oxidada en la mezcla de reacción. Según lo reportado por Strohecker y Henning (1967) la curva de absorción de la riboflavina, en solución neutra o débilmente ácida, exhibe máximos de absorción a longitudes de onda de 223, 267, 373 y 444 nm, siendo máxima la extinción a 267 nm. En las Figuras 5 y 6 están representados, respectivamente, los espectros UV - Visible de una solución de riboflavina nativa, pH 7,7 y de la riboflavina oxidada (GV - CHO) en la mezcla de reacción cuyo pH resultó estar entre 5 y 5,7. En la Tabla 5 se muestran los valores de las principales bandas de absorción producto del registro de dichos espectros. Como puede apreciarse los máximos de absorción para el patrón de riboflavina coinciden con lo reportado por Strohecker y Henning (1967). En el caso de la vitamina oxidada se observan desplazamientos de los máximos de absorción con respecto a la no oxidada que no resultan ser significativos, debe tenerse en cuenta que el espectro no fue registrado en estado puro, a lo cual puede atribuirse esos leves corrimientos. Estos resultados sugieren que la ruptura de la cadena lateral de ribosa, que posee la riboflavina en su estructura, influye muy poco en su espectro UV - Visible, de lo que se infiere que la absorción está solamente relacionada con el sistema de anillos de la isoaloxazina (Guerra, Martínez, Cobas y col. 2002).

Teniendo en consideración todos los resultados a los que se llegaron producto del estudio de la reacción de oxidación de la riboflavina se pueden plantear como

ecuaciones químicas para la preparación del conjugado GV - BSA las que se representan en el Anexo A.

Los métodos de purificación de los conjugados hapteno - proteína varían en dependencia de la vía que se utilice para su preparación y de lo que se persiga con ellos y van desde realizar una simple diálisis, empleando agua destilada o una solución tampón, como lo reportan Kim, Kim y Kim (1995 y 1996) cuando prepararon los conjugados glucosa - 6 - fosfato deshidrogenasa - biotina, fosfatasa alcalina - biotina, adenosina - desaminasa y avidina - riboflavina, o varios procesos de diálisis, como en la conjugación de L - epinefrina a la BSA llevada a cabo por Yoshioka, Kobayashi - Iwase y col. (1987), hasta aplicar métodos combinados como diálisis y cromatografía de filtración en gel, tal es el caso de la obtención del conjugado L - norepinefrina - BSA reportado por Yoshioka, Iwai - Yamasaki y col. (1987), o dos métodos cromatográficos como emplearon Nodake y Yamasaki (2000) para preparar el conjugado derivado del monometoxipolietilenglicol - lisozima.

La purificación del conjugado GV - BSA se llevó a cabo realizando una primera diálisis contra agua destilada, luego se procedió a una precipitación por salado empleando sulfato de amonio como sal neutra y por último se dializó nuevamente contra agua destilada, proceso que de manera similar utilizaron Hattori, Nagasawa y col. (1994) en la conjugación de β - lactoglobulina con carboximetildextrana. Según reportan Boné, Sánchez y col. (1997) una gran ventaja de la precipitación salina con sulfato de amonio es que, por lo general, las proteínas se estabilizan en esa solución. La alta concentración salina evita la proteólisis y tiene como ventaja el que el producto se puede dejar toda la noche en la solución de dicha sal. Pero debe tenerse en cuenta que la salinidad sólo reduce la solubilidad, por lo que nunca precipitan todas las proteínas.

El uso del método de precipitación con sulfato de amonio complementó, en parte, la purificación del conjugado GV - BSA, obteniéndose una masa amorfa de color amarillo tenue, la que después de disuelta en el tampón fosfato pH 7 y dializada dio lugar a un dializado de igual color. Se obtuvieron 18,5 mL de dializado con una concentración de proteína de 8,12 mg/mL, lo cual significa una masa de proteína de 151,31 mg para un 76,41 % de recuperación de la misma, perdiéndose durante el proceso de precipitación salina el 23,59 %. La cuantificación se realizó por el método de Lowry (1951) y en la Figura 7 se muestra la curva de calibración obtenida para tal fin.

Según demostraron Hattori, Nagasawa y col. (1994) y Hattori, Imamura y col. (1994) en estos casos el conjugado se encuentra acompañado de proteína sin reaccionar y de proteína polimerizada consigo misma, las cuales de hecho no pueden ser separadas

por diálisis, por lo que es de suponer que el conjugado GV - BSA se encuentre al menos acompañado de BSA polimerizada, de todas formas se puede plantear que la vía escogida es factible, demostrado por los resultados obtenidos al practicar los ensayos cualitativos de 2,4 - dinitrofenilhidracina, Tollens y de cloruro de bario. Todos resultaron negativos evidenciándose la ausencia en el dializado de riboflavina oxidada sin reaccionar y de remanente de sulfato de amonio (Tabla 6). Para un ensayo preliminar de la inmunogenicidad del conjugado se puede aceptar el grado de pureza con el que se obtuvo el conjugado GV - BSA.

La identificación del conjugado GV - BSA se llevó a cabo, fundamentalmente, mediante su espectro UV - Visible, electroforesis sobre acetato de celulosa y en gel de poliacrilamida (SDS - PAGE).

El espectro UV de una solución patrón de BSA, pH 8,1 - 8,2, se representa en la Figura 8 y el UV - Vis de una muestra del dializado final conteniendo el conjugado GV - BSA, pH 7,8 - 8,0 se muestra en la Figura 9. Las asignaciones de las principales bandas de absorción encontradas al efectuar el registro de estos espectros se refieren en la Tabla 5. El espectro UV de las proteínas tiene dos máximos: uno en el intervalo de 210 a 220 nm, debido a la absorción de los enlaces peptídicos y otro alrededor de 280 nm, dado por la absorción de los residuos de aminoácidos que contienen anillos aromáticos (Chávez, Pérez, Delfín y col. 1988). Como puede observarse para el caso del patrón de BSA los dos máximos de absorción experimentales corresponden con lo reportado en la literatura. Por su parte, los máximos de absorción encontrados para el conjugado GV - BSA indican que aquellos correspondientes a las longitudes de onda 261 y 381 nm deben identificarse con dos de los máximos de la riboflavina oxidada en la mezcla de reacción (269 y 380 nm respectivamente) y los de 216 y 279 nm con los de la BSA patrón (218 y 280 nm respectivamente), mientras que el máximo a 354 nm permite corroborar la formación del conjugado a partir de los productos anteriores (Guerra, Martínez, Cobas y col. 2002).

Se pudo evidenciar, además, que esta señal a 354 nm, y con la que se ha identificado el conjugado GV - BSA, no se ve afectada por el tiempo, lo cual se demostró al registrarle el espectro UV - Visible a dicho conjugado después de 3 años de preparado, mantenido en un frasco color ámbar y a 4°C. Cabe señalar también, que en el espectro aparecen dos señales a 262 y 384 nm, identificables con dos de los máximos de absorción de la riboflavina (267 y 373 nm) y una tercera señal a 280 nm atribuible a la proteína. A pesar de que no se puede hacer referencia a que el conjugado es estable por este tiempo, ello sí constituye un indicio de la no

degradación del mismo. Teniendo en cuenta, la importancia de su estabilidad, es aconsejable realizar un estudio más profundo para valorar este aspecto.

Los resultados de la electroforesis sobre acetato de celulosa se ilustran en las Figuras 10 y 11. En este caso no se logró visualizar la banda correspondiente al conjugado GV - BSA, pues no hubo aparición de mancha al teñir con el colorante rojo, Ponceau 3R, lo cual puede indicar que los sitios por donde el colorante reacciona con la proteína estén ocupados (Figura 10). De todas formas, antes de proceder al teñido, aparecen dos manchas amarillas desplazadas del origen en el caso del dializado (Figura 11). De ambos electroforegramas puede inferirse que la banda inferior, de las dos que aparecen para el dializado, corresponde al conjugado GV - BSA, pues al tener una masa molecular ligeramente superior a la de la proteína su desplazamiento es menor.

En la Figura 12 se muestra un esquema del electroforegrama resultante de la realización del SDS - PAGE, los resultados son similares a los anteriores, para el conjugado aparecen dos manchas, una al nivel de la proteína y la otra por debajo de ésta, atribuible a la formación de un enlace covalente entre la riboflavina y la BSA.

De los resultados de ambas electroforesis se puede apreciar la presencia de proteína sin reaccionar en el dializado, lo cual era de esperar teniendo en cuenta que el procedimiento llevado a cabo para la purificación del conjugado no permite la separación de la misma.

El empleo del SDS - PAGE para confirmar la formación de un enlace covalente entre un hapteno y una proteína portadora ha sido reportado por diferentes autores, entre los que se pueden citar: Kato, Mifuru y col. (1992) en la obtención de los conjugados dextrana - caseína y galactomanano - caseína y Hattori, Nagasawa y col. (1994) en la conjugación de carboximetildextrana con β - lactoglobulina.

De esta manera quedó establecido un procedimiento experimental para la conjugación de la riboflavina con la seroalbúmina bovina.

El conjugado GV - BSA semipurificado fue utilizado como inmunógeno para desarrollar un esquema de inmunización en conejos. Los resultados del comportamiento de los antisueros obtenidos a los siete días después de la 4^{ta}, 5^{ta}, 6^{ta} inoculaciones y al final del esquema de inmunización, evaluados por la técnica de inmunodifusión bidimensional de Ouchterlony, se muestran en las Figuras 13, 14, 15 y 16. Estos resultados fueron similares para los tres conejos utilizados en el esquema de

inmunización. Como puede observarse, de forma general, bajo las condiciones en que se realizó la inmunización, solamente se observan las bandas de precipitación para el conjugado GV – BSA y la BSA pura (variantes A y C respectivamente), dado indiscutiblemente, por la elevada inmunogenicidad de esta proteína. Los títulos de anticuerpos aumentaron desde 4 hasta 32 para el conjugado GV – BSA y desde 2 hasta 16 para la BSA.

