

Radioinmunoensayo de ferritina plasmática de *Gallus domesticus* L.

J. J. Calvo, M. Martín *, J. R. García * y J. M.* Recio **

Departamento de Fisiología Animal
Facultad de Biología
Universidad de Salamanca
Salamanca (España)

(Recibido el 7 de enero de 1981)

J. J. CALVO, M. MARTIN, J. GARCIA and J. M. RECIO. *Radioimmunoassay of Plasmatic Ferritin in Gallus domesticus* L. Rev. esp. Fisol., 37, 447-454. 1981.

A new experimental procedure for chicken plasma ferritin based on the method of LUXTON *et al.* has been carried out. All biologic reagents used were obtained in our laboratory: Ferritin from chicken liver, antiferritin antiserum from rabbits and anti-rabbit IgG from goat. Chloramine T procedure was applied to label ferritin with ¹²⁵I. The iodinated protein was removed from free iodide by use of three chromatographic columns of Sephadex G-25, Sephadex G-200 and Sepharose 6B. Separation of the first antigen-antibody complex was carried out by the double antibody method. The assay working range covers from 21.8 up to 175 ng/ml. As ferritin concentration is higher in chicken plasma than in human, various plasma dilutions ranging from 1/16 to 1/64 were used.

La ferritina, proteína de alto peso molecular, ha sido descrita en gran cantidad de especies animales desde los moluscos hasta el hombre (5). Los órganos a partir de los cuales se efectúa su aislamiento son, principalmente, el hígado y el bazo (5). Todos los métodos de aislamiento de ferritina aprovechan su estabilidad a altas temperaturas (70-80° C), su precipitación

con SO₄(NH₄)₂ al 50 % de saturación y su sedimentación por ultracentrifugación (3, 12, 15, 17). En el presente trabajo se ha aislado ferritina a partir de hígado de pollo, que fue posteriormente inyectada en conejos para obtener de esta forma anticuerpos antiferritina de pollos.

ADDISON *et al.* (1) fueron los primeros en aplicar un método realmente sensible para la detección de bajos niveles de ferritina en suero humano. Desde entonces se han aplicado con éxito una serie de métodos, basados todos ellos en la reacción antígeno-anticuerpo y el marcaje radiactivo (11, 13, 14). En este trabajo se eligió el método de LUXTON *et al.* (10)

* Departamento de Medicina Nuclear. Servicio de Radiología del profesor Soler Ripoll. Hospital Clínico de Salamanca. Facultad de Medicina. Salamanca.

** Cátedra de Fisiología Animal. Facultad de Ciencias. Valladolid.

como técnica básica, a partir de la cual se introdujeron algunas variaciones. Las técnicas de radioinmunoensayo para la determinación de ferritina en suero sólo han sido aplicadas a la especie humana y a la rata (7, 18). El presente trabajo intenta ampliar el campo de aplicación de estos métodos a *Gallus domesticus* L. con el desarrollo de un método de radioinmunoensayo para la determinación de ferritina en plasma.

Material y métodos

Aislamiento de ferritina. Se emplearon hígados de pollo procedentes de un matadero industrial, mantenidos en hielo durante su transporte al laboratorio, en donde se almacenaron a -30°C hasta su utilización.

El método de aislamiento fue una combinación de los procedimientos de CRICHTON *et al.* (3) y DEPPE *et al.* (4). Hasta la cromatografía en Sephadex G-200 se siguió la técnica de CRICHTON y, posteriormente, se emplearon columnas de Sepharosa 6B siguiendo el método de DEPPE. A continuación se expone un esquema:

Homogeneización del tejido en 2-3 volúmenes de tampón fosfato 0,1 M pH 7,4 y calentamiento del homogenado a $70-80^{\circ}\text{C}$ durante 10 min. Centrifugación a 2.500 g durante 15 min y filtración del sobrenadante. Precipitación del sobrenadante con $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$ al 50 %.

Centrifugación a 2.500 g durante 15 min y disolución del precipitado en solución tampón con posterior diálisis frente al mismo. Centrifugación durante 30 min a 23.000 g.

Ultracentrifugación a 100.000 g durante 2 h y disolución del precipitado en un volumen mínimo de solución tampón.

