

ANTECEDENTES

Enzimas Proteasas

Las enzimas son polímeros de aminoácidos que dirigen la actividad catalítica en distintos sistemas biológicos, gracias a su capacidad de acelerar reacciones químicas. Durante los últimos años, su utilidad en gran cantidad de industrias ha adquirido gran relevancia; siendo las proteasas el grupo de enzimas de mayor importancia industrial y comercial a escala internacional (Haard y col., 2000, Montes y Magaña, 2002). Casi la mitad de las enzimas industriales son proteasas y se utilizan en los detergentes, en procesos de ablandamiento de pieles, en la manufactura de quesos, industria vinícola y fabricación de sedas; a la vez tienen aplicaciones muy importantes en el área médica como la producción de fármacos anti-inflamatorios, disolución de coágulos sanguíneos, inhibición de la transcripción (como el Zidovudine que actúa como inhibidor de la transcriptasa reversa en el HIV) y activación de hormonas entre otras (Haard y col., 2000, Copeland, 2000, Klomklao y col., 2005, Saeki y col., 2007).

Clasificación de Enzimas Proteasas Digestivas

En 1960, Hartley sugirió que era conveniente dividir a las enzimas proteolíticas o proteasas, con base en su mecanismo de acción, en 4 grupos: a) Serina-proteasas; b) Aspártico-proteasas c) Sulfhidril-proteasas, también llamadas tiol proteasas o cisteína proteasas y d) Metallo-proteasas. Para este estudio nos enfocaremos solamente al grupo de las serina-proteasas al cual pertenece la enzima tripsina (Whitaker, 2000).

Serina-Proteasas

Este grupo de enzimas proteasas se caracteriza por tener un residuo serina muy reactivo en su sitio activo. Todas ellas son endoproteasas y además del residuo serina, también intervienen un residuo histidina y un residuo ácido aspártico en el proceso catalítico, formando la llamada triada catalítica, característica de esta familia de enzimas. Del sistema digestivo de animales marinos se han aislado y caracterizado tres enzimas serina-proteasas: tripsina, quimotripsina y elastasa. Estas enzimas tienen estructuras similares y comparten esencialmente la misma secuencia de aminoácidos alrededor de la triada catalítica formada por histidina 57, serina 195 y aspártico 102. Todas las proteasas pertenecientes a esta subclase tienen en común los primeros 3 dígitos del código asignada por la CE: 3.4.21, e individualmente les corresponden los siguientes códigos: tripsina 3.4.21.4, quimotripsina 3.4.21.1 y elastasa 3.4.21.11 (Whitaker, 2000).

Aunque todas las serina-proteasas presentan el mismo mecanismo de acción catalítico, su especificidad por el sustrato es muy diferente. La quimotripsina tiene especificidad para hidrolizar el enlace peptídico por el lado carboxilo de los aminoácidos aromáticos fenilalanina, tirosina y triptófano. La tripsina muestra su especificidad para romper el enlace peptídico por el lado del grupo carboxilo de los aminoácidos con cadenas laterales voluminosas y con carga positiva, como lisina y arginina. La elastasa rompe específicamente el enlace peptídico por el lado carboxilo de aminoácidos pequeños e hidrofóbicos como alanina y valina (Whitaker, 2000).

La razón de estas diferencias tan marcadas en especificidad radica en las diferencias estructurales en las cavidades donde se aloja el sustrato junto al

sitio activo de la enzima. En la quimotripsina y la tripsina, la cavidad junto al sitio activo es muy abierta debido a que está entre dos residuos de glicina (glicina 216 y 226), de tal forma que se pueden alojar cadenas laterales de aminoácidos grandes. La diferencia entre estas dos enzimas es que en la quimotripsina en el fondo de la cavidad se encuentra el residuo serina 198 mientras que en la tripsina se encuentra el residuo aspártico 189; entonces la cavidad de la quimotripsina no tiene cargas y permite el alojamiento de cadenas laterales de aminoácidos grandes pero sin carga como fenilalanina, tirosina, triptófano y leucina; mientras que en la cavidad de tripsina está la carga negativa del ácido aspártico 189, lo que permite el acoplamiento con cadenas laterales grandes de aminoácidos con carga positiva como lisina y arginina. La cavidad junto al sitio activo de elastasa es muy diferente; en este caso la mayoría del espacio esta ocupado por residuos de aminoácidos con cadenas laterales más voluminosas como valina 216 y treonina 226, de tal manera que solo se pueden acoplar aminoácidos de cadena lateral pequeña y sin carga como alanina y valina (Whitaker, 2000).

El proceso de catálisis inicia cuando la cadena polipeptídica del sustrato se une a la enzima específicamente en el sitio donde se encuentra la triada catalítica; la cadena lateral específica embona en su cavidad lo cual promueve que el residuo aspártico 102 posicione e inmovilice, a través de un puente de hidrógeno, al residuo histidina 57. En la primera fase de reacción, la histidina 57 actúa como una base para retirar un protón de la serina 195, lo cual facilita el ataque nucleofílico de la serina 195 sobre el carbono carbonilo del enlace peptídico a ser hidrolizado. Esto debe ser una fase concertada ya que la transferencia del protón previa al ataque de la serina 195 sobre el carbono acilo podría dejar una carga negativa en el oxígeno de serina que sería relativamente inestable.