De todo lo anterior se evidencia la no formación de anticuerpos específicos contra la riboflavina. La no visualización de la banda de precipitación para esta vitamina aún cuando al final del esquema de inmunización se ha producido una respuesta secundaria, podría deberse a que la concentración de anticuerpos específicos contra la riboflavina estaba por debajo del lumbral de la técnica aplicada como para que la reacción antígeno - anticuerpo fuera visible. En los resultados obtenidos pudo haber influido también el esquema de inmunización escogido, en el cual sólo se empleó la vía de inoculación subcutánea, lo que favorece la estimulación inmunológica cuando se trabaja con proteínas como inmunógeno, resultando ser más adecuado la vía de inoculación intradérmica, cuando se quieren obtener antisueros específicos al utilizar haptenos conjugados con péptidos como inmunógenos y lo que se desea es identificar el hapteno (Margni,1982). Diferentes autores, Fasquell, Barrier y Daguet (1970), Margni (1982) y Davis, Dulbecco y col. (1980), reportan que los resultados por esta técnica pueden verse afectados por el fenómeno de zona cuando existe un exceso del antígeno, lo que no permite visualizar la banda de precipitación al formarse el complejo antígeno - anticuerpo. Esto puede explicar el comportamiento del título de anticuerpos obtenidos para el conjugado GV - BSA y la proteína pura.

Teniendo en cuenta todo lo anterior, el antisuero obtenido al final del esquema de inmunización fue analizado empleando la misma técnica de Ouchterlony pero realizando diluciones de riboflavina, desde 1 hasta 0,02 mg/mL, colocando las muestras de las mismas en los pocillos laterales de las placas de vidrio y en los centrales muestras del antisuero puro, con el objetivo de conocer la concentración óptima del antígeno que logra la equivalencia con la concentración óptima de anticuerpo específico contra la riboflavina. El resultado de esta determinación se muestra en la Figura 17. Como se puede apreciar la banda de precipitación apareció en el rango de concentraciones de riboflavina de 0,6 - 0,9 mg/mL.

De forma preliminar y con el objetivo de demostrar cualitativamente la presencia de anticuerpos anti – riboflavina se aplicó la técnica de inmunodifusión de Mancini, utilizando como controles conjugado GV - BSA y BSA pura. Los resultados se muestran en la Figura 18. En la misma se aprecia la formación de un anillo de

precipitación en la reacción específica antígeno - anticuerpo para la riboflavina, así como también para el conjugado GV - BSA y para la BSA pura. Con el diámetro de cada anillo de precipitación formado se puede inferir la proporcionalidad de anticuerpos específicos presentes en el antisuero policlonal, siendo superior el número de anticuerpos contra el conjugado GV - BSA y contra la propia proteína que contra la riboflavina, lo que era de esperar según los resultados a los que se llegaron en los análisis anteriores.

De forma general, se puede plantear que los resultados obtenidos corroboran la inmunogenicidad que aportó la proteína en el conjugado para el hapteno, al demostrarse la formación de anticuerpos específicos contra la riboflavina.

Por otro lado, y preliminarmente, en este trabajo se conjugó la riboflavina a la proteína P64k como proteína portadora. El procedimiento experimental empleado para la conjugación fue similar al de la obtención del conjugado GV – BSA.

La P64k es una proteína que se encuentra en la membrana externa de las cepas patogénicas de *Neisseria meningitidis*. Fue aislada en el Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología de la Ciudad de la Habana y mediante tecnología del DNA recombinante, se logró la clonación y expresión en *Escherichia coli* del gen que la codifica (Gómez, Madrazo, González y col. 1999).

González, Álvarez, Caballero y col. (2000) lograron acoplar esta proteína recombinante a péptidos sintéticos y polisacáridos meningocócicos del grupo C aplicando el método del glutaraldehído. Los conjugados péptido – proteína fueron identificados mediante SDS – PAGE, determinándose la concentración de proteínas por el método de Lowry, y analizados por Immunoblot , usando anticuerpos monoclonales y policlonales, los que reconocieron a cada péptido en particular. La respuesta inmune humoral obtenida contra péptidos homólogos fue más elevada en los animales inmunizados con el conjugado péptido – P64k que con el péptido libre. Similarmente los niveles de anti – polisacáridos del grupo C fueron significativamente más altos en el polisacárido conjugado que en el polisacárido sin conjugar. Las características como proteína portadora también fueron evaluadas en comparación con la BSA y el toxoide tetánico (TT), quedando bien establecida la posibilidad de emplearla con dicho fin.

Por tal razón, y por primera vez, en este trabajo se acopla la proteína recombinante P64k a moléculas de bajas masas moleculares, como las vitaminas, particularmente la riboflavina, lo cual constituye una novedad.

Para la identificación, a priori, del conjugado riboflavina – P64k se registró su espectro UV – Visible, comparándose con los correspondientes a la proteína y a la vitamina. El espectro UV de la P64k mostró un máximo de absorción a 223 nm, que puede correlacionarse con la absorción de los enlaces peptídicos (210 – 220 nm) y un segundo máximo a 267 nm, muy por debajo de lo habitual para proteínas (280 nm), aunque en esta región, 260 – 275 nm, aparece una meseta, lo que puede ser atribuible al contenido de residuos de aminoácidos que contienen anillos aromáticos en esta proteína. En el espectro UV – Visible del conjugado riboflavina - P64k recombinante se detectaron tres máximos de absorción, 219, 261 y 358 nm,. Este último permite inferir la formación del conjugado a partir de la proteína y de la vitamina. Lo anterior está en correspondencia con el máximo de absorción asignado al conjugado riboflavina – seroalbúmina bovina (GV – BSA). Todo lo anterior sugiere el continuar los estudios sobre el conjugado riboflavina – P64k, fundamentalmente en lo que se refiere a la identificación empleando SDS – PAGE y a la valoración de la posible actividad inmunogénica.

Parte 5

Conclusiones

5- CONCLUSIONES.

1) Se obtuvo el conjugado riboflavina - seroalbúmina bovina (GV - BSA) mediante la oxidación de la vitamina con peryodato de sodio en una relación molar 1 : 6 y un tiempo de reacción de 100 min posterior condensación con 1 μ mol de seroalbúmina bovina durante 120 min y reducción de la base de Schiff con borohidruro de sodio y se semipurificó empleando dos procesos de diálisis y precipitación por salado.

2) Se demostró la formación de un enlace covalente entre la riboflavina y la seroalbúmina bovina mediante electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS - PAGE), dicho conjugado mostró una banda de absorción a los 354 nm según su espectro ultravioleta - visible, asignación que no corresponde a la de la proteína ni a las de la vitamina.

3) Se obtuvo un antisuero policlonal por inmunización de conejos con el conjugado GV - BSA, demostrándose la presencia de anticuerpos específicos contra la riboflavina por la visualización de la banda de precipitación antígeno - anticuerpo, según la técnica de inmunodifusión radial doble de Ouchterlony y se determinó, mediante la técnica de Mancini, la proporcionalidad de esos anticuerpos en el antisuero, siendo mayor en la reacción con el conjugado GV - BSA y con la BSA que con la riboflavina. Resultados que demuestran la inmunogenicidad que para la riboflavina aportó la proteína en el conjugado.

Parte 6

Recomendaciones

6- RECOMENDACIONES.

1- Optimizar el esquema de inmunización empleado con la finalidad de obtener antisueros de altos títulos de anticuerpos anti - riboflavina que permitan su empleo en la cuantificación de la vitamina.

2- Realizar el estudio de la reactividad cruzada con otra vitamina de estructura relacionada.

3- Efectuar el estudio de la aplicación del anticuerpo policlonal sobre el control de la calidad de la materia prima en la formulación de medicamentos que incluya a la riboflavina y de la cuantificación de la misma en residuales industriales, comparando con los métodos clásicos de análisis de esta vitamina.

Parte 7

Bibliografía

7- BIBLIOGRAFÍA.

Akhrem, A. and Kuznetsova, A. Thin Layer Chromatography a Practical Laboratory Handbook. Israel Program for Scientific Translation. Jerusalem, p. 96 (1965).

Allen, P.Z., Goldstein, I.J. and Iyer, R.N. Immunochemical studies on a sophorosyl - azoprotein conjugate. *Biochemistry* **6** (10): 3029 - 36 (1967) según Chem. Abstr. **67** :106917c (1967).

Arakawa, H.; Kokado, A.; Yoshizawa, S. et al. Biduminescent PCR - RFLP enzyme - linked immunosorbent assay for analysis of vitamin D receptor gene polymorphism. *Anal. Sci.* **15**: 943 - 9 (1999) según KAGAKU SHOHO (647): 268 (2000).

Baner, D.C. The molecular properties of antibodies synthesized in response to simple haptens. *J. Immunol.* **91** (3): 323 - 30 (1963) según Chem. Abstr. **60**:14993c (1964).

Bartos, E. Practice and Theory of Enzyme Immunoassays. Barcelona, pp. 279 - 96 (1988).

Basmadjian, G. P.; Singh, S.; Sastrodjojo, B. et al. Generation of polyclonal catalytic antibodies against cocaine using transition state analogs of cocaine conjugated to diphtheria toxoid. *Chem. Pharm. Bull.* **43** (11): 1902 - 11 (1995) según KAGAKU SHOHO (554): 2127 (1996).

Bauwens, R. M.; Kint, J. A.; Devos, M. P. et al. Production, purification and characterization of antibodies to 1, 25 - dihydroxyvitamin D raised in chicken egg yolk. *Clin. Chim. Acta* **170** (1): 37 - 44 (1987).

Berger, M. Production of antibodies that bind biotin and inhibit biotin containing enzymes. *Biochem.* **14** (11): 2338 - 42 (1975) según Chem. Abstr. **83**: 41287f (1975).

Berry, L.; Chuen, A.K. and Andrew, M. Polypeptide - polysaccharide conjugates produced by spontaneous non - enzymatic glycation. *J. Biochem.* **124** : 434 - 9 (1998) según KAGAKU SHOHO (619): 11524 (1998).

