



PROYECTO DE CUANTIFICACION DE PROTEINAS ANTIGENICAS DE GUANTES DE LATEX DE CAUCHO NATURAL

Autores: Lepek, Viviana (UNSAM), Potarsky, Karina (CITIC)



INTRODUCCION

La alergia al látex ha sido en los últimos años una nueva entidad clínica con aspectos epidemiológicos que preocupan a la comunidad médica internacional. Sus manifestaciones clínicas varían desde urticaria localizada hasta anafilaxis sistémica mortal. Las personas que presentan anticuerpos IgE son hipersensibles a las proteínas encontradas en el látex natural, que al ser solubles en agua cuando están en contacto con la piel son absorbidas. Las reacciones en las que intervienen estos anticuerpos son responsables de la mayoría de las reacciones alérgicas. El hecho científicamente demostrado, consiste en que los alérgenos que causan las alergias de tipo 1 son proteínas de látex que permanecen después de la fabricación del artículo. Esto ha obligado a la industria a rebajar la concentración de estas proteínas. Aún así, se ha sugerido que un primer paso para minimizar riesgos debería ser el exigir a los fabricantes una etiqueta sobre sus artículos que registren un nivel de proteínas extraíbles por los métodos químicos o inmunológicos establecidos (Lowry, Elisa, etc.). Los consumidores

OBJETIVOS

✓ Cuantificar mediante el método inmunológico ELISA las proteínas solubles de guantes de látex de caucho natural con anticuerpos anti-latex producidos en conejos y cuantificar las proteínas alérgicas con los anticuerpos IgE de pacientes alérgicos y control.



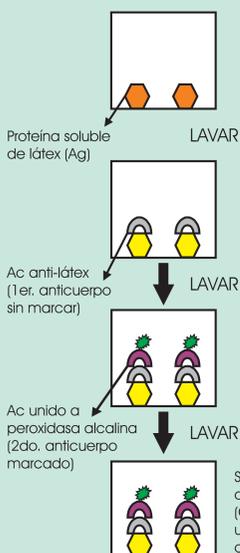
METODO LOWRY

En estos momentos el Centro de Investigación de Tecnología de la Industria del Caucho en conjunto con el Instituto de Biotecnología de la UNSAM contamos con la posibilidad de cuantificar con un método

METODOS INMUNOLOGICOS

Se utilizaron tres conejos, dos para la producción de anticuerpos policlonales anti-latex y uno como control. Se inocularon tres veces con extracto proteico concentrado* y adjuvante (50/50 v/v). *Látex amoniacado se extendió y se dejó secar durante 24 hs, se puso a eluir en PBS pH 7,4 a temperatura ambiente para extraer las proteínas solubles, se liofilizó para concentrarlas y luego de reconstituirlas con agua bidestilada se dializó para separar las proteínas de las moléculas más pequeñas e iones que interfieren en la medición. Luego se extrajo el suero de los conejos y se observó la presencia de anticuerpos por la técnica de DotBlot y se estimó la dilución óptima para utilizar en los métodos ELISA y Western Blot.

METODO ELISA



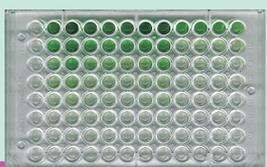
Las concavidades de las placas de poliestireno se sensibilizan por absorción pasiva con proteínas solubles de látex (muestra a ensayar = Antígeno).

El suero con anticuerpos específicos se incuban en las concavidades y las placas se lavan nuevamente; el antígeno presente reacciona con el primer anticuerpo (Ac anti-látex producido en conejo). El exceso de anticuerpo se lava.

Se incuban con el anticuerpo marcado con enzima que reacciona con el primer anticuerpo (Ac anti-látex). El exceso de reactivo se lava.

Se añade el sustrato enzimático y las placas se incuban, la velocidad de degradación se indica por el cambio de color, que es proporcional a la concentración de proteína. Se detiene la reacción y el color se determina por espectrofotometría.

También se cuantificará con este método las proteínas alérgicas con anticuerpos anti-látex (IgE) de suero de pacientes alérgicos.

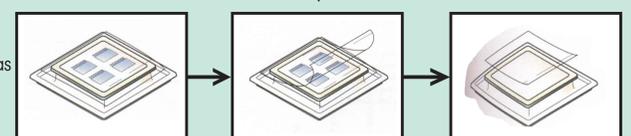


METODO WESTERN-BLOT

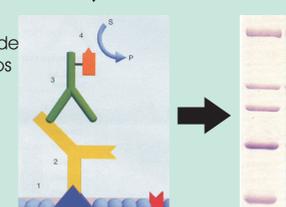
Se separan en un gel de poliacrilamidas (SDS-PAGE) las proteínas solubles de látex de guante de caucho natural por sus pesos moleculares.



Luego se transfieren las proteínas corridas en el gel a una membrana de nitrocelulosa.



Se revelan las bandas con anticuerpos anti-látex producidos en conejo. Así se puede observar las bandas que reaccionan con los anticuerpos y saber de forma aproximada los pesos moleculares de las proteínas solubles en el caso de anticuerpos de anti-látex de conejo.



También se comparará con las bandas que se obtendrán con anticuerpos anti-látex (IgE) de suero de pacientes alérgicos.