Cromatografía en Sephadex G-200. Ultracentrifugación a 100.000 g, disolución del precipitado y nueva cromatografía en Sepharosa 6B.

Los tres últimos pasos se repiten hasta obtener ferritina pura.

La polimerización de geles de poliacrilamida se realizó según BLOEMENDAL (2). Preelectroforesis y electroforesis se hicieron a 2 mA/tubo. En la tinción de proteínas se utilizó azul de Commassie y en la de hierro se empleó el reactivo de batofenantrolina (8) o ferrozina (16).

Obtención de anticuerpos antiferritina. Se inmunizaron conejos de raza gigante con seis dosis de antígeno, vía subcutánea, a intervalos de cinco días. Las dos primeras dosis llevaban 0,5 ml de coadyuvante completo de Freund (Calbiochem) y 0,5 ml de solución de ferritina en tampón fosfato (200 $\mu\text{g}/\text{ml}$). Las cuatro dosis restantes se componían de 1 ml de solución antigénica. Una semana después de la última inyección se sangraron los animales y se almacenó el antisuero a -30°C .

Obtención de anticuerpos contra inmunoglobulinas de conejo. Por inmunización de una cabra con una fracción enriquecida en IgG de suero de conejo normal, que se obtuvo precipitándolo tres veces consecutivas con $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$ al 35 % de saturación, se obtuvieron los anticuerpos contra inmunoglobulinas de conejo. Se inyectaron siete dosis de antígeno, vía subcutánea, con un intervalo semanal entre cada inyección. La primera dosis llevaba 1 ml de solución antigénica y 1 ml de coadyuvante de Freund completo, las tres siguientes llevaban 1 ml de solución antigénica y 1 ml de coadyuvante de Freund incompleto (Behring) y las tres últimas se componían de 2 ml de solución antigénica. Una semana después de la última inyección, se sangró al animal y se almacenó el antisuero a -30°C .

Marcaje. Para el marcaje de ferritina se empleó el método de la cloramina T, original de HUNTER y GREENWOOD (7). A 1 mCi de I^{125}Na (Amersham) previamente tamponado con 10 μl de tampón fosfato 0,4 M pH 7,4, se añadían 25 μl de solución antigénica (200 $\mu\text{g}/\text{ml}$) y 10 μl

de solución de cloramina T (2 g/l). Después de 30-45 s, se introducían 20 μ l de metabisulfito sódico (3 g/l) y 10 μ l de solución de IK (166 g/l). Todos los reactivos estaban disueltos en tampón fosfato 0,1 M pH 7,4. Por último, se añadían 100 μ l de dicho tampón, conteniendo 10 g/l de BSA (seroalbúmina bovina).

Purificación del antígeno marcado. Se realizó mediante tres cromatografías sucesivas en columnas de Sephadex G-25, Sephadex G-200 y Sepharosa 6B equilibradas previamente con tampón fosfato 0,1 M, pH 7,4, que contenía BSA (10 g/l). Las columnas se eluyeron con la solución tampón que contenía BSA 2 g/l. El pico de radiactividad, eluido inmediatamente después del volumen muerto en la columna de Sepharosa 6B, se diluyó con este último tampón, de manera que 100 μ l proporcionaban aproximadamente unas 20.000 cpm.

Titulación de los antisueros. Se realizó incubando una cantidad constante de antígeno marcado con diluciones crecientes de anticuerpo. Previamente, se aisló la fracción de inmunoglobulinas G de los antisueros precipitando con $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$ al 35 % de saturación tres veces consecutivas e introduciendo el resultado de esta precipitación en una columna de DEAE-celulosa, equilibrada con tampón fosfato 0,1 M pH 6,8. En estas condiciones la inmunoglobulina G no se fija a la DEAE-celulosa y se eluye en el volumen muerto. Una vez aislados los anticuerpos, se incubaron 100 μ l de solución de antígeno marcado con 100 μ l de solución de anticuerpos (en una serie de diluciones progresivamente crecientes en tampón fosfato 0,1 M, pH 7,4, con EDTA 20 g/l y suero

de conejo normal 20 ml/l), durante 48 horas a 4° C. A continuación se añadían 100 μ l de antisero de cabra contra inmunoglobulina G de conejo (diluido 1/10 en tampón fosfato 0,1 M pH 7,4) y 100 μ l de polietilenglicol (100 g/l diluido en la solución tampón). Después de 10 min, se centrifugaron los tubos y se midió la radiactividad en el precipitado.