Biart, J. R.; Serrano, P. y Conde, J. Estudio de las Mieles Finales de la Caña de Azúcar. ICIDCA. Editorial Científico - Técnica. Ciudad Habana, p. 86 (1982).

Blanco, G. La Producción de Alcohol a partir de la Industria Azucarera y sus Posibilidades. ICIDCA. Editorial Científico - Técnica. La Habana, pp. 41 - 4 (1982).

Boné, O.; Sánchez, K.; Tamayo, G. et al. Nueva variante de purificación a escala productiva de la materia prima activa de la vacuna contra la garrapata *Boophilus microplus* GAVAC®. Biotec. Apl. **14**: 126 - 7 (1997).

Borek, F., Silverstein, A.M. and Gell, P.G.H. Delayed hypersensitivity to hapten - protein conjugates. III. Saccharides as haptens. Proc. Soc. Exptl. Biol. Med. **114** (2): 266 - 7 (1963) según Chem. Abstr. **60**: 9755h (1964).

Camella, T. and Bichi, G. ----- . Bull. Chem. Pharm. **122** (4): 205 - 8 (1983).

Capelle, N.; Fournier, E.; Kuntz, M. O. et al. Use of radioimmunological techniques for studying the antigenicity of morphine. J. Eur. Toxicol. **7** (3): 147 - 51 (1974) según Chem. Abstr. **82**: 84263 s (1975).

Castro, Z.; Coll, F. y Nogueiras, C. Síntesis de haptenos esteroideos. Resúmenes. XIII Conferencia de Química. Universidad de Oriente. Universidad Estatal de Leningrado. Santiago de Cuba, p. 191 (1990).

Chávez, M. A.; Pérez, U.; Delfín, J. et al. Manual de prácticas de laboratorio de enzimología. U. H. Facultad de Biología. Ciudad de la Habana. Editorial Pueblo y Educación, p. 16 (1988).

Clark, J. M. Bioquímica Experimental. Editorial Acribia. Zaragoza. España, pp. 30 - 2 (1966).

Conrad, D.H. and Wirtz, G.H. Characterization of antibodies to vitamin A. Immunochem. **10** (4): 273 - 5 (1973) según Chem. Abstr. **78**: 57757k (1973).

Davis, B. D.; Dulbecco, R.; Eisen, H. H.; Ginsberg, H. S.; Wood, W. B. y Mc Carty, M. Tratado de Microbiología. Segunda Edición. Salvat Editores, S. A. España, pp. 368 - 421 (1980).

De la Fuente, J.; Rodriguez, M. P.; Castro, O. F. et al. Los postulados de Koch y la neuropatía epidémica. *Biotec. Apl.* **14** (2): 135 - 9 (1997).

De Paula, S.; Reneé, A.; De Andrade, J. et al. Planeamiento experimental y optimización. *Métodos de Optimización en Química*. www.chemkeys.com Marzo 2000.

Díaz, I. y Fariñas, O. Validación del método analítico para la determinación de 3 vitaminas hidrosolubles en un suplemento vitamínico. *Rev. Cubana Farm.* **34** (2): 93 - 9 (2000).

Doke, S.; Inagaki, N.; Hayakawa, T. and Tsuge, H. Effect of vitamin B₆ deficiency on an antibody production in mice. *Biosci. Biotech. Biochem.* **61** (8): 1331 - 6 (1997) según KAGAKU SHOHO (596): 12657 (1997).

Fang, L. Quantitative determination of riboflavin using HPLC. *Zhonggon Yaouxue Zazhi* **25** (8): 472 - 3 (1990).

Fasman, G. D. *Practical Handbook of Biochemistry and Molecular Biology*. CRC Press. Boca Raton Ann Arbor Boston, pp 557 - 560 (1990).

Fasquell, R.; Barrier, P. y Dagnet, E. *Elementos de Inmunología General*. Editorial Revolucionaria (1970).

Fieser, L. F. y Fieser, M. *Química Orgánica Superior*. Tomo 1. Ediciones Grijalbo S. A. Barcelona, p. 918 (1966^a).

Fieser, L. F. y Fieser, M. *Química Orgánica Superior*. Tomo 2. Ediciones Grijalbo S. A. Barcelona, pp. 1926 - 34 (1966^b).

Finar, I. L. *Química Orgánica*. Vol. II. Estereoquímica y Química de los Productos Naturales. Editorial Alhambra, S. A. Madrid. España, pp. 670 - 5 (1959).

Fratz, F.; Beyer, M.; Collery, P. et al. Preparation, characterization and *in vivo* efficacy of albumin conjugates of doxorubicin. *Biol. Pharm. Bull.* **21** (1): 56 - 61 (1998) según KAGAKU SHOHO (606): 4237 (1998).

Fujii, Y.; Ikeda, Y.; Fujii, M. and Yamazaki, M. Preparation and antigenic properties of digitoxin - bovine serum albumin conjugates linked at the digitoxose C-3' and C-3" positions. *Biol. Pharm. Bull.* **17** (4): 467 - 71 (1994).

Gerald, A.; Falb, R. D.; Crowley, J. P. et al. Development of antibodies to thiamine tetrahydrofurfuril disulfide in rabbits. *Pharmacol.* **11** (2): 102 - 7 (1974) según Chem. Abstr. **81**: 2191j (1974).

Gershman, H.; Nathanson, N.; Abeles, R. et al. Production and specificity of antibodies to vitamin B₁₂ derivatives. *Arch. Biochem. Biophys.* **153** (1): 407 - 9 (1972).

Glynn, L. G. and Holborow, E. J. The production of complete antigens from polysaccharide haptens by streptococci and other organisms. *J. Path. Bact.* **64**: 775 - 83 (1952) según Chem. Abstr. **47** 2340f (1953).

Gómez, C.; Lauzardo, N. y Martínez, J. *Apuntes de Química y Síntesis de Medicamentos*. Editorial Pueblo y Educación. La Habana, pp. 317 - 8 (1989).

Gómez, R.; Madrazo, J.; González, J. et al. Caracterización estructural y funcional de la proteína recombinante P64k de *Neisseria meningitidis*. *Biotec. Apl.* **16** (2): 83 - 7 (1999).

González, S.; Álvarez, A.; Caballero, E. et al. P64k meningococcal protein as immunological carrier for weak immunogens. *Scand. J. Immunol.* **52**: 113 - 6 (2000).

Guerra, M.; Martínez, C.; Cobas, G. et al. Obtención del conjugado riboflavina - seroalbúmina bovina (GV - BSA) y su evaluación como inmunógeno. *Rev. Cubana Quím.* **XIV** (1) (2002) (Aceptada).

Habbet, A. F. ----- . *Anal. Biochem.* **14**: 328 (1966).

Harrow, B. y Mazur, A. *Textbook of Biochemistry*. Sixth edition, p. 359 (1954).

Hashimoto, Y.; Yamashita, N.; Yamashita, K. et al. Analysis of hapten - bovine serum albumin and enzyme - antibody conjugates by MALDI - TOFMS. *KAGAKU SHOHO* (567): 10120 (1996).

Hattori, M.; Imamura, S.; Nagasawa, K. et al. Functional changes of lysozyme by conjugating with carboxymethyl dextran. *Biosci. Biotech. Biochem.* **58** (1): 174 - 7 (1994).

Hattori, M.; Nagasawa, K.; Ametani, A. et al. Functional changes in β -lactoglobulin by conjugation with carboximethyl dextran. *J. Agric. Food Chem.* **42**: 2120 - 5 (1994).

Herrera, A. y Quintana, M. Manual de Prácticas de Laboratorio de Microbiología Industrial. Ministerio de Educación Superior. "Apuntes para un libro de texto". Departamento de Textos y Materiales Didácticos, p. 83 (1981).

Higashi, T. and Shimada, K. Development of analysis of vitamin D metabolites. *YAKUGAKU ZASSHI* **119** (12): 898 - 920 (1999) según *KAGAKU SHOHO* (651): 2028 (2000).

Hiramatsu, K.; Miura, H.; Sugimoto, K. et al. Preparation of antibodies highly specific to N¹, N⁸ - diacetylspermidine and development of an enzyme - linked immunosorbent assay (ELISA) system for its sensitive and specific detection. *J. Biochem.* **121**: 1134 - 8 (1997) según *KAGAKU SHOHO* (590): 9178 (1997).

Hoffmann, K.; Samarajeewa, P.; Smith, E. R. et al. Radioimmunoassay of steroids. Role of the bridge linking the steroid hapten to the protein carrier. *J. Steroid Biochem.* **6** (2): 91 - 4 (1975) según *Chem. Abstr.* **83**: 6895f (1975).

Hoffman, R. et al. A monoclonal antibody against human Vit. D binding protein for the analysis of genetic variation in the group specific component system. *Hum. Genet.* **84** (2): 137 - 46 (1990).

Horiuchi, J. I. and Hiraga, K. Industrial application of fuzzy control to large - scale recombinant vitamin B₂ production. *J. Biosci. Bioeng.* **87** (3): 365 - 71 (1999) según *KAGAKU SHOHO* (635): 5039 (1999).

Hou, W. and Wang, E. Determination of riboflavin using high performance liquid chromatography. *Anal. Chim. Acta.* ---- : 29 - 33 (1999).

Hu, J; Senkbeil, E. G. and White, H. B. Fluorometric analysis of riboflavin. *J. Chem. Ed.* **67** (9): 803 - 4 (1990).

Hurlbut, J. A. and Schonbeck, R. A. Gel filtration chromatography. *J. Chem. Ed.* **61** (11): 1021 - 2 (1984).

Ichinose, N. and Adachi, K. -----
Analyst **111** (4): 391 - 4 (1986).

Ikegawa, S.; Murai, T.; Yoshimura, T. et al. Conjugated 1 β - hydroxycholic acid in the urine of newborns and pregnant women measured by radioimmunoassay using antisera raised against N - (1 β - hydroxycholy) - 2 - aminopropionic acid - bovine serum albumin conjugate. Chem. Pharm. Bull. **40** (7): 1835 - 1838 (1992) según KAGAKU SHOHU (476): 12983 (1992).