En la siguiente etapa, la donación de un protón de la histidina 57 al nitrógeno amida del péptido crea una amina protonada en el intermediario tetraédrico covalente, facilitando el rompimiento subsecuente del enlace y la disociación del producto amina. La carga negativa en el oxígeno peptídico es inestable; el intermediario tetraédrico tiene una vida muy corta y rápidamente se rompe para expulsar el producto amina. Con el sustrato peptídico normal, un ataque nucleofílico subsecuente sobre el carbono carbonilo, por una molécula de agua, genera otro intermediario tetraédrico transiente, donde la histidina 57 actúa como base aceptando un protón de la molécula de agua atacante.

El colapso subsecuente del intermediario tetraédrico es asistido por una donación del protón de la histidina 57 al oxígeno de la serina 195 de una manera concertada; la desprotonación del grupo carboxilo y su partida del sitio activo completan la reacción (Garret y Grisham, 1999, Mathews, 2002, Voet y Voet, 2003).

Proteasas Digestivas en Peces

Las vísceras de los peces son reconocidas como una fuente potencial de distintas enzimas, especialmente proteasas que son producidas por las glándulas digestivas (Klomklao, 2006_a). Estas, generalmente se clasifican de acuerdo a su sensibilidad al pH, como ácidas o alcalinas. Dentro de las proteasas ácidas que han sido aisladas y caracterizadas de las vísceras de animales marinos se encuentran la pepsina, quimosina y gastricina y entre las proteasas alcalinas, se encuentran la tripsina, quimotripsina y elastasa. Estas últimas, en particular la tripsina, es la que más se ha estudiado en muchas especies de mamíferos al igual que en distintas especies de peces de aguas frías y cálidas en todo el mundo (Klomklao, 2007). Los resultados de dichos estudios, muestran que estas enzimas presentan una actividad semejante, aún tratándose de organismos de hábitats muy diferentes.

Las proteasas digestivas de los peces tienen gran potencial para utilizarse en el área médica y pueden ser una excelente alternativa para la industria farmacéutica, vinícola entre otras, por sus cualidades catalíticas, entre las que destacan: baja temperatura óptima de actividad, baja termoestabilidad y alto pH óptimo de actividad, con respecto a enzimas homólogas de mamíferos terrestres (Simpson y col., 2000).

Enzimas a Nivel Industrial

Debido a su origen biológico, las enzimas actúan en medios acuosos, en condiciones suaves de temperatura y pH, por lo que no requieren el uso de disolventes orgánicos potencialmente peligrosos o contaminantes, ni grandes aportes de energía para alcanzar temperaturas elevadas. En algunos casos, la producción de ciertos compuestos por medio de tecnologías enzimáticas puede llegar a minimizar el requerimiento energético hasta un 60% y disminuir el gasto de agua hasta el 80%. Por ejemplo, la fabricación de poliésteres y polímeros acrílicos utilizando procesos biocatalíticos basados en la utilización de lipasas reduce la temperatura de reacción de polimerización de 200 °C a 60 °C y se elimina el uso de disolventes orgánicos. En cuanto a los residuos que se producen, suelen ser en cantidades relativamente pequeñas y además se trata de compuestos biodegradables que pueden ser reciclados o vertidos sin tratamientos excesivos. Las ventas de enzimas industriales en la actualidad alcanzan los 2, 000 millones de dólares americanos anuales, con más de 500 productos para más de 50 aplicaciones principales. Aproximadamente el 75% de estas enzimas son lo que se denominan enzimas técnicas, utilizadas en detergentes, industria textil, del procesado de almidón y en la producción de alimentos y piensos. Se trata principalmente de enzimas hidrolíticas como las proteasas. Existen otras enzimas que constituyen un 10% del mercado cuyo uso se enmarca en el desarrollo de nuevos fármacos, diagnóstico médico y

otros usos analíticos (ej. peroxidases, esterasas, liasas y oxidoreductasas). De todas las enzimas comercializadas, el 60% son productos de la Biotecnología moderna (Ruiz y Vega, 2006).

Otras aplicaciones de las enzimas se encuentran en la producción, degradación y biotransformación de productos químicos entre otros. Sin embargo, a pesar de sus extraordinarias posibilidades sintéticas, las enzimas en muchos casos carecen de ciertas propiedades que resultan imprescindibles para su uso a escala industrial, como son elevada actividad, estabilidad en condiciones de reacción, ausencia de inhibiciones por sustratos o por productos, etc (Ruiz y Vega, 2006).

Aplicaciones Clínicas de la Tripsina

La tripsina posee múltiples aplicaciones clínicas y biotecnológicas, que incluyen la producción de insulina (la insulina producida en bacterias tiene que ser tratada con tripsina para que sea activa), producción de vacunas, tratamiento de cultivos celulares, tratamiento de heridas, tratamiento de inflamación, edema, bronquitis crónica, tuberculosis pulmonar, entre otros procesos patológicos, lo cual ha sido establecido desde 1950. En un estudio sobre pacientes que sufrían de enfermedades respiratorias, se evaluó la tripsina como tratamiento en distintas presentaciones, tales como tripsina en aceite de sésamo, tripsina en tabletas y tripsina acuosa (intramuscular), dando como resultado que la tripsina es bien tolerada por los pacientes y efectiva en las diferentes enfermedades respiratorias. Además, la forma de tripsina en capa entérica fue la más efectiva en enfermedades pulmonares, ya sea sola o en combinación, promoviendo una mejoría clínica mucho más rápida para los enfermos (Shubin y col., 1961).