Técnica del radioinmunoensayo. El radioinmunoensayo se realizó según el procedimiento de LUXTON *et al.* (10). Para ello, se incubaron 100 μ l de antígeno marcado y 50 μ l de solución patrón de ferritina (con una concentración conocida de proteína) con 100 μ l de anticuerpo antiferritina (en la dilución adecuada obtenida a partir de la curva de titulación), durante 48 h a 4° C. A continuación se añadían 100 μ l de antisero de cabra (diluido 1/10 en tampón fosfato 0,1 M pH 7,4) y 100 μ l de polietilenglicol (100 g/l en idéntico tampón). Los tubos se centrifugaron durante 20 min a 8.000 rpm y, una vez aspirado el sobrenadante, se midió la radiactividad en el precipitado.

Curva patrón. Se hicieron una serie de patrones de ferritina a partir de una solución madre valorada por la técnica de LOWRY *et al.* (9), cuyas concentraciones eran: 700, 350, 175, 87,5, 43,7, 21,8, 10,7 y 5,4 ng/ml. Además de los tubos patrones, con concentración conocida de ferritina, se introdujeron un par de tubos más por cada curva, denominados tubo B y tubo O, que indicaban respectivamente, la unión inespecífica y la unión máxima.

Se representó en ordenadas el porcentaje del cociente resultado de dividir los siguientes parámetros:

Radiactividad en el tubo patrón — Radiactividad inespecífica

Radiactividad máxima — Radiactividad inespecífica

Radiactividad máxima = Radiactividad en el tubo O

Radiactividad inespecífica = Radiactividad en el tubo B

En abscisas se representó el logaritmo de la concentración de ferritina que contenía cada patrón.

Prueba de las diluciones del plasma. Su objetivo era averiguar la dilución de plasma más conveniente para obtener unos resultados en cpm que encajaran en la zona más lineal de la curva patrón, y, además, probar que al situar al plasma en diluciones sucesivas, los resultados eran idénticos. Para ello, se realizaron una serie de diluciones del plasma en tampón fosfato 0,1 M pH 7,4 con BSA 2 g/l: 1/2, 1/4, 1/8, 1/16, 1/32, 1/64, 1/128 y 1/256. Los tubos problema llevaban muestras de plasma en dichas diluciones, en lugar de solución patrón de ferritina de concentración conocida.

Resultados

Aislamiento de ferritina. Las electroforesis realizadas para comprobar la pureza de la ferritina aislada daban como resultado dos bandas, una más fina y situada más cerca del origen de aplicación de la muestra y otra más gruesa y situada más lejos de dicho origen. Ambas bandas se teñían con colorantes para proteína y para hierro.

Purificación del antígeno marcado. En la gráfica de elución de la cromatografía de los productos de reacción del marcaje en Sephadex G-25 aparecen dos picos de radiactividad, el primero de los cuales corresponde a antígeno marcado y el segundo a yodo radiactivo sobrante (fig. 1 a). En cada tubo se recogieron aproximadamente 250 μ l de muestra. La parte central del primer pico eluido de la columna anterior se cromatografió de nuevo en una columna de Sephadex G-200 y la gráfica de su elución está representada en la figura 1 b. El primer pico eluido, que contiene la mayor parte de la radiactividad, es ferritina marcada. El tamaño de los picos siguientes fue mayor o menor según

los marcajes. El volumen de las fracciones recogidas en cada tubo fue de aproximadamente 1 ml. Por último, se sometió al pico de ferritina a una tercera cromatografía.