Jaton, J. E. and Ungar - Waron, H. Antibodies to folic acid and methotrexate obtained with conjugates of synthetic polypeptides. Arch. Biochem. Biophys. **122** (1): 157 - 63 (1967) según Chem. Abstr. **67**: 115249b (1967).

Jolley, M. E.; Glandemans, C. P. J.; Rudikoff, S. et al. Structural requirements for the binding of derivatives of D- galactose to two homogeneous murine immunoglobulins. Biochem. **13** (15): 3179 - 84 (1974) según Chem. Abstr. **81**: 167550p (1974).

Karush, F. and Marks, R. The preparation and properties of purified anti - hapten antibody. J. Immunol. **78**: 296 - 303 (1957) según Chem. Abstr. **51**: 13155f (1957).

Kato, A.; Mifuru, N.; Matsudomi, N. et al. Functional casein - polysaccharide conjugates prepared by controlled dry heating. Biosci. Biotech. Biochem. **56** (4): 567 - 71 (1992).

Kim, H. J.; Kim, M. J.; Kim, J. M. et al. Biotin - avidin mediated homogeneous enzyme - linked binding assays for riboflavin and riboflavin binding protein using alkaline phosphatase as the label. Anal. Sci. **12**: 337 - 41 (1996).

Kim, M. J.; Kim, H. J.; Kim, J. M. et al. Homogeneous assays for riboflavin mediated by the interaction between enzyme - biotin and avidin - riboflavin conjugates. Anal. Biochem. **231**: 400 - 6 (1995).

Kobayashi, N.; Imazu, T.; Ebisawa, A. et al. Production and characterization of monoclonal antibodies against a novel 1 α , 25 - dihydroxyvitamin D₃ - bovine serum albumin conjugate linked through the 11 α - position. J. Steroid Biochem. Molec. Biol. **63** (1 - 3): 127 - 37 (1997).

Kobayashi, N.; Kitahori, J.; Mano, H. et al. Production of highly specific antibodies to 1 α , 25 - dihydroxyvitamin D₃ utilizing a novel haptenic derivative having a chemical bridge at 11 α - position. Chem. Pharm. Bull. **41** (7): 1321 - 3 (1993).

Kobayashi, N.; Sato, A.; Takagi, K. et al. Production and characterization of monoclonal antibodies against two haptenic derivatives of $1\alpha, 25$ - dihydroxyvitamin D₃ conjugated with bovine serum albumin through the C - 3 or C - 24 position. *Biol. Pharm. Bull.* **20** (9): 948 - 53 (1997) según *KAGAKU SHOHO* (598): 13435 (1997).

Laemmli, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680 - 5 (1970).

Landsteiner, K. and Levene, P. A. The heterogenetic haptene. *J. Immunol.* **14**: 81 -3 (1927); cf *Chem. Abst.* **19**: 2850 and *Proc. Soc. Exptl. Biol. Mod.* **23**: 343 (1926); **24**: 693 (1927) según *Chem. Abstr.* **21**: 3674⁴ (1927).

Landsteiner, K. Heterogenetic antigen. *Verslay Akad. Wetenschappen Amsterdam* **29**: 1118 - 21 (1921), *Proc. Acad. Sci. Amsterdam* **20**: 1166 - 9 (1921) según *Chem. Abstr.* **16**: 2907⁹ (1922).

Landsteiner, K. The formation of heterogenetic antigen by combination of hapten and protein. *Proc. Acad. Sci. Amsterdam* **24**: 237 - 8 (1922) según *Chem. Abstr.* **16**: 2907^{7,8} (1922).

Lauer, --- and Erlanger, ---. Oxidation of vicinal glycols of haptens with NaIO₄ and conjugation to protein (1971) según *Bartos, E. Practice and Theory of Enzyme Immunoassays. Barcelona, pp. 279 - 96* (1988).

Lehninger, A. L. *Bioquímica. Edición Revolucionaria. Segunda edición, p. 341* (1986).

Lowry, O. H.; Rosebrough, N. J.; Lewis, A. et al. Protein measurement with the Folin Phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**: 265 - 75 (1951).

Mancini, G. et al. Immunochemical quantitation of antigens by simple radial immunodiffusion. *Immunochem.* **2** : 235 (1965).

Maneta - Peyret, L.; Picard, J. P.; Bezian, J. H. et al. Fatty acids rendered immunogenic. *Immunol. Lett.* **31**: 227 - 32 (1992).

Margni, R. *Inmunología e Inmunoquímica. Editorial Científico Técnica.* (1982).

Martin, E. W.; Fullerton, E.; Emerson, E. et al. (directores). *Farmacia Práctica de Remington. 2da edición en español. Edición Revolucionaria. Instituto Cubano del Libro. Habana, pp. 1054 - 7* (1965).

Mc Elvain, S. La Caracterización de Compuestos Orgánicos. Editorial Ciencia y Técnica. Instituto del Libro. La Habana, pp. 124 - 6 (1970).

Medveczky, A. The nomenclature of the haptens and their compounds . Z. Immunitäts. **80**: 416 - 9 (1933) según Chem. Abstr. **28**: 2125⁴ (1934).

Merlín, J. C.; Villaescusa, R.; Guerreiro, A. M. et al. Preparación de un conjugado anti IgG de ratón - peroxidasa en cabra. Rev. Cubana Hematol. Inmunol. Hemoter. **15** (2): 132 - 6 (1999).

Merlín, J. C.; Villaescusa, R.; Guerreiro, A. M. et al. Preparación de un conjugado peroxidasa - anti IgG humana (cadena) en conejo. Rev. Cubana Hematol. Inmunol. Hemoter. **17** (2): 132 - 7 (2001).

Moncado, L. M. y Ruíz, J. Estandarización y validación de un método para la determinación simultánea de vitaminas tiamina B, riboflavina B, niacina B y ácido fólico B utilizando HPLC. Rev. Colombiana Quím. **29** (1): 73 (2000).

Nagasawa, K.; Takahashi, K. and Hattori, M. Improved emulsifying properties of β - lactoglobulin by conjugating with carboxymethyl dextran. Food Hydrocolloids **10** (1): 63 - 7 (1996).

Nishii, S.; Soya, Y.; Matsui, K. et al. Determination of bisphenol A by ELISA using an organic solvent - resistant anti - bisphenol A monoclonal antibody. BUNSEKI KAGAKU **49** (12): 969 - 75 (2000) según KAGAKU SHOHO (677): 2845 (2001).

Nodake, Y. and Yamasaki, N. Some properties of a macromolecular conjugate of lysozyme prepared by modification with monomethoxypolyethyleneglycol derivative. Biosci. Biotechnol. Biochem. **64** (4): 767 - 74 (2000) según KAGAKU SHOHO (661): 7477 (2000).

Nogusa, H.; Yano, T.; Okuno, S. et al. Synthesis of carboxymethylpullulan - peptide - doxorubicin conjugates and their properties. Chem. Pharm. Bull. **43** (11): 1931 - 1936 (1995).

Otles, S. -----
Z. Lebenson Unters Forsch **193** (4): 347 - 50 (1991).

Ouchterlony, O. *In vitro* method for testing the toxin – producing capacity of diphtheria bacteria. 8th Scandinavian Pathological Congress. Acta Path. Microbiol. Scand. **25**: 186 (1948).

Paganelli, G.; Songini, C.; Magnanini, A. et al. Three - step immunoscintigraphy with the avidin - biotin system: state of the art and future perspective. Biotechn. Appl. **12** (2): 78 - 9 (1995).

Park, M and Cho, J. ----- J. Arch. Pharmacol. Res. **11** (1): 45 - 51 (1998).

Pérez, P. L.; Hernández, R. y Amador, A. Valores de referencia para la determinación de riboflavina sérica. Rev. Cubana Med. Milit. **29** (3): 179 - 84 (2000).

Pérez, R. Photokinetic determination of riboflavin and riboflavin 5 - phosphate. Analyst **8** (119): 1825 - 8 (1994).

Piatkin, K. y Krivoshein, Y. S. Microbiología. Editorial Mir, Moscú, pp. 205 - 206 (1986).

Ragupathi, R. Conjugation of Clei - B to bovine serum albumin. J. Chromatography **594** (60): 267 - 71 (1991).

Rander, K. Cromatografía de Capa Fina. Enciclopedia de la Química Industrial. Tomo 8, pp. 192 - 4 (1985).

Sasson, A. Las Biotecnologías: desafíos y promesas. Unesco. Centro de Investigaciones Biológicas. La Habana. Cuba, pp. 177 y 193 (1985).

Sawamoto, H. Anodic and cathodic adsorption stripping analysis of riboflavin. J. Electroanal. Chem. ---: 206 - 11 (1985).

Schechter, B.; Schechter, I. and Sela, M. Antibody combining sites to a series of peptide determinants of increasing size and defined structure. J. Biol. Chem. **245** (6): 1438 - 47 (1970) según Chem. Abstr. **72**: 109109 e (1970).

Schneider, R. S. Normorphine derivatives bonded to proteins. U. S. 3,884,898 (Cl. 260 - 121; C07g, G01n). 20 May 1975, Appl. 281,883, 18 Aug 1972; 9 pp. según Chem. Abstr. **83**: 172838 j (1975).

Shao - jie, S.; Tanaka, H. and Yukihiro, S. Western blotting method for the immunostaining detection of glucuronides of glycyrrhetic acid using anti - glycyrrhizin monoclonal antibody. *Biol. Pharm. Bull.* **22** (2): 221 - 3 (1999) según *KAGAKU SHOHO* (632): 38 - 9 (1999).

Shoyama, Y.; Fukada, T.; Tanaka, T.; et al. Direct determination of opium alkaloid - bovine serum albumin conjugate by matrix - assisted laser desorption/ionization mass spectrometry. *Biol. Pharm. Bull.* **16** (10): 1051 - 1053 (1993).

Sigma Immunochemicals. Catalog 1992.

Simon, T.; Burrows, S. and Little, R. Ligand binding reactions of antibodies specific for folic acid. *Immunochem.* **10** (1): 31 - 6 (1973) según *Chem. Abstr.* **78**: 109200 b (1973).

