



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO  
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES  
CUAUTITLÁN**

**OBTENCIÓN “*IN VITRO*” DE UN HIBRIDOMA PRODUCTOR DE  
ANTICUERPOS MONOCLONALES DE ORIGEN MURINO  
CONTRA LA ESTRUCTURA MOLECULAR DE LA MORFINA,  
COMO HERRAMIENTA BIOTECNOLÓGICA DE APOYO EN EL  
TRATAMIENTO DE LA ADICCIÓN A OPIÁCEOS.**

## **T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:  
QUÍMICO FARMACEÚTICO BIÓLOGO**

**PRESENTA:**

**AGUSTÍN GÓMEZ AGUILAR**

**ASESORES: M en C. ANDREA A. BECERRIL OSNAYA**

**Dr. BENITO ANTÓN PALMA**

**CUAUTITLÁN IZCALLI, EDO. DE MEX.**

**2012**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



**El presente trabajo se realizó en el laboratorio de Diseño, producción y caracterización inmunoquímica experimental de vacunas antiadictivas del Instituto Nacional de Psiquiatría Ramón de la Fuente Muñiz, de la Secretaría de Salud, bajo la dirección del Dr. Benito Antón Palma**

**Revisado en la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán por la M en C. Andrea A. Becerril Osnaya**

## ABREVIATURAS

Ab	Anticuerpo
Ag	Antígeno
APCs	Células presentadoras de antígeno
BCR	Complejo receptor de células B
BALB/c	Bagg albino
BSA	Albúmina Sérica Bovina
BHE	Barrera hematoencefálica
CDR	Región determinante de complementariedad
CO <sub>2</sub>	Dióxido de carbono
CTLs	Linfocitos T citolíticos
DMEM	Medio de Eagle modificado por Dulbecco
DMSO	Dimetilsulfóxido
DPS	DMEM, Penicilina y Estreptomicina
DC	Células dendríticas
ELISA	Ensayo por inmunoadsorción ligado a enzimas (del inglés, Enzyme-Linked ImmunoSorbent Asay)
Fab	Fracción de unión a fragmentos antigénicos
Fc	Fragmento cristalizante
HAT	Hipoxantina, Aminopterina y Timidina
INF- $\gamma$	Interferon gamma
IC <sub>50</sub>	Concentración inhibitoria 50
LB	Linfocito B
LT	Linfocito T
LTh	Linfocito T cooperador
M-3-G	Morfina-3-glucurónido
M-6-G	Morfina-6-glucurónido
M-6-HS	Morfina-6-hemisuccinato
M-6-HS-B	Morfina-6-hemisuccinato con brazo
6-MAM	6-monoacetilmorfina
MAb	Anticuerpo monoclonal
Met	Metadona
MHC-II	Complejo principal de histocompatibilidad clase II
M-TT	Morfina toxoide tetánico
OMS	Organización Mundial de la Salud
ONU	Organización de las Naciones Unidas
OPD	Orto fenilendiamina
PBS	Solución buffer de fosfatos (del inglés, Phosphate Buffered Saline)
PEG	Polietilenglicol
PSN	Penicilina Estreptomicina y Neomicina
SM	Sulfato de morfina
RPMI	Roswell Parck Memorial Institute Medium
SFB	Suero fetal bovino
scFv	Fragmento variable de cadena sencilla
VIH	Virus de inmunodeficiencia humana

## ÍNDICE GENERAL

	PÁGINA
<b>I. RESUMEN</b>	1
<b>II. INTRODUCCIÓN</b>	2
2.1 Adicciones	2
2.2 La morfina	3
2.3 La heroína	3
2.4 Uso terapéutico de los opiáceos	4
2.5 Intoxicación aguda por opiáceos	4
2.6 Tratamiento común	5
2.7 Sistema inmune	6
2.8 Procesamiento y presentación de antígenos	7
2.9 Activación de linfocitos B	7
2.10 Anticuerpos	8
2.11 Relación entre los opiáceos y la inmunidad	8
2.12 Conjugados inmunogénicos antiadictivos	9
2.13 Tecnología de hibridomas	9
Células de mieloma	10
Inmunización	10
Fusión celular	10
Formación de hibridomas	12
Selección de hibridomas	12
Identificación y mantenimiento de hibridomas	13
Método de detección. ELISA por captura de anticuerpo	13
Expansión de hibridomas	14
Conservación de hibridomas	14
2.14 Anticuerpos monoclonales	14
2.15 Inmunofarmacoterapia	