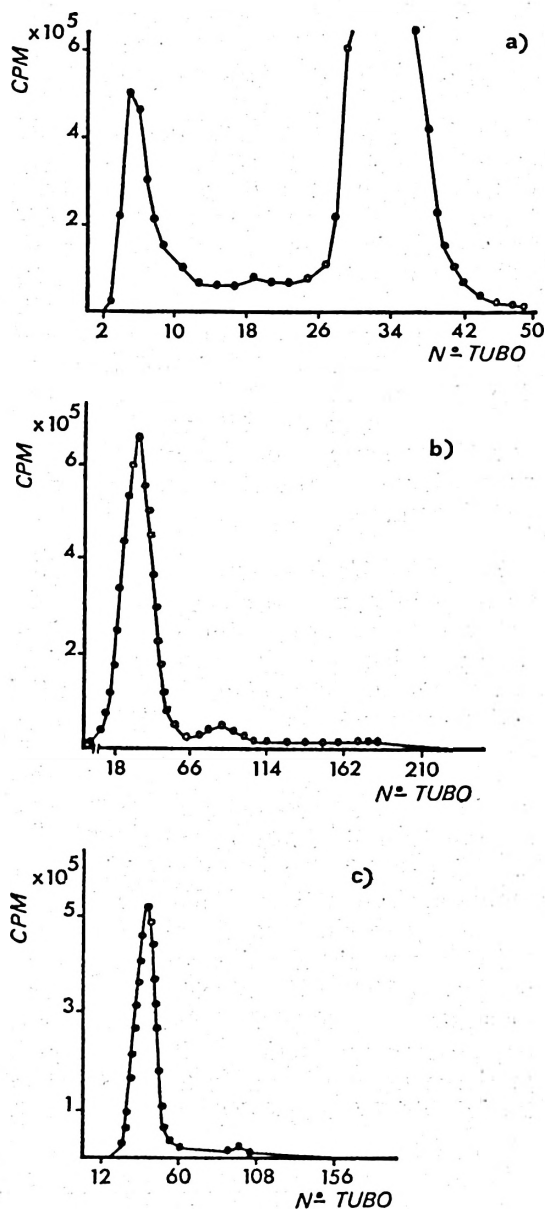


Fig. 1. Purificación del antígeno marcado por Sephadex G-25 (a), Sephadex G-200 (b) y Sepharosa 6B (c).

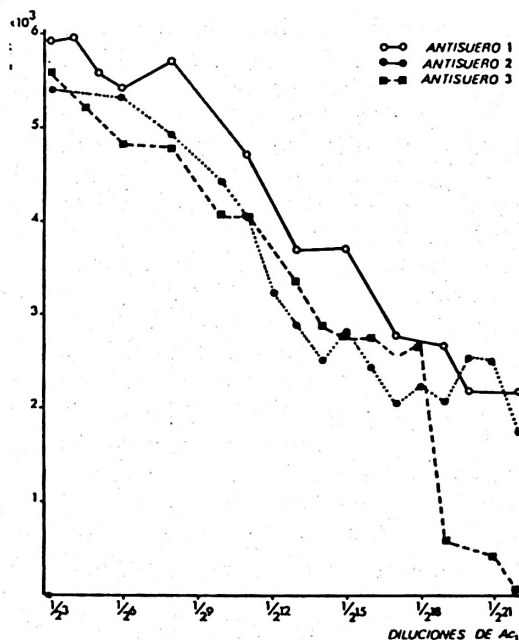


Fig. 2. Curvas de titulación correspondientes a tres antisueros distintos.

tografía, esta vez en Sepharosa 6B, en la que sólo aparece prácticamente un pico, eluido después del volumen muerto (figura 1 c). El volumen de muestra recogido en cada tubo fue de 2 ml.

Titulación de los antisueros. La cromatografía en DEAE-celulosa del triple precipitado con $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$ al 35 % de saturación dio como resultado un pico de proteína cuyo registro electroforético era una sola banda proteica con movilidad de inmunoglobulinas. El porcentaje de unión en la zona de exceso de anticuerpo fue de un 85 % del antígeno marcado. La dilución que unía el 50 % del antígeno marcado era aproximadamente 1/3.000 y estaba situada en la zona de máxima pendiente de la curva.