Snell, E. E. and Strong, F. M. -----
Ind. Eng. Chem. Anal. Ed. **11**: 346 (1939).

Söderhjelm, P. and Lindquist, J. -----
Acta Pharm. Suec. ---: 201 - 2 (1976).

Stanley, N.F. Polysaccharide haptens from *Torula histolytica*. *Australian J. Exptl. Biol. Med. Sci.* **27**: 409 - 15 (1949) según *Chem. Abstr.* **44**: 6918 i (1950).

Stryer, L. *Biochemistry*. 3^{ra} Edición. Editorial W. H. Freeman and Company. New York, pp. 889 - 96 (1988).

Strohecker, R. y Henning, H. *Análisis de Vitaminas. Métodos Comprobados*. Editorial Paz - Montalvo. Madrid, pp. 120 - 50 (1967).

Suárez, M.; Otazo, E. y Pina, M. C. *Introducción a la Química de los Heterociclos*. Universidad de la Habana. Facultad de Química. Ciudad de la Habana, pp. 229, 250 - 1, 277 (1988).

Toma, B. and Tabeckia, J. -----
J. Food Sci. **44** (1): 263 - 5 (1979).

Tsang, V. C. W.; Greene, R. M. and Pilcher, J. B. Optimization of the covalent conjugating procedure (NaIO_4) horseradish peroxidase to antibodies for use in enzyme - linked immunosorbent assay. *J. Immunoassay*. **16** (4): 395 - 418 (1995).

Uda, T.; Hifumi, E.; Ishimaon, M. et al. Analysis of the antigen recognition sites of anti - methamphetamine monoclonal antibodies (I). *J. Ferm. Bioeng.* **83** (4): 330 - 40 (1997) según KAGAKU SHOHO (589): 8551 (1997).

Umetsu, K.; Suzuki, T. and Yuasa, I. Vitamin D - binding protein (GC). *Jpn. J. Electroph.* **39**: 25 - 9 (1995).

Vogel, A. Química Analítica Cualitativa. Vol. I. Volumetría y Gravimetría. Edición Revolucionaria. Instituto Cubano del Libro. Habana, pp. 329, 463 - 6 (1971).

Wainer, B. H.; Fitch, F. W.; Rothberg, R. M. et al. In vitro morphine antagonism by antibodies. *Nature* **241**: 537 - 8 (1973).

Wang, J.; Luo, D. B.; Farias, P. et al. Adsorptive stripping voltammetry of riboflavin and other flavin analogues at the static mercury drop electrode. *Anal. Chem.* **57** (1): 158 - 62 (1985).

Willard, H. H.; Merrit, L.L. y Dean, J.A. Instrumental Methods of Analysis. Tomo II. 2^{da} Edición Cubana. Editorial Pueblo y Educación. (1984).

Yang, J.; Han, R.; Su, B. et al. Simultaneous determination of four components in composite vitamin B tablets using a square - root Kalman filter. *Anal. Sci.* **14**: 965 - 9 (1998) según KAGAKU SHOHO (623): 13681 (1999).

Yang, J. M. and Chang, H. Simultaneous determination of thiamine and riboflavin. *Yaown Fenxi Zazhi* **16** (3): 184 - 6 (1996).

Yoshioka, M.; Aso Ch.; Amano, J. et al. Preparation of monoclonal antibodies to vanilmandelic acid and homovanillic acid. *Biogenic Amines.* **4** (3): 229 - 35 (1987).

Yoshioka, M.; Iwai - Yamasaki, M.; Kurakazu - Wada, K. et al. Radioimmunoassay of L - norepinephrine. *Biogenic Amines.* **4** (3): 211 - 7 (1987).

Yoshioka, M.; Kobayashi - Iwase, Y.; Suga, K. et al. Radioimmunoassay of L - epinephrine. *Biogenic Amines.* **4** (3): 219 - 27 (1987).

Yuasa, I.; Kofler, A.; et al. Characterization of mutants of the vitamin D - binding protein/group - specific component: molecular evolution of GC*1A2 and GC*1A3, common in some Asia populations. *Hum. Genet.* **95**: 507 - 12 (1995).

Parte 8

Anexos

Tabla 2. Resultados de la determinación de las concentraciones de riboflavina en aguas de diálisis por el método fluorométrico.

Tiempo oxidación (min)	Razón molar	Concentración de riboflavina ($\mu\text{g/mL}$)				Masa riboflavina (μg)
		Réplicas				
		R1	R2	R3	R (prom.)	
75	1 : 1	51,76	51,45	52,09	51,76	19927,60
75	1 : 3	39,71	41,08	37,12	39,30	15130,50
75	1 : 6	32,30	27,60	31,70	30,53	11754,05
90	1 : 6	8,80	9,71	9,09	9,20	3542,00
100	1 : 6	7,80	8,45	6,09	7,45	2868,25

Longitud de onda de excitación: 460 nm.

Longitud de onda de fluorescencia: 525 nm.

Tabla 3. Valores de Rf obtenidos de la aplicación de la cromatografía de capa fina a la mezcla de oxidación de la riboflavina para la razón molar 1 : 6.

Tiempo oxidación (min)	Valores de Rf	
	Mancha inferior	Mancha superior
0	0,40	—
30	0,40	0,46
75	0,41	0,47
90	0,40	0,46
100	-	0,46
Patrón de riboflavina 0,39		

Tabla 4. Resultados de las determinaciones de las cantidades de peryodato consumido y de ácido fórmico producido en la oxidación de la riboflavina para la razón molar 1 : 6.

Tiempo oxidación (min)	Cantidad de IO_4^- (mol)	Cantidad de HCOOH (mol)
30	1,09	---
75	2,03	---
100	3,02	2,01

Tabla 5. Asignaciones de las principales bandas en el espectro UV – Visible de la BSA pura, riboflavina pura, riboflavina oxidada y conjugado GV – BSA.

Producto	Absorbancia	$\lambda_{\text{experimental}}$ (nm)	$\lambda_{\text{literatura}}$ (nm)
BSA (pura)	1,640	218	210 - 220
	0,625	280	280
Riboflavina (GV) (pura)	0,106	223	223
	0,098	267	267
	0,034	373	373
	0,039	444	444
Riboflavina oxidada	1,770	225	---
	0,950	269	---
	0,422	380	---
	0,310	445	---
Conjugado GV - BSA	1,440	216	---
	1,093	261	---
	0,724	279	---
	0,319	354	---
	0,270	381	---

Tabla 6: Resultados de los ensayos cualitativos practicados al dializado durante su semipurificación.

Después de la primera diálisis		
Reactivo	Dializado	Agua de diálisis
2,4-dinitrofenilhidracina	Positivo	Positivo
Tollens	Positivo	Positivo
Fehling	Positivo	Positivo
Después de la precipitación por salado y segunda diálisis		
2,4-dinitrofenilhidracina	Negativo	Negativo
Tollens	Negativo	Negativo
Fehling	Negativo	Negativo
Cloruro de bario	Negativo	Positivo

Figura 1. Curva de calibración para la determinación de la concentración de riboflavina por el método fluorométrico.

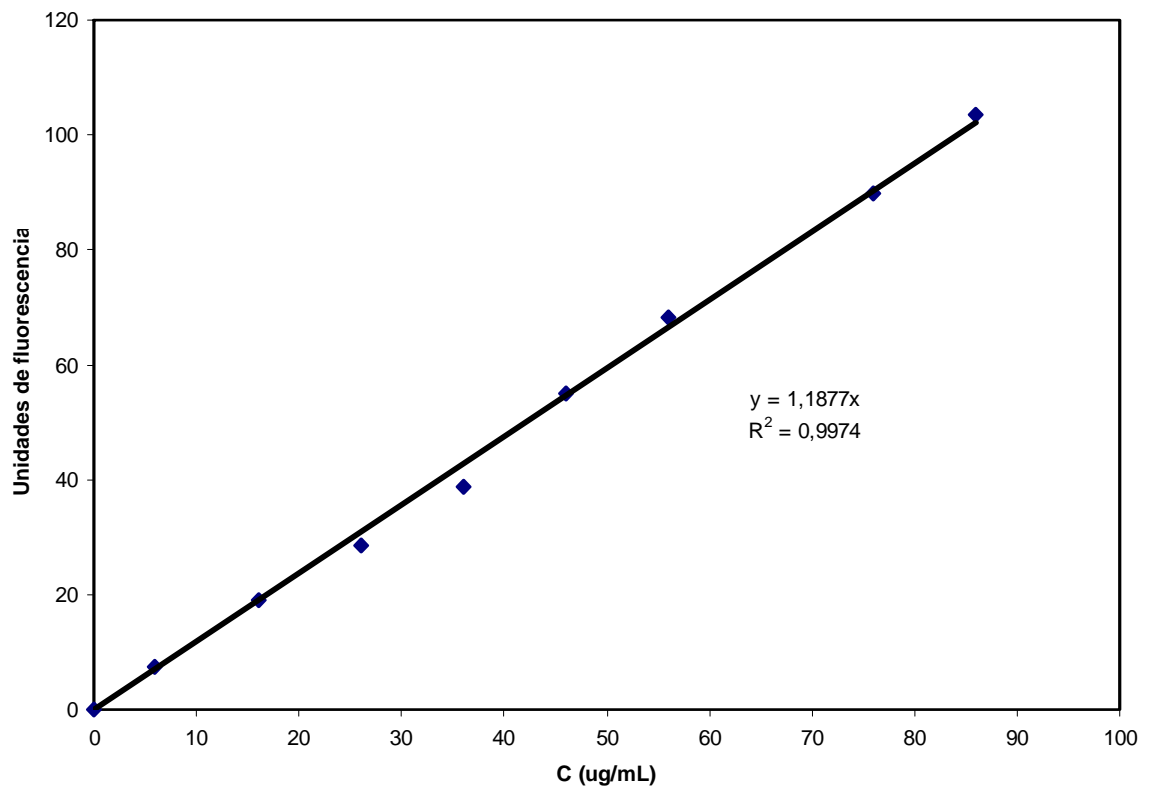
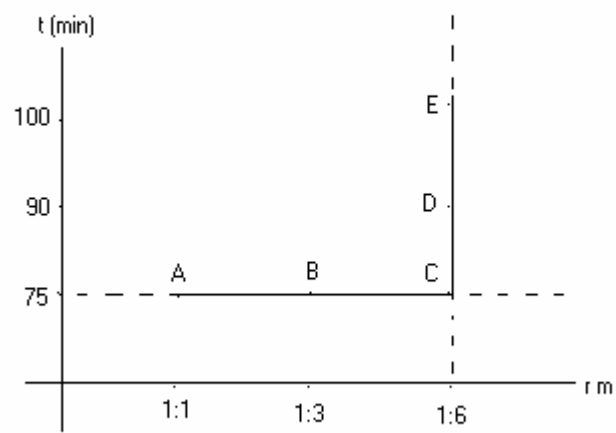
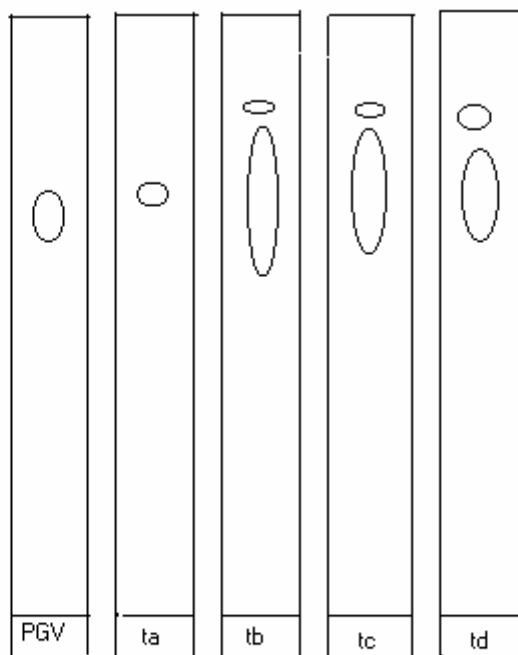