Por otro lado, la función fisiológica de tripsina (mas allá de los aspectos nutricionales) todavía no se conoce bien, sin embargo durante los últimos años los investigadores se han enfocado en las acciones de tripsina como molécula de señalización, activando los receptores activadores de proteasas o PAR's por sus siglas en inglés (protease-activated receptor). Los PAR's pertenecen al grupo de proteínas G y hasta hoy en día se conocen diferentes PAR's (PAR 1-4). PAR 2 es activado por tripsina y tal vez por otras proteinasas aún no identificadas. Al activar el PAR 2, en células epiteliales de intestino, se muestra que la tripsina modula funciones intestinales tales como el transporte de iones y la contracción-relajación de músculo liso en ratas (Kawabata y col., 2003).

En veterinaria, el caso de insuficiencia pancreática exócrina (EPI, por sus siglas en inglés), que es muy común en caninos obesos con predisposición genética, puede ser diagnosticada utilizando tripsina como marcador de la función exócrina del páncreas. En humanos, para detectar pancreatitis aguda se evalúa la concentración de tripsina en orina (Waritani y col., 2002).

Phlogenzym, es un antiinflamatorio enzimático que contiene, entre otras enzimas, tripsina, y está indicado en gonatrosis, contusiones, esguinces aplicaciones dentales, sinusitis y coadyuvante en la antibioticoterapia. De este medicamento, se absorbe el 28% de tripsina y una vez absorbida, se une a las antiproteasas α -1-antitripsina y α -2-macroglobulina, con lo que se evita que el sistema inmune del paciente reconozca las enzimas como antígenos, sin que esto signifique que se inhiba la actividad enzimática. Para inhibir la reacción inflamatoria excesiva, las enzimas parecen contribuir a la degradación de las proteínas plasmáticas que invaden el espacio intersticial durante el proceso agudo de la inflamación, facilitando su eliminación por el sistema linfático o sanguíneo. Asimismo, las enzimas parecen participar en la eliminación de mediadores de la inflamación, como la bradiquinina, gracias a que la

despolimerizan y eliminan. Por último, parece ser que la enzima ayuda a degradar y eliminar el “manto” de fibrina formado en el sitio de la inflamación.

Con lo anterior, se logra que el edema inflamatorio sea reabsorbido más rápidamente y el edema se reduzca y desaparezca. Con ello, se logra una restitución de la microcirculación, con lo que la eliminación de los productos es más rápida y eficiente, lográndose también una disminución significativa del dolor y la molestia del paciente. Las enzimas absorbidas son eliminadas vía hepática o por el sistema mononuclear fagocítico. En algunos estudios se asume también que las enzimas absorbidas podrían ser eliminadas por el jugo pancreático (PLM-Thomson, 2004). Por último algunos investigadores, están enfocando sus estudios sobre la utilidad de la tripsina como terapia alterna en distintos tipos de cáncer, debido a que se han visto resultados bastante favorables en pacientes que se encuentran en etapas avanzadas, disminuyendo principalmente el dolor y sobre todo eliminando las células malignas, sin embargo este tema se encuentra bajo debate en la comunidad científica ya que se tienen opiniones heterogéneas (Jama, 2006).

Sin embargo, para poder utilizar a la tripsina en sus muy diversas aplicaciones, independientemente de su fuente, es importante contar con un protocolo de purificación de la misma.

Purificación de Proteínas

En general, las proteínas son purificadas por medio de procedimientos que involucran varias etapas de fraccionamiento subsecuente, en las que se aprovechan las propiedades fisicoquímicas de las proteínas de interés. Las características de las proteínas que se utilizan en los distintos procedimientos de separación son: solubilidad, carga iónica, tamaño molecular, propiedades de adsorción y propiedades de uniones específicas con otras macromoléculas

(Voet y Voet, 2003). La mayoría de los protocolos de purificación de enzimas contemplan al menos las siguientes etapas: extracción, técnicas de precipitación de proteínas, métodos cromatográficos de separación, electroforesis y técnicas para la cuantificación de actividad y concentración de proteína, en las diferentes etapas de la purificación, que dan una idea del grado de pureza que se va logrando. Es muy importante en los procesos de purificación de enzimas mantener la temperatura baja (0-4 °C) en todo momento, con el fin de estabilizar a la enzima y conservar al máximo su actividad, además de que también se inhibe el desarrollo microbiano el cual, podría afectarlas (Scopes, 1994; Janson y Rydén, 1999).

La tripsina ha sido aislada y caracterizada a partir de especies de peces tales como el bacalao del Atlántico (*Gadus morhua*), sardina Monterey (*Sardinops sagax caerulea*), salmón (*Salmo salar*), carpa (*Cyprinus carpio*), trucha arcoiris (*Onchoryncus mykiss*), anchoveta (*Engraulis japonica*), entre otras, mediante métodos cromatográficos; entre los más utilizados son la cromatografía de filtración en gel, cromatografía de afinidad y la cromatografía de intercambio iónico. Sin embargo, hoy se utilizan los anticuerpos monoclonales como herramienta alternativa los cuales permiten crear una cromatografía de afinidad biológica para la purificación de distintas sustancias, entre ellas proteínas. La producción de anticuerpos monoclonales y los avances en los métodos de obtención de proteínas han permitido mejorar la identificación, aislamiento y purificación de las mismas ya que se obtienen en mayores cantidades que los métodos ordinarios debido a que poseen una pureza excepcional lo cual les confiere capacidad de reconocer y unirse a un antígeno específico (Abbas, 2004, Alberts, 2004). El procedimiento para producir anticuerpos monoclonales se puede dividir en 5 fases las cuales abarcan:

1. Inmunización.- En este paso se utilizan ratones de una edad aproximada de 6-8 semanas. Se sangra la cola del ratón con el fin de obtener el “suero preinmune”, posteriormente se suministra una inyección con una cantidad determinada de antígeno mezclado con Adyuvante Completo de Freund’s (FCA) y en los retos posteriores el antígeno se mezcla con Adyuvante Incompleto de Freund’s.
2. Fusión.- Se realiza la fusión de células del bazo con células del mieloma utilizando polietilenglicol para formar un hibridoma.
3. Tamizaje y amplificación del hibridoma.- En este paso, las IgG producidas por los hibridomas se prueban con el antígeno deseado. Las colonias positivas se expanden y se prueban de nuevo con el antígeno. Las técnicas que se utilizan para identificar de forma cualitativa a los anticuerpos son técnicas inmunoenzimáticas tales como el ensayo inmunoenzimático ELISA (por su abreviación en inglés Enzyme Linked Immunoabsorbant Assay), Ensayo de Manchas, entre otras.
4. Clonación e isotipado.- Los hibridomas específicos seleccionados se clonan por dilución limitada, con el fin de que en cada posillo sólo quede un clon.
5. Producción del anticuerpo monoclonal.- En esta fase el clon se obtiene en grandes cantidades por un sistema *in vitro* que es el cultivo celular, en donde se cultiva el hibridoma seleccionado con los nutrientes adecuados y de esta forma los hibridomas expresan y liberan el anticuerpo monoclonal al medio de cultivo a partir del cual se colecta y se purifica. (Shankar y col., 2001; Eurogentec, 2006; Cultek, 2006).

Una de las etapas importantes para generar anticuerpos monoclonales es la estandarización de las técnicas inmunoenzimáticas que se utilizan en las etapas de tamizaje y amplificación del hibridoma. La herramienta esencial para

estandarizar los métodos inmunoenzimáticos para la generación de hibridomas es el sistema inmune, el cual puede ser manipulado en distintas especies de animales (pequeñas y medianas), como coballos, hamsters, conejos, entre otros, pero principalmente en modelos murinos.

Sistema Inmune

Desde hace tiempo se sabe que la función fisiológica del sistema inmunitario es la defensa contra microorganismos infecciosos tales como determinadas bacterias, virus y hongos. Sin embargo, las sustancias extrañas no infecciosas también pueden desencadenar respuestas inmunitarias, por lo cual una definición mucho más precisa de la inmunidad es la de una reacción frente a sustancias extrañas, en donde se incluyen microorganismos, moléculas tales como las proteínas y polisacáridos, independientemente de las consecuencias fisiológicas o patológicas de dicha reacción (Janeway, 2003; Roitt, 2003; Abbas, 2004). La inmunidad protectora frente a una sustancia extraña está mediada por las reacciones tempranas de la inmunidad innata y las respuestas tardías de la inmunidad adaptativa.

Inmunidad Innata y Adaptativa

La inmunidad innata comprende los mecanismos de defensa bioquímicos y celulares presentes incluso antes de que se produzca una infección y que están preparados para responder con gran rapidez ante ésta. Estos mecanismos reaccionan sólo frente a microorganismos y no frente a sustancias no infecciosas y responden esencialmente de la misma manera frente a infecciones repetidas. Los principales componentes de la inmunidad innata consisten en: barreras físicas y químicas como los epitelios y las sustancias antimicrobianas sintetizadas en las superficies epiteliales; células fagocíticas (neutrófilos y macrófagos) y linfocitos citolíticos naturales (NK); proteínas de la sangre, que incluyen componentes del sistema del complemento, otros mediadores de la inflamación y proteínas que

reciben el nombre de citocinas, las cuales regulan y coordinan numerosas actividades de las células de la inmunidad innata. Los mecanismos que se generan en este tipo de inmunidad son específicos frente a estructuras que son comunes a grupos de microorganismos relacionados y son incapaces de distinguir diferencias sutiles entre sustancias extrañas. Esta inmunidad constituye la primera línea de defensa frente a los microorganismos (Tabla I).

En contraste con la inmunidad innata, existen otra respuesta inmunitaria que es estimulada por la exposición a agentes infecciosos y que aumenta en magnitud y capacidad de defensa con cada exposición sucesiva a un microorganismo determinado. Esta forma de inmunidad se denomina inmunidad adaptativa ya que se produce como una respuesta a la infección y se adapta a ésta (Tabla I). Las características que definen a este tipo de respuesta son: Especificidad precisa por una molécula y capacidad de “recordar” y responder con más intensidad a la exposición repetida a un mismo microorganismo. Este sistema es capaz de reconocer y reaccionar frente a un gran número de sustancias microbianas y no microbianas, además de tener una extraordinaria capacidad para distinguir entre moléculas y microorganismos diferentes, incluso muy relacionados, y por ésta razón también se denomina inmunidad específica. Existen dos tipos de respuestas inmunitarias adaptativas, la inmunidad humoral y la inmunidad celular, las cuales están mediadas por distintos componentes del sistema inmunitario y cuya función es eliminar distintos tipos de microorganismos (Janeway, 2003; Abbas, 2004).

La inmunidad humoral es el principal mecanismo de defensa contra los microbios extracelulares y sus toxinas, en el cual, los componentes del sistema inmune que atacan a los antígenos no son las células directamente sino los anticuerpos secretados por activación antigénica. Los anticuerpos reconocen los antígenos microbianos, neutralizan la capacidad infecciosa de los microorganismos y los eliminan mediante distintos mecanismos efectores. Los propios anticuerpos están especializados, de modo que los distintos tipos pueden activar distintos

mecanismos efectores; por ejemplo, algunos anticuerpos estimulan la fagocitosis mientras que otros activan la liberación de mediadores de la inflamación por parte de leucocitos, como los mastocitos. La respuesta de tipo humoral se presenta en dos etapas que son la respuesta humoral primaria y la respuesta humoral secundaria, las cuales frente a los antígenos proteicos difieren tanto en cantidad como en calidad (Janeway, 2003; Abbas, 2004).