Tiempo de incubación. El tiempo de incubación del antígeno con el anticuerpo fue de 48 horas. Se realizaron pruebas empleando tiempos de incubación infe-

riores (12, 24 y 36 h) y la cantidad de radioactividad fue siempre inferior a la recogida después de 48 h. Cuando se emplearon tiempos de incubación superiores (60, 72 h) la cantidad de radioactividad recogida en el precipitado era prácticamente igual a la obtenida después de 48 h de incubación.

Separación del complejo antígeno-anticuerpo. Se realizó mediante la adición de un anticuerpo de cabra que precipita el primer complejo antígeno-anticuerpo. LUXTON *et al.* (10) empleaban anticuerpos comerciales; en este radioinmunoensayo se empleó un antisuero fabricado en nuestro laboratorio. Se probaron asimismo una serie de soluciones (1/5, 1/7 y 1/10), obteniendo con todas ellas idénticos resultados, de manera que se eligió 1/10 como la dilución más adecuada, ya que así se ahorra antisuero.

Curva patrón. Una curva patrón típica se puede ver en la figura 3. Después de una serie de pruebas se comprobó que las concentraciones mejor determinadas, que eran las que se localizaban en la zona de máxima linealidad de la curva patrón, se encontraban en el intervalo 21,8-175 ng/ml o, en porcentajes, 75-25 %.

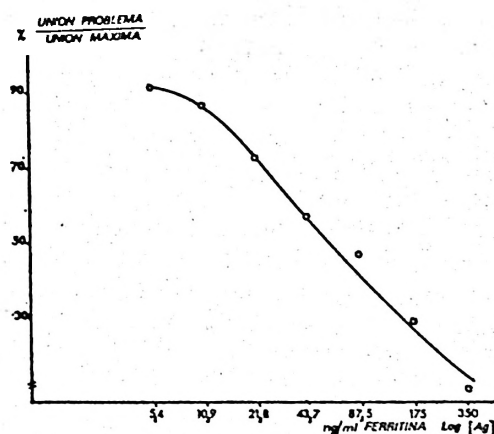


Fig. 3. Gráfica de una curva patrón de ferritina.

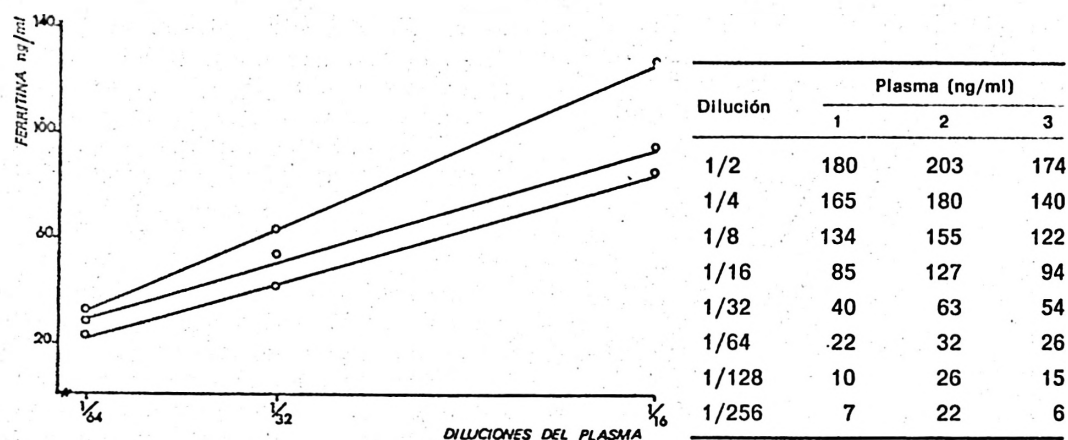


Fig. 4. Concentraciones de ferritina correspondientes a plasmas distintos. Cada recta corresponde a un plasma a diferentes diluciones.

Unión inespecífica. El porcentaje de unión inespecífica fue siempre inferior al 10 %.

Precisión inter e intraensayo. Las variaciones entre los valores correspondientes a la curva patrón, tanto dentro de un mismo ensayo, como entre dos ensayos distintos, eran inferiores al 10 %. Por otro lado, las variaciones de un mismo plasma dentro de un ensayo eran también inferiores al 10 %.