Figura 2. Representación esquemática de la aplicación del método univariado para la optimización de la reacción de oxidación.



Leyenda: t – tiempo de oxidación, r m – razón molar

Figura 3. Resultado de la cromatografía de capa fina al valorar el curso de la reacción de oxidación de la riboflavina con metaperiodato de sodio, según la razón molar 1 : 3.



PGV: Patrón de riboflavina

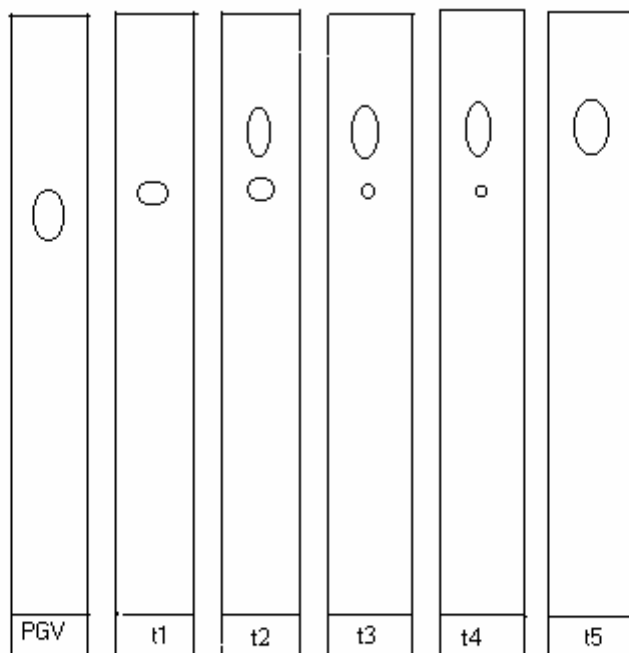
ta: Mezcla de oxidación al tiempo cero

tb: Mezcla de oxidación a los 30 min de reacción

tc: Mezcla de oxidación a los 60 min de reacción

td: Mezcla de oxidación a los 90 min de reacción

Figura 4. Resultado de la cromatografía de capa fina al valorar el curso de la reacción de oxidación de la riboflavina con metaperyodato de sodio, según la razón molar 1 : 6.



PGV: Patrón de riboflavina

t1: Mezcla de oxidación al tiempo cero

t2: Mezcla de oxidación a los 30 min de reacción

t3: Mezcla de oxidación a los 60 min de reacción

t4: Mezcla de oxidación a los 90 min de reacción

t5: Mezcla de oxidación a los 100 min de reacción

Figura 5. Espectro UV - Vis de una muestra patrón de riboflavina.

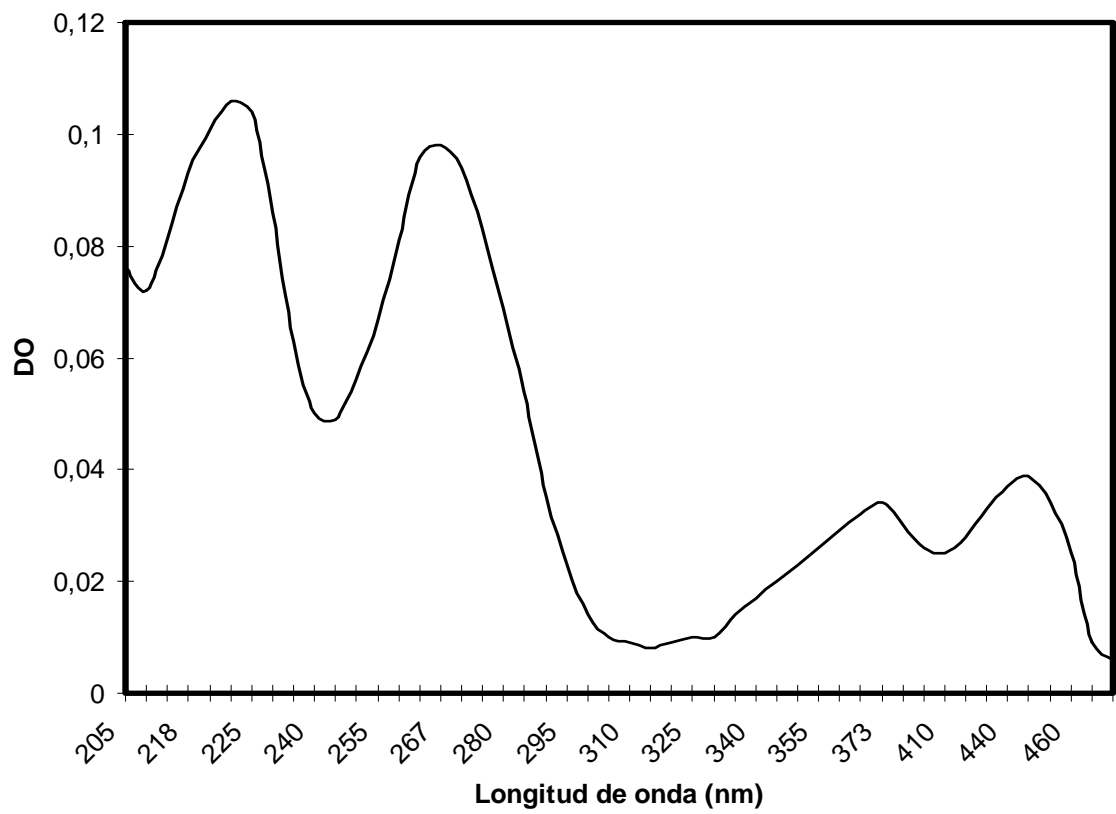


Figura 6. Espectro UV - Vis de la riboflavina oxidada en la mezcla de reacción.