Tabla I. Características principales de la inmunidad innata y adaptativa.

	Innata	Adaptativa
Características		
Especificidad	Para estructuras compartidas por grupos de microorganismos	Para antígenos de microorganismos y antígenos no microbianos
Diversidad	Limitada, codificada por la línea germinal	Amplia, recombinación somática de segmentos genéticos
Memoria	Ninguno	Sí
No respuesta vs sí mismo	Sí	Sí

Fuente: Roitt, 2003; Abbas, 2004.

Respuesta Humoral Primaria

Es una respuesta inmunitaria adaptativa que se produce tras la primera exposición de un individuo a un antígeno extraño. Esta respuesta se caracteriza por una cinética relativamente lenta y una magnitud pequeña comparada con las siguientes exposiciones. Esta respuesta dura de 5-10 días para instalarse y la respuesta máxima de anticuerpos son del isotipo IgM, por encima de IgG, y estos son inducidos por cualquier inmunógeno (Tabla II). La dosis necesaria para la inmunización generalmente debe ser relativamente alta, óptimamente con la presencia de adyuvantes para los antígenos proteicos (Abbas, 2004).

Respuesta Humoral Secundaria

La respuesta humoral secundaria se desarrolla más rápidamente que la primaria y a la vez se producen cantidades superiores de anticuerpos. El cambio de isotipo de la cadena pesada y la maduración de la afinidad también se incrementan tras las exposiciones repetidas a antígenos proteicos. Por ejemplo, una infección repetida por un mismo antígeno activa los linfocitos de memoria creados como consecuencia de la respuesta humoral primaria; la respuesta entonces, se inicia con mayor rapidez, al cabo de unos 3 días. La respuesta máxima de anticuerpos es mayor, con una intensidad de 100 a 1, 000 veces que la respuesta primaria, y es principalmente del isotipo IgG (en ciertas situaciones de los isotipos IgA e IgE); dura más tiempo, haciendo que su declive sea más lento (Figura 1) y es una respuesta inducida por antígenos proteicos para la que sólo son requeridas bajas dosis de antígenos infectantes, sin necesidad de adyuvantes (Tabla II). De acuerdo a lo anterior, cuando se monta

una respuesta por parte del sistema inmunitario esa respuesta va a estar siempre en relación a la interacción antígeno – anticuerpo (Abbas, 2004, Peña, 2005).

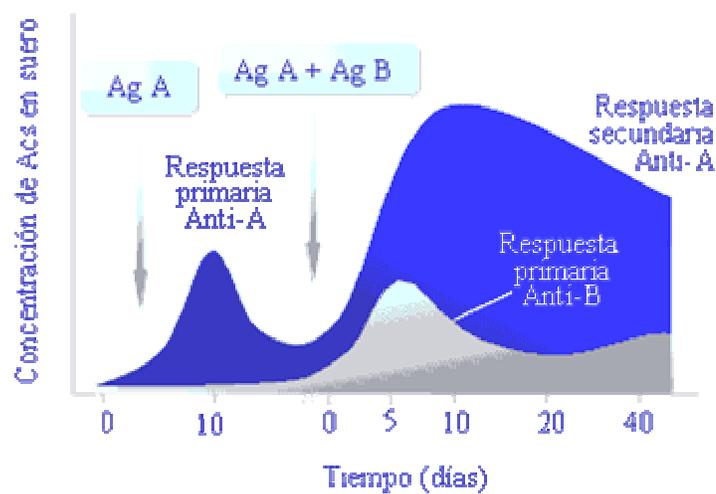


Figura 1. Cinética de la respuesta inmunitaria humoral primaria y secundaria, en donde los linfocitos B vírgenes son estimulados por un antígeno A, provocando la activación y diferenciación de éstos en células secretoras de anticuerpos específicos frente al antígeno A. Algunas de las células plasmáticas secretoras de anticuerpos sobreviven en médula ósea y continúan produciendo anticuerpos durante largos periodos de tiempo, generando linfocitos B de memoria. La respuesta secundaria se desencadena cuando estas células se exponen nuevamente al mismo antígeno, lo que origina una proliferación y diferenciación más rápidas y síntesis de anticuerpos específicos mayores que una respuesta primaria.

Fuente: Peña,2005

Tabla II. Principales características de la respuesta humoral primaria y secundaria.

Respuesta humoral primaria vs secundaria	
Respuesta primaria	Respuesta secundaria
Dura 5-10 días para instalarse	Habitualmente 3 días para instalarse
Respuesta máxima de anticuerpos menor	Respuesta máxima de anticuerpos mayor
Generalmente IgM > IgG	Aumento relativo de IgG y de IgA e IgE en ciertos casos
Menor afinidad mediada por anticuerpos	Afinidad madurada y mayor por anticuerpos
Inducida por cualquier inmunógeno	Inducida sólo por antígenos proteicos
Dosis de inmunización relativamente alta	Inducida por baja dosis de antígenos
Adyuvantes requeridos óptimamente	Adyuvantes no necesarios usualmente

Fuente: Janeway, 2003; Roitt, 2003.