Prueba de las diluciones. En los resultados, empleando tres plasmas distintos a las diluciones antes indicadas, se puede observar que tanto los valores correspondientes a las diluciones bajas (1/2, 1/4 y 1/8) como los valores correspondientes a las diluciones altas (1/128 y 1/256) no guardan relación lineal. Dicha proporcionalidad se mantiene en los valores correspondientes a las diluciones centrales (1/16, 1/32 y 1/64). En este último caso, si se representan gráficamente concentraciones frente a diluciones, el resultado es una recta para cada plasma (figura 5).

Discusión

Los primeros pasos empleados en el aislamiento de la molécula de ferritina de

diversas especies son comunes en muchas de las técnicas de purificación (3, 12, 17), sin embargo, es en los últimos pasos donde difieren los diversos métodos. Concretamente el empleo de columnas de Sepharosa 6B, original de DEPPE *et al.* (4), es fundamental para separar una fracción de alto peso molecular que se eluye junto a ferritina en Sephadex G-200 y que precipita por ultracentrifugación. Las electroforesis realizadas con esta fracción resultaban en una banda que se teñía con colorantes de proteína y de hierro y que apenas penetraba en el gel, lo que hace pensar que dicha fracción esté constituida por oligómeros (de cuatro o más moléculas) de ferritina. Se conocía la existencia de un método de aislamiento de ferritina de bazo de pollo, original de SHINJO (17), que empleaba una doble precipitación con $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$ al 50 %; este método retrasa 24 horas el proceso de aislamiento y no evita ninguno de los pasos posteriores imprescindibles para la obtención de ferritina pura. Los resultados de la electroforesis de ferritina de hígado de pollo ponen de manifiesto la presencia de monómero (banda gruesa) y dímero (banda fina) de la molécula, descrito para ferritina de bazo de pollo (17) y para ferritina de diversas especies (3, 15).

LUXTON *et al.* (10) separaban los productos del marcaje de ferritina empleando columna de Sephadex G-25 y DEPPE *et al.* (4) lo habían mediante Sepharosa 6B. En el presente trabajo se probaron ambos tipos de gel, por separado. El pico de ferritina que se eluía en el volumen muerto de la columna de G-25 tenía una baja inmunorreactividad y, por otro lado, la Sepharosa 6B no separaba adecuadamente los picos de radiactividad resultantes del marcaje; las gráficas de elución en este caso consistían en picos poco claros con lenta subida de la radiactividad y largas colas. Por ello se pensó en emplear tres tipos de columna cromatográficas para la separación de los productos del marcaje: Sephadex G-25, Sephadex G-200 y Sepharosa 6B. El resultado fue la separación escalonada de los diversos productos radiactivos derivados del marcaje y una cierta seguridad de que la ferritina marcada estaba realmente purificada.

Los daños que sobre la molécula de ferritina efectúa el marcaje son de naturaleza desconocida (4). En el presente trabajo se pudo comprobar que los efectos «dañinos» variaban de unos marcajes a otros; esto se refleja en la gráfica de los picos de elución que seguían al primero y mayoritario de las cromatografías en Sephadex G-200 y Sepharosa 6B. Dichos picos alcanzaron en ocasiones proporciones considerables. Por otro lado, se observó pérdida de sensibilidad con desplazamiento de las curvas patrón hacia la derecha a medida que transcurría el tiempo después del marcaje. Los resultados son buenos, con seguridad, hasta una semana después de efectuado el marcaje; cuando se observaban pérdidas de sensibilidad se efectuaba una nueva cromatografía en Sepharosa 6B de la ferritina marcada, obteniéndose de nuevo ferritina marcada purificada. Parece probable que el daño producido por la radiactividad se traduzca en la formación de agregados de ferritina o bien en su rotura en fragmentos, favorecido esto último, quizá, por el

gran tamaño molecular de la proteína.

La dilución del anticuerpo empleada en la curva patrón (aproximadamente 1/3.000) es un poco baja en relación con la utilizada por otros autores (4, 10), pero debe tenerse en cuenta que en este caso se trabajó con inmunoglobulinas G, en el transcurso de cuya purificación, probablemente, se perdieron parte de las que primitivamente existían en el antisuero. El anticuerpo de cabra resultó adecuado para la separación del complejo antígeno-anticuerpo como se puso de manifiesto al compararlo con antisuero comercial de la casa Behring.