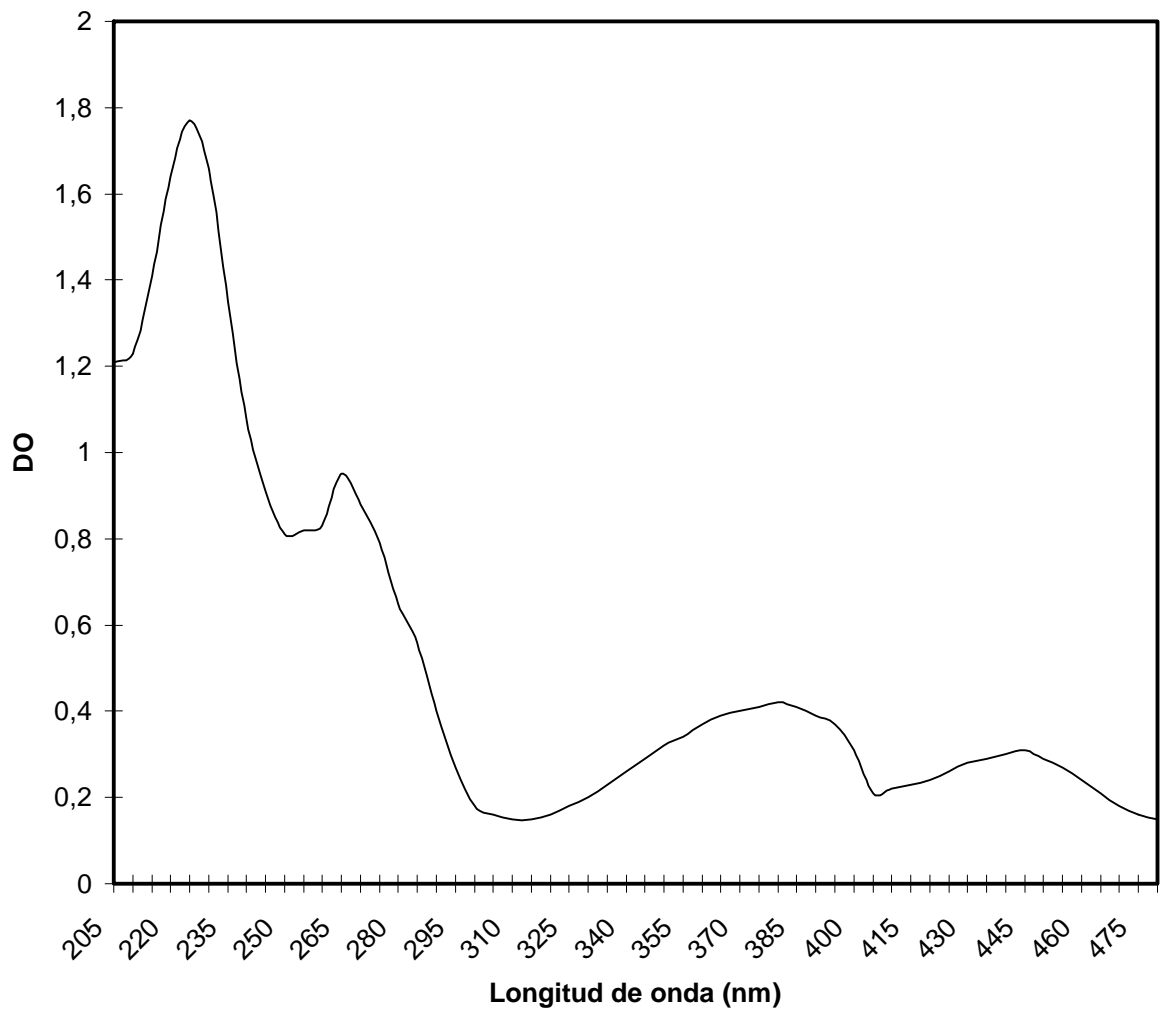


Figura 7. Curva de Calibración para la determinación de proteínas según el método de Lowry.

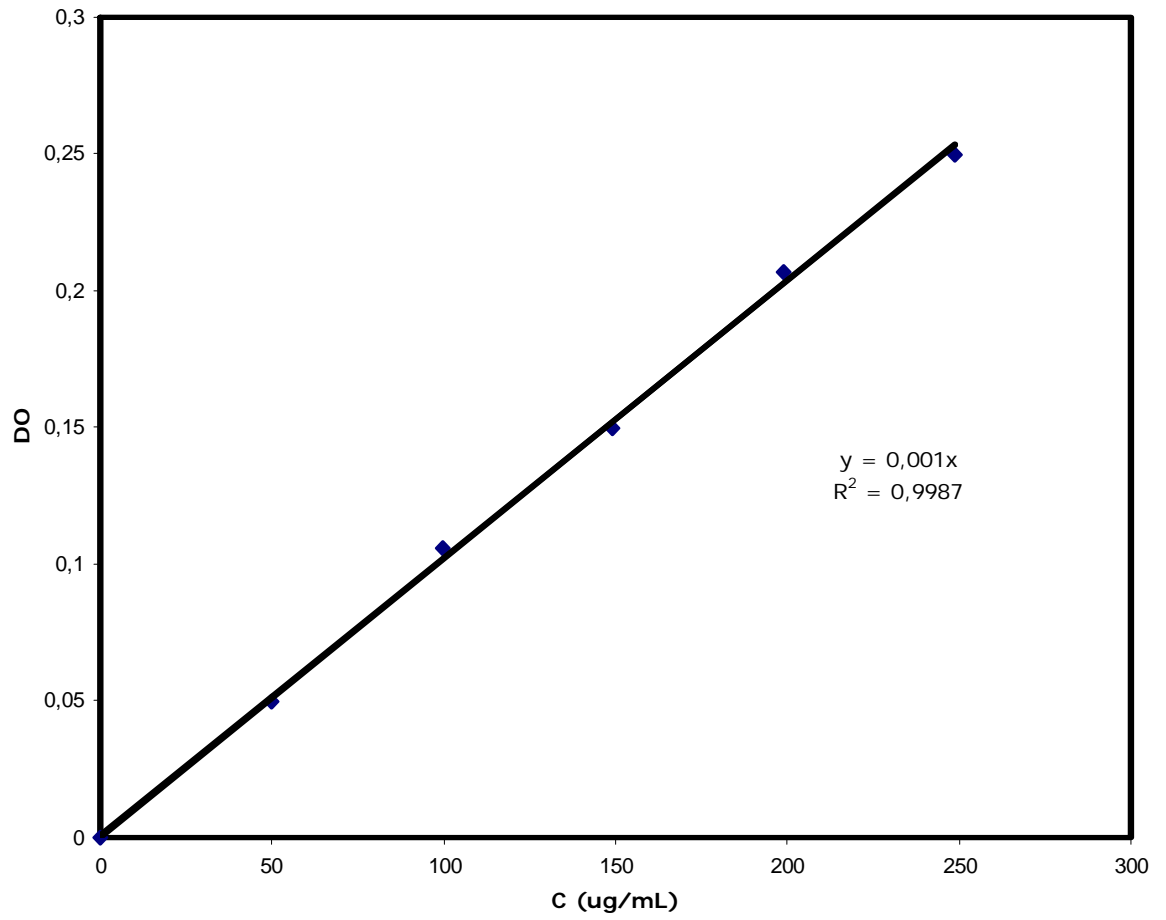


Figura 8. Espectro UV de una muestra patrón de seroalbúmina bovina (BSA).

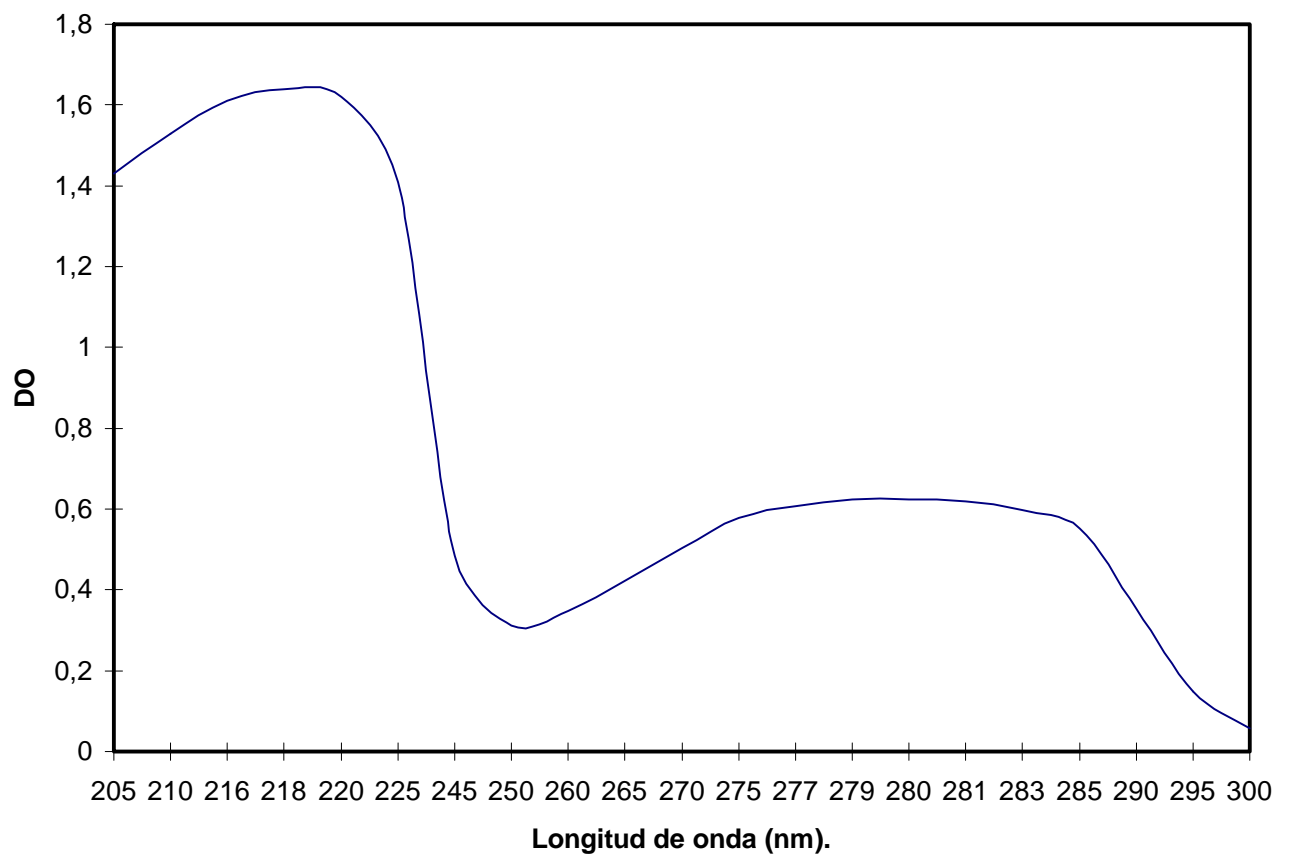
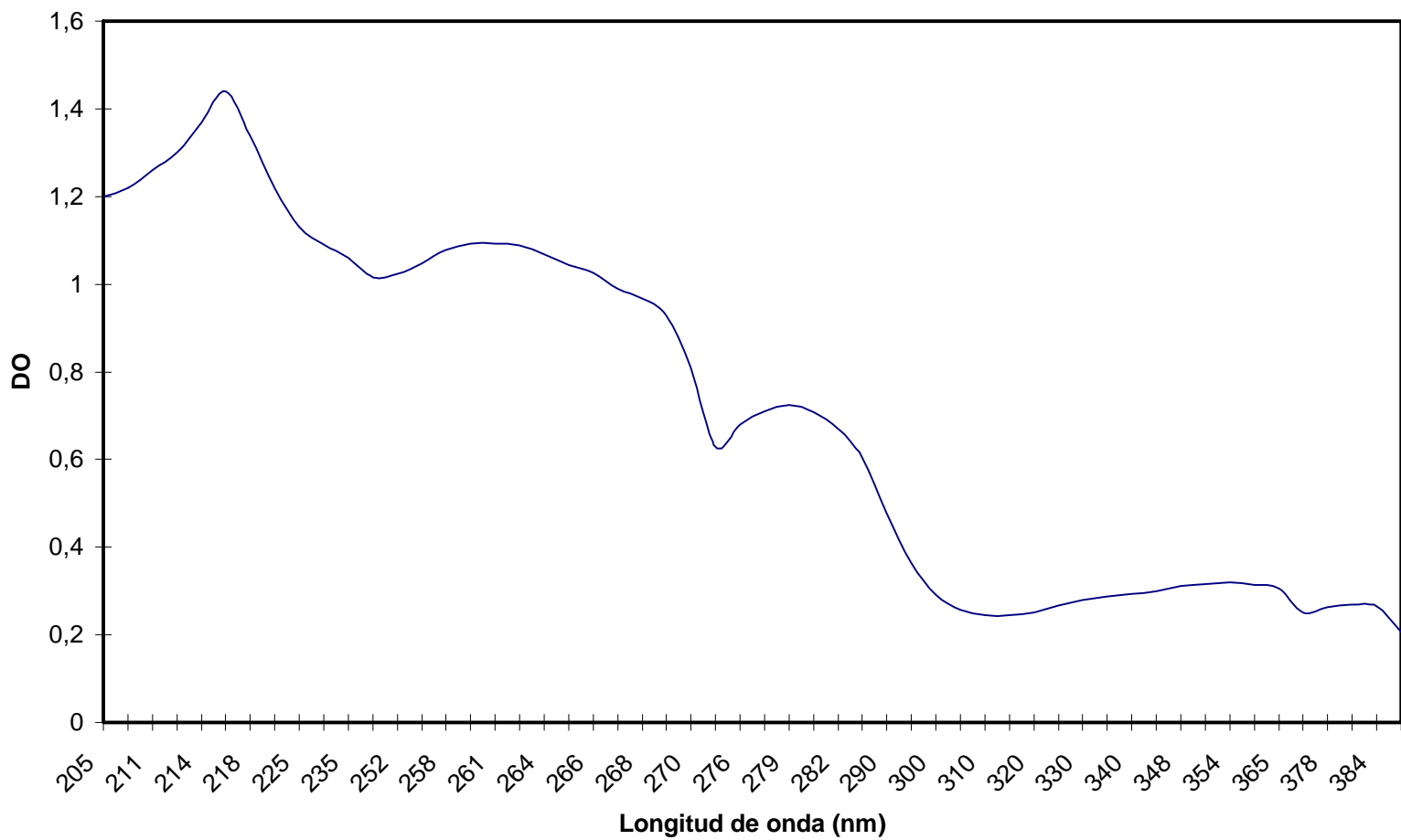