<b>III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN</b>	18
<b>IV. HIPÓTESIS</b>	19
<b>V. OBJETIVOS</b>	20
5.1 Objetivo general	20
5.2 Objetivos específicos	20
<b>VI. DIAGRAMA DE FLUJO</b>	21
<b>VII. MATERIALES Y MÉTODOS</b>	22
7.1 CULTIVO DE MIELOMAS	22
Descongelación	22
Cultivo y expansión de la línea celular Sp2/0	22
Determinación del número y viabilidad de células de mieloma Sp2/0	23
7.2 GENERACIÓN DE HIBRIDOMAS	23
Protocolo de inmunización	23
Síntesis de la vacuna M-TT	23
Preparación de mielomas para la fusión	23
Factor trófico de timo	24
Obtención de los esplenocitos activados del ratón inmunizado con la vacuna M-TT	24
Determinación del número y viabilidad de esplenocitos	25
Fusión celular	25
Selección de hibridomas	26
Detección y Mantenimiento de los primeros hibridomas	26
7.3 IDENTIFICACIÓN DE HIBRIDOMAS	27
Estructura de los antígenos de adsorción: Morfina-6-hemisuccinato BSA con brazo y Morfina-6-hemisuccinato BSA sin brazo	27
ELISA de captura de anticuerpo en fase sólida, utilizando morfina-6-hemisuccinato BSA con brazo, para identificar los hibridomas que potencialmente sintetizan anticuerpos capaces de identificar y unirse a la morfina	28
Expansión y conservación de los hibridomas positivos	

7.4 VALIDACIÓN DE LA AFINIDAD Y ESPECIFICIDAD DEL ANTICUERPO, PARA RECONOCER LA ESTRUCTURA MOLECULAR DE LA MORFINA	29
Validación inicial del MAb anti-morfina	29
Validación de la especificidad del MAb	30
7.5 EVALUACIONES COMPLEMENTARIAS	30
Pruebas de reacción cruzada del MAb hacia sustancias con actividad farmacológica homóloga a la morfina	30
Perfil inmunológico del anticuerpo monoclonal	30
<b>VIII. RESULTADOS</b>	32
Selección del ratón que generó mayor cantidad de anticuerpos anti-morfina	33
Obtención e identificación de hibridomas que potencialmente sintetizan anticuerpos monoclonales contra la estructura molecular de la morfina	33
Validación de afinidad y especificidad de los anticuerpos monoclonales anti-morfina	34
Pruebas de reactividad cruzada del anticuerpo monoclonal hacia sustancias con actividad farmacológica homóloga a la morfina	37
Concentración inhibitoria 50 (IC50) y porcentaje de reactividad cruzada	39
Determinación del perfil inmunológico del anticuerpo monoclonal	41
<b>IX. DISCUSIÓN</b>	43
<b>X. CONCLUSIONES</b>	53
<b>XI. REFERENCIAS</b>	54

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Análogos estructurales de la morfina	4
Figura 2. El esquema resume los pasos seguidos para obtener hibridomas	11
Figura 3. Selección enzimática de hibridomas	12
Figura 4. Representación esquemática de las inmunoglobulinas y sus fragmentos	16
Figura 5. Antígeno de adsorción con brazo espaciador	27
Figura 6. Antígeno de adsorción sin brazo espaciador	27
Figura 7. Títulos séricos de anticuerpos anti-morfina al sexto sangrado	33

Figura 8. ELISA de captura de anticuerpo	34
Figura 9. ELISA competitivo empleando como antígeno de adsorción a la fase sólida morfina-6-hemisuccinato BSA con brazo espaciador	35
Figura 10. ELISA competitivo utilizando como antígeno de adsorción a la fase sólida morfina-6-hemisuccinato BSA sin brazo espaciador	36
Figura 11. Afinidad complementaria. Inmunoensayo de ELISA competitivo utilizando como antígeno de adsorción morfina-6-hemisuccinato BSA sin brazo espaciador	38
Figura 12. Curvas estándar. ELISA competitivo utilizando como antígeno de adsorción morfina-6-hemisuccinato BSA sin brazo espaciador	39
Figura 13. Determinación de la clase y subclase del anticuerpo monoespecífico P5-G9	41
INDICE DE TABLAS	
Tabla No.1. Concentración inhibitoria 50 y porcentaje de reconocimiento cruzado del anticuerpo monoclonal	40