Por último, se confirmó la presencia de altas concentraciones de ferritina en plasma de pollos en comparación con las concentraciones de ferritina sérica humana.

Resumen

Se desarrolla un nuevo procedimiento experimental para determinar ferritina plasmática de pollos, basado en el propuesto por LUXTON *et al.* Todos los reactivos biológicos necesarios se obtuvieron en nuestro laboratorio. Se utiliza el método de la cloramina T para marcar ferritina con I^{125} . La proteína marcada se separa del yodo libre mediante el empleo de tres columnas sucesivas de Sephadex G-25, Sephadex G-200 y Sepharosa 6B. La separación del primer complejo antígeno-anticuerpo se realiza por el método del doble anticuerpo. Las concentraciones de ferritina mejor determinadas se localizan en el intervalo 21,8-175 ng/ml. Como las concentraciones de ferritina plasmática de pollo son mayores que las humanas, se realizan una serie de diluciones plasmáticas localizadas en el intervalo 1/16-1/64.

Bibliografía

1. ADDISON, G. M., BEAMISH, M. R., HALES, C. N., HODGKINS, M., JACOBS, A. y LLEWELLIN, P.: *J. Clin. Path.*, 25, 326-329, 1972.
2. BLOEMENDAL, H.: En «Zone electrophoresis in blocks and columns. A monograph». Elsevier. Amsterdam, 1963.

3. CRICHTON, P. R., MILLAR, J. A., CUMMING, R. L. C. y BRYCE, C. F. A.: *Biochem. J.*, **131**, 51-59, 1973.
4. DEPPE, W. M., JOUBERT, S. M. y NAIDOO, P.: *J. Clin. Path.*, **31**, 872-877, 1978.
5. HARRISON, P. M., HOARE, R. J., HOY, T. G. y MACARA, I. G.: En «Iron in Biochemistry and Medicine» (Jacobs, A. y Worwood, M., eds.). Academic Press, Londres, 1974, págs. 73-114.
6. HUNTER, J. E.: *J. Nutr.*, **108**, 497-505, 1978.
7. HUNTER, W. M. y GREENWOOD, F. C.: *Nature*, **194**, 495-496, 1962.
8. INTERNATIONAL COMMITTEE FOR STANDARDIZATION IN HAEMATOLOGY: *Br. J. Haematol.*, **38**, 291-294, 1978.
9. LOWRY, O. H., ROSEBROUGH, N. J., FARR, A. L. y RANDALL, R. J.: *J. Biol. Chem.*, **193**, 265-275, 1971.
10. LUXTON, A. W., WALKER, W. H. C., GAULDIE, J., ALI, M. A. M. y PELLETIER, C.: *Clin. Chem.*, **23**, 683-689, 1977.
11. MARCUS, D. M. y ZINBERG, N.: *J. Nat. Cancer. Inst.*, **55**, 791-797, 1975.
12. MAY, M. E. y FISH, W. W.: *Arch. Biochem. Biophys.*, **182**, 396-403, 1977.
13. MILES, L. E. M., LIPSCHITZ, D. A., BIBBER, C. P. y COOK, J. D.: *Anal. Biochem.*, **61**, 209-224, 1974.
14. NIITSU, Y., KOHGO, Y., YOKOTA, M. y LIRUSHIZAKI, Z.: *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **259**, 450, 1974.
15. PENDERS, T. J., DE ROOIJ-DIJK, H. H. y LEIJNSE, B.: *Biochim. Biophys. Acta*, **108**, 588-590, 1968.
16. RICE, E. W. y FENNER, H. E.: *Clin. Chim. Acta*, **53**, 391-393, 1974.
17. SHINJO, S.: *Seikagaku*, **45**, 289-295, 1973.
18. WARD, CH., SALTMAN, P., RIPLEY, L., OSTRUP, R., HEGENDUER, J., HATLEN, L. y CHRISTOFER, J.: *Am. J. Clin. Nutr.*, **30**, 1054-1063, 1977.