Figura 9. Espectro UV - Visible del conjugado GV - BSA.



Resultados de la electroforesis sobre acetato de celulosa.

Figura 10. Después de la tinción.

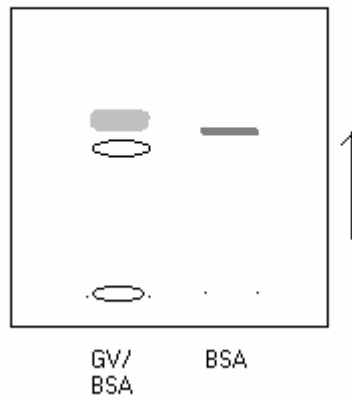


Figura 11. Antes de la tinción.

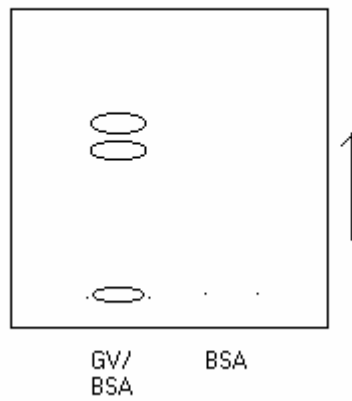
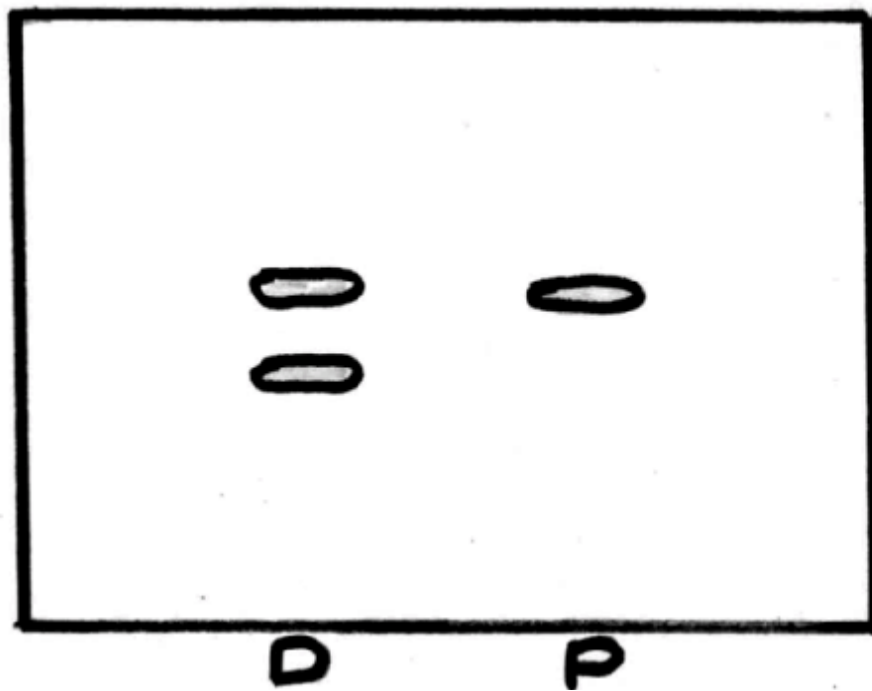


Figura 12. Resultado de la electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS – PAGE).



D: muestra del dializado.
P: patrón de BSA.

Resultados de la detección de los anticuerpos aplicando la técnica de inmunodifusión radial simple de Ouchterlony.

Figura 13.

Antisuero obtenido 7 días después de la 4^{ta} inmunización.

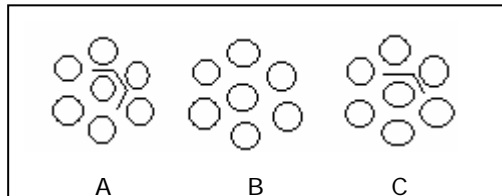


Figura 14.

Antisuero obtenido 7 días después de la 5^{ta} inmunización.

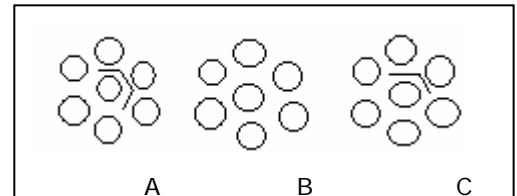
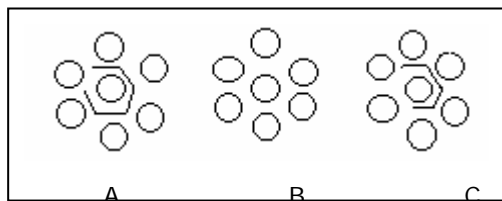


Figura 15.

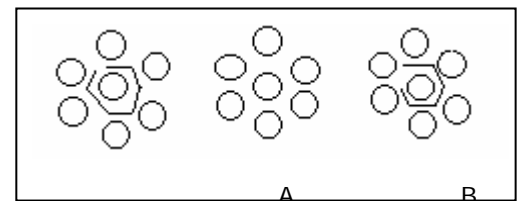
Antisuero obtenido 7 días después de la 6^{ta} inmunización.



C

Figura 16.

Antisuero obtenido al final del esquema de inmunización.



Leyenda:

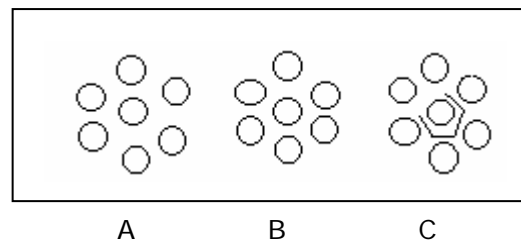
A, B, C rosetas: diluciones dobles sucesivas del antisuero (1, 1/2, 1/4, 1/8, 1/16 y 1/32), según las manecillas del reloj.

A centro: conjugado GV - BSA, $C_{(BSA)} = 1 \text{ mg/mL}$.

B centro: riboflavina, $C = 1 \text{ mg/mL}$.

C centro: BSA, $C = 1 \text{ mg/mL}$.

Figura 17. Resultado del monitoreo de los anticuerpos presentes en el antisuero al término del esquema de inmunización por la técnica de inmunodifusión bidimensional de Ouchterlony.



Leyenda.

A, B, C Centros: Antisuero obtenido al final del esquema de inmunización, en estado puro.

A, B, C Rosetas: Diluciones de riboflavina:

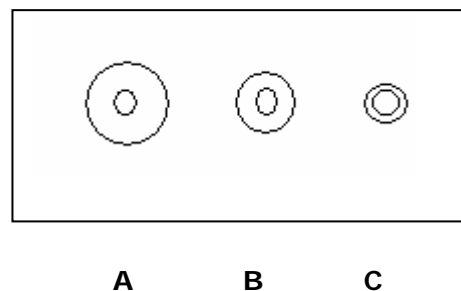
A: concentraciones desde 0,02 hasta 0,07 mg/mL

B: concentraciones desde 0,08 hasta 0,4 mg/mL

C: concentraciones desde 0,5 hasta 1 mg/mL

(según el sentido de las manecillas del reloj).

Figura 18. Evidencias de la reacción riboflavina – anticuerpos específicos al término del esquema de inmunización por la técnica de Mancini.



- **A:** Conjugado GV – BSA, $C_{(BSA)} = 1 \text{ mg/mL}$.
- **B:** BSA, $C = 1 \text{ mg/mL}$.
- **C:** riboflavina, $C = 1 \text{ mg/mL}$.

Anexo A. Representación de las ecuaciones químicas de las reacciones para la obtención del conjugado riboflavina – seroalbúmina bovina (GV – BSA):