## **1. RESUMEN**

Los derivados del opio u opiáceos son sustancias que poseen diversas propiedades farmacológicas, quizás la más importante sea la analgesia, por esta razón se utilizan en el área clínica principalmente para tratar el dolor agudo que no cede con la administración de otros fármacos analgésicos; sin embargo, el consumo de estas sustancias con fines diferentes a los terapéuticos produce dependencia, conducta que trae consigo una gran problemática para los individuos y las sociedades en todo el mundo. El presente trabajo de tesis experimental, se centró en la obtención de un hibridoma productor de anticuerpos monoclonales específicos contra la estructura molecular de la morfina. Para obtener el hibridoma se recurrió a las técnicas de fusión y cultivo celular. La identificación del hibridoma, las evaluaciones de afinidad y especificidad de los anticuerpos por la morfina y otros opiáceos, así como la determinación del perfil inmunológico, se llevaron a cabo mediante inmunoensayos de ELISA.

La aportación de este trabajo experimental es la generación de un reactivo biotecnológico, que se pueda aplicar en el tratamiento contra las intoxicaciones agudas ocasionadas por el consumo de opiáceos, como inmunización pasiva en individuos sometidos a tratamientos de desadicción, en test inmunológicos antidrogas y en medicina forense.

## II. INTRODUCCIÓN

### 2.1 Adicciones

La sensación de placer que experimentamos cuando llevamos a cabo ciertas actividades como alimentarnos, saciar la sed o tener sexo, resolver un problema o ver cumplido cualquiera de nuestros deseos o acciones, son reguladas por el sistema de motivación-recompensa, dichas actividades cumplen un papel vital para el individuo y su especie; la función de este sistema es garantizar que el individuo repita tales conductas. El sistema de motivación-recompensa es blanco de las drogas de abuso y algunas de estas sustancias pueden activarlo de dos a diez veces más que un reforzador natural con efectos más duraderos.

Por motivos religiosos o medicinales, el uso de las drogas, ha sido una constante a lo largo del tiempo en las diversas culturas de la Tierra. En México el peyote y los hongos alucinógenos, en Suramérica la hoja de coca, en el norte de África y Oriente medio la marihuana y en el imperio Medo-Persa la goma de opio. No es sino hasta las últimas décadas que el consumo de drogas se ha vuelto un problema de dimensiones globales que continúa en ascenso y que preocupa a todos los sectores de la sociedad (Méndez *et al.*, 2010).

La adicción es una enfermedad del cerebro que altera múltiples circuitos del mismo, entre los que se encuentran aquellos relacionados con la gratificación, la motivación, el aprendizaje y la memoria, así como el control de las inhibiciones sobre el comportamiento ([www.drugabuse.gov](http://www.drugabuse.gov)).

El consumo de opiáceos como la morfina y heroína, es una enfermedad que involucra la ruptura de relaciones interpersonales, así como el incumplimiento de obligaciones laborales y familiares. El uso de jeringas compartidas entre los adictos incrementa el riesgo de contraer enfermedades infecciosas tales como VIH y el virus de la hepatitis B y C. Los opiáceos generan inmunosupresión atrofiando órganos linfoides (Gavériaux-Ruff *et al.*, 1988), disminuyendo la capacidad efectora de macrófagos (Lugo-Chinchilla, 2002) y afectando la proliferación de células progenitoras de macrófagos y linfocitos (Roy, 1996). También son recurrentes actos de violencia, delitos, suicidios y muertes ocasionadas por conducir bajo los efectos de las drogas.