Detección de Anticuerpos

Las linfocitos B contribuyen en la inmunidad adaptativa secretando anticuerpos, y cuando un inmunógeno está presente en un organismo la respuesta de las células B es detectada analizando la especificidad del anticuerpo producido, al generarse una respuesta de tipo humoral. Esto se logra llevando a cabo ensayos con los anticuerpos que se acumulan en la fase fluida de la sangre o en plasma. Las características más importantes de los anticuerpos en una respuesta inmunitaria son su especificidad, cantidad, isotipo o clase y su afinidad. La especificidad determina la habilidad o capacidad que tiene el anticuerpo de distinguir el inmunógeno de otros antígenos. La cantidad del anticuerpo puede ser determinada de distintas maneras ya que está en función del número de células B que responden a un inmunógeno, su velocidad de síntesis y en la persistencia de los mismos después de su producción. La persistencia del anticuerpo en plasma y en el líquido extracelular es determinada principalmente por el isotipo. La composición isotópica de un anticuerpo a su vez determina las funciones biológicas que los mismos pueden llevar a cabo. Finalmente la fuerza de la unión del anticuerpo a su antígeno va a estar determinada por su afinidad y avidéz. Todos estos parámetros corresponden a una interacción antígeno – anticuerpo, cuando se genera una respuesta de tipo humoral y nos permiten determinar la capacidad que posee esta respuesta para proteger al organismo (Janeway, 2003).

Interacciones Antígeno – Anticuerpo

La interacción antígeno-anticuerpo es una relación biomolecular similar a la interacción enzima-sustrato, con una diferencia importante: no conduce a una

alteración química irreversible en el anticuerpo ni en el antígeno. La relación entre un anticuerpo y un antígeno incluye varias interacciones no covalentes entre el determinante antigénico o epítopo del antígeno y el dominio de región variable (V_H/V_L) de la molécula del anticuerpo, en particular las regiones hipervariables o regiones que determinan la complementariedad. La excelente especificidad de las interacciones antígeno-anticuerpo conduce al desarrollo de una diversidad de pruebas inmunológicas que pueden utilizarse para detectar la presencia de antígenos o anticuerpos en una muestra.

Los inmunoensayos desempeñan funciones vitales en el diagnóstico de enfermedades, la identificación de moléculas de interés biológico o médico y sobre todo en la vigilancia del grado de respuesta humoral. Estas valoraciones difieren en su rapidez y sensibilidad; algunas son estrictamente cualitativas y otras cuantitativas. Las interacciones no covalentes que forman la base de la unión antígeno-anticuerpo incluyen enlaces de hidrógeno, enlaces iónicos, interacciones hidrófobas e interacciones de Van der Waals. Puesto que estas interacciones son débiles individualmente (comparadas con un enlace covalente) se necesitan un gran número de ellas para formar una interacción antígeno-anticuerpo potente, más aún, cada una de estas interacciones no covalentes opera a una distancia muy corta, por lo general alrededor de 1×10^{-7} mm (1 angstrom); en consecuencia una interacción antígeno-anticuerpo potente depende de un ajuste muy estrecho entre el antígeno y el anticuerpo. Este ajuste requiere un grado alto de complementariedad entre el antígeno y el anticuerpo, una exigencia que sustenta la especificidad exquisita que caracteriza las interacciones antígeno-anticuerpo (Goldsby, 2004).

Métodos Inmunoenzimáticos

Gran parte de los progresos alcanzados por la biología moderna se deben al perfeccionamiento de los métodos analíticos. La introducción de los

procedimientos basados en las reacciones inmunológicas ha representado un importante avance en el análisis de sustancias de interés de distintos campos, difíciles de medir empleando los métodos bioquímicos habituales. La extraordinaria especificidad de los anticuerpos por sus antígenos correspondientes los convierte en reactivos útiles para lograr detectar, purificar y cuantificar antígenos. El uso de los anticuerpos depende de la capacidad del mismo y de su antígeno específico para formar inmunocomplejos los cuales pueden ser detectados a través de distintas metodologías. Los métodos inmunológicos utilizados para cuantificar la concentración de un antígeno poseen una sensibilidad y una especificidad extraordinarias y se han convertido en técnicas habituales tanto en aplicaciones clínicas como en investigación. La base de todos los métodos inmunoquímicos de cuantificación modernos consiste en la especificidad de la unión antígeno-anticuerpo. La propiedad que tienen las inmunoglobulinas de unirse a un antígeno, la especificidad de esta unión y el hecho de que pueda ser visible por los fenómenos de precipitación, aglutinación y otros mecanismos indirectos (marcaje con fluoresceína, con radioisótopos o con enzimas) hacen que estos métodos se empleen ampliamente en investigación sobre todo para evaluar la respuesta inmune humoral. Para propósitos prácticos se cuenta con metodologías que brindan excelente reproducibilidad, especificidad y sensibilidad; son rápidas además de poco costosas y aunque el principio es idéntico en todas las técnicas (unión antígeno-anticuerpo) hoy en día se emplean diversos métodos, basados cada uno de ellos en un procedimiento distinto para visualizar la unión, tales como la técnica de difusión radial de Ouchterlony, inmunolectroforesis, inmunolectrotransferencia, inmunoanálisis absorbente ligado a enzimas (ELISA) y el ensayo de manchas. En este estudio nos enfocaremos en los últimos dos ensayos ya que ofrecen rapidez, un alto grado de especificidad y sensibilidad y a la vez permiten utilizar, a manera de antígenos, distintas moléculas, como proteínas, péptidos, polisacáridos y enzimas (Rojas, 2001; Janeway, 2003; Abbas, 2004; Goldsby, 2004; Burns, 2005).

Inmunoanálisis Absorbente Ligado a Enzimas (ELISA)

El inmunoanálisis enzimático, mejor conocido como ELISA, por sus siglas en inglés Enzyme Linked Immunoabsorbent Assay, es un método que se utiliza para determinar la unión antígeno-anticuerpo. Se caracteriza por poseer un alto grado de sensibilidad y es fácil de realizar; a su vez permite el análisis de un gran número de muestras y utilizar antígenos puros e impuros. Se pueden analizar antígenos solubles como proteínas, péptidos, polisacáridos y fármacos entre otros, siempre y cuando estén libres de antígenos particulados y de detergentes. De manera general éste método se puede clasificar en ELISA Directo, cuando el anticuerpo primario está conjugado a una enzima y ELISA Indirecto; cuando se necesita un segundo anticuerpo conjugado. Existen diferentes enzimas que pueden ser conjugadas a antígenos o a anticuerpos, en la práctica estas enzimas son seleccionadas en función a su estabilidad, cinética simple y que puedan ser medidas mediante un procedimiento simple como lo son los métodos espectrofotométricos. Las enzimas más comúnmente utilizadas son la fosfatasa alcalina de intestino de ternero y la peroxidasa de rábano (Roitt, 2003, Abbas, 2004, Alberts, 2004). En la Tabla III se presentan distintos sistemas enzimáticos y sus respectivos sustratos cromogénicos y en la Figura 2 se muestran los pasos a seguir de un ELISA.

Tabla III. Marcadores enzimáticos y sustratos cromogénicos comúnmente utilizados en ELISA.

Enzima	Sustrato	Longitud de Onda λ (nm)
HRP (peroxidasa de rábano)	OPD (O-fenilendiamina)	492
	TMB (3,3',5,5'tetrametilbenzidina)	450
	ABTS (ácido 2,2'-azino-6,3 dietilbenstiazolinsulfónico)	405 - 415
Fosfatasa alcalina	pNPP (p-nitrofenilfosfato)	405
B-galactosidasa	CPRG (rojo fenólico-- β -D-galacto piranósido)	574
	ONPG (O-nitrofenil- β -D-galacto piranósido)	420
Ureasa	BCP Púrpura de bromocresol	588
G-6PDH	Glc-6P (Glucosa 6 fosfato)	580
Acetilcolina esterasa	Reactivo de Ellman ácido 5,5'-ditiobis(2-nitrobenzoico)	412

Fuente: www.ub.es/biocel/wbc/tecnicas/elisa.htm.

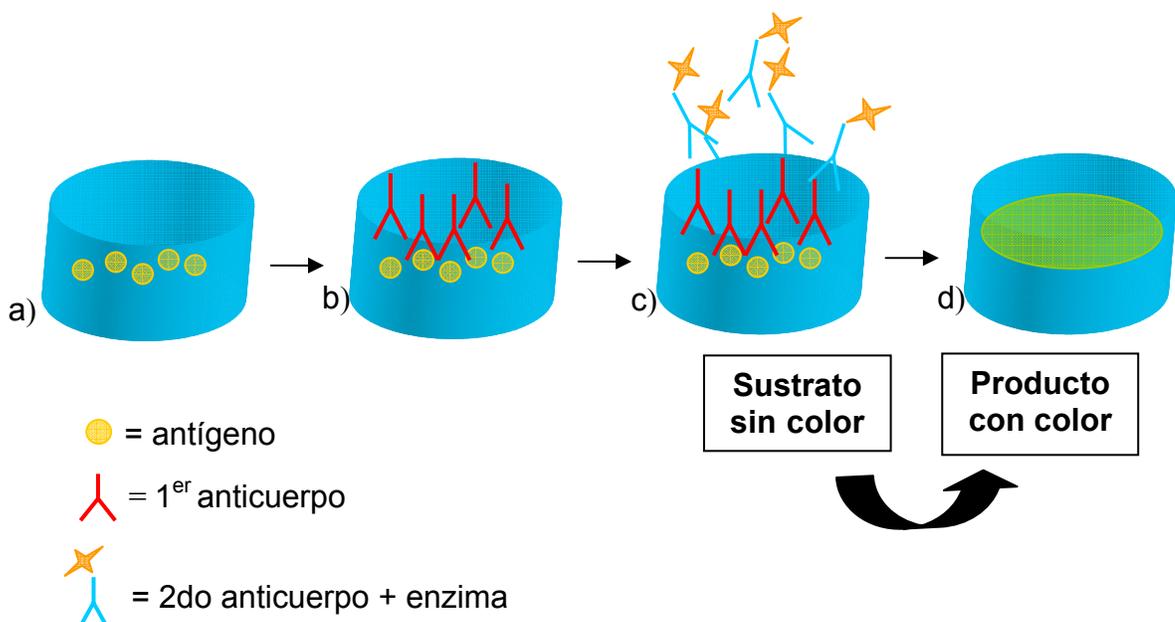


Figura 2. Representación del ensayo de ELISA. En donde como primer paso **(a)** se adhiere el antígeno o anticuerpo de interés a la placa de poliestireno. Posteriormente **(b)** se adiciona el primer anticuerpo (ya sea marcado [directo] o no marcado [indirecto]). Después se elimina el antígeno no unido al primer anticuerpo mediante lavado para continuar **(c)** con la adición de un segundo anticuerpo marcado (el marcador es una enzima, la más utilizada es la peroxidasa de rábano y en ese caso el sustrato peróxido de hidrógeno y como cromógeno ABTS) y una vez que éste reacciona con el sistema, la enzima del anticuerpo marcado hidrolizará a su sustrato, el cual oxida a su

vez a el cromógeno provocando un cambio de color (**d**) el cual se puede medir en un espectofotómetro.

Fuente: Abbas, 2004.

Ensayo de Manchas o Dot-Blot

Es una técnica ampliamente utilizada para identificar y cuantificar una gran variedad de macromoléculas inmovilizadas mediante uniones no covalentes, en una membrana de nylon o nitrocelulosa (Figura 3). Este ensayo consiste en colocar sobre las membranas unas gotas de solución del antígeno; después de evaporar la solución, los sitios de unión que no fijaron el antígeno son bloqueados con una proteína inerte. Posteriormente se realiza sobre las membranas una reacción inmunoenzimática con el anticuerpo a valorar. La reacción del reconocimiento antígeno-anticuerpo es evidenciada mediante la adición de un segundo anticuerpo conjugado a la peroxidasa de rábano (HRP) y sustratos luminiscentes. La positividad de la reacción es determinada a simple vista y la intensidad de la reacción es proporcional a la concentración de antígeno. Sin embargo, hay ocasiones en que ocurren cambios en la intensidad de la reacción que apenas permiten diferenciar los controles o los mismos ocurren donde se supone que no debe ocurrir reacción alguna. Esto es lo que se conoce como fondo, señal inespecífica o “background” (Peña, 2005, Cultek, 2005, Eurogentek, 2006).

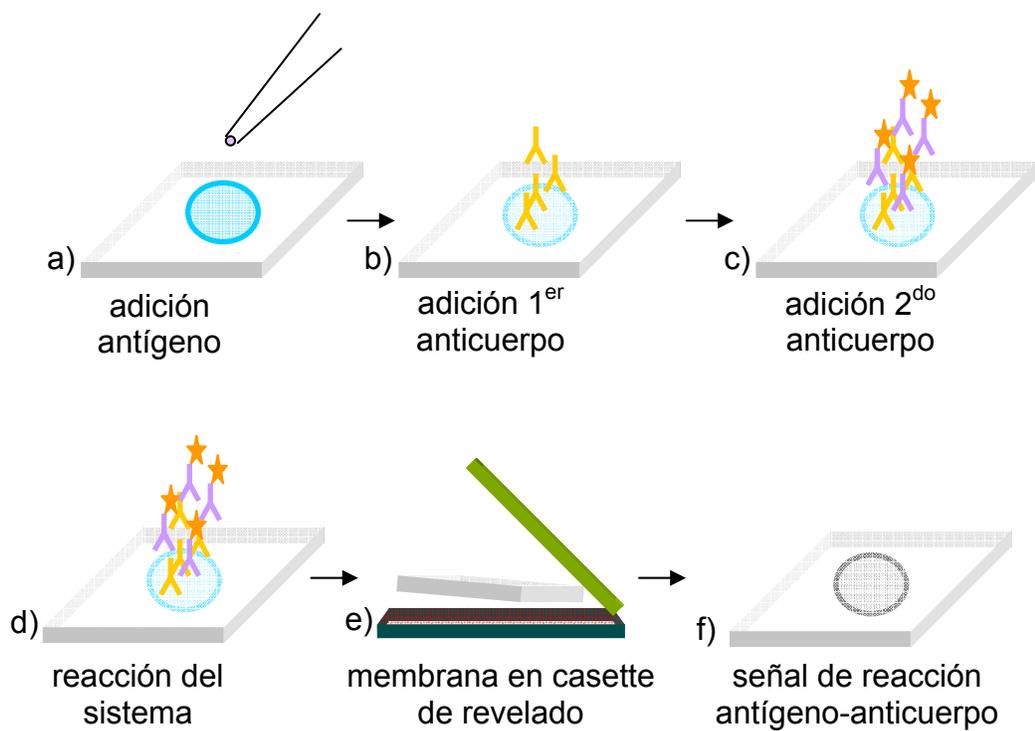


Figura 3. Esquema representativo del ensayo de manchas. Como primer paso **(a)**, se agregan unas gotas del antígeno sobre la membrana, en donde transcurrido un tiempo determinado los sitios que hayan quedado libres de antígeno se bloquean con una proteína inerte para agregar el primer anticuerpo o suero problema **(b)**. Posteriormente **(c)**, se agrega un segundo anticuerpo conjugado con una enzima y sustratos luminiscentes para que reaccione con el sistema **(d)** y después de un tiempo se coloca la membrana dentro de un cassette más un film o película de revelado **(e)**.

Consecutivamente el film es revelado en soluciones especiales para detectar o no, una reacción antígeno-anticuerpo, la cual es evidenciada como un punto negro (**f**).

Fuente: Rojas, 2001

MATERIALES Y MÉTODOS

Obtención de la Muestra

Los ejemplares de sardina Monterey (*Sardinops sagax caerulea*) (50 kg) utilizados en esta investigación, fueron proporcionados por la empresa Productos Pesqueros de Guaymas S.A. La sardina, con aproximadamente 7 horas de haber sido capturada, se colectó directamente de la bodega del barco sardinero, donde se mantuvo a 8 °C desde su captura. La muestra se colocó en abundante hielo y se transportó al Laboratorio de Investigación de la Academia de Tecnología de Alimentos de la Universidad de Sonora. Una vez en el laboratorio, la mitad del lote se evisceró en frío con cuidado de no afectar el tracto digestivo, ni otros órganos para evitar contaminaciones o pérdida de enzimas. Las vísceras obtenidas fueron colocadas en bolsas de polietileno con cierre hermético conteniendo aproximadamente 100 g cada una y se congelaron inmediatamente a -20°C hasta el momento de su utilización.

Extracción y Purificación de Tripsina

Preparación del Extracto Crudo de Ciegos Pilóricos