La Organización de las Naciones Unidas (ONU) ha estimado que en el período de 1998 a 2001, 185 millones de personas consumían drogas a nivel mundial: de éstas 147.4 millones usaban marihuana y otras formas de Cannabis, 33.4 millones consumían estimulantes del tipo de las anfetaminas (ETA), 13.4 millones cocaína, 12.9 millones, derivados del opio, y entre estos últimos aproximadamente 9.2 millones consumían heroína. (Medina-Mora, 2003)

## **2.2 La morfina**

Durante el siglo XIX en Alemania Friederich Wilhelm Sertuner, trabajando en el aislamiento de los principios activos del opio descubrió una sustancia a la que nombro *principium somniferum opii* y posteriormente *morphinum*, aludiendo al dios griego del sueño Morfeo (Esteva, 2005). Alrededor de 1820 la morfina se volvió un producto comercial de gran popularidad en Europa y América del norte debido a sus propiedades analgésicas (Duarte, 2005). La morfina es el opiáceo más abundante del opio (*Papaver somniferum*), aportando casi por completo las propiedades analgésicas de esta sustancia.

## **2.3 La heroína**

La heroína es un derivado diacetilado de la morfina, fue sintetizada en 1874 y comercializada por la firma Bayer en 1897 (Hidalgo, 2007) con la intención de curar la adicción a la morfina (Florez, 1997). Esta molécula posee mayor liposolubilidad que su precursora, por esta razón, cruza fácilmente la barrera hematoencefálica alcanzando mayores concentraciones en el cerebro de forma muy rápida (Hidalgo, 2007). Algunas esterases sanguíneas desacetilan la heroína formando 6-monoacetilmorfina (6-MAM) y morfina; la morfina experimenta reacciones de glucuronidación en el hígado para formar morfina-6-glucurónido (M-6-G) y morfina-3-glucurónido (M-3-G).

La popularidad en el mundo de la heroína y sus efectos ha dado pie a eventos importantes, destacando: a) preparados que se pueden inyectar, fumar o administrar vía nasal (Goodman, 1996); b) disminución del costo de la droga y el incremento de su pureza. Estos hechos han propiciado mayor dependencia por la droga y en los adictos que suspenden su administración, un síndrome de abstinencia más acentuado. En la figura 1 se aprecia la estructura química de

la morfina y se observan los grupos funcionales propios de otros opiáceos como la heroína, hidromorfina y oximorfona, entre otros.

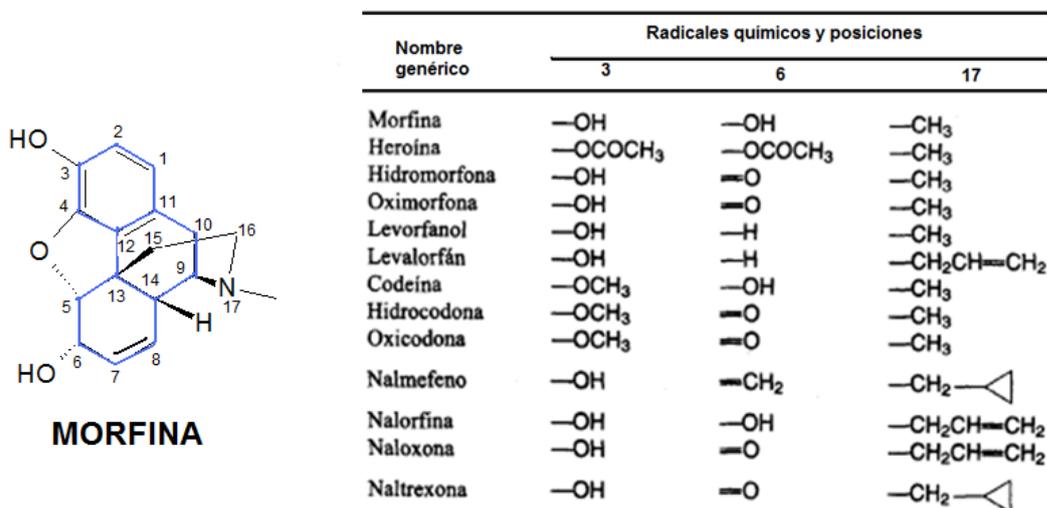


Figura 1. Análogos estructurales de la morfina. En color azul se muestra el núcleo pentrénico de la morfina y en la posición 9, el nitrógeno terciario metilado. También se presentan los radicales químicos de sus análogos estructurales. Modificado de Goodman 1996.

## 2.4 Uso terapéutico de los opiáceos

La propiedad terapéutica más importante de los opiáceos es la analgesia, por esta razón se usa en el área clínica para tratar el dolor agudo que no cede con la administración de otros fármacos analgésicos (Litter, 1992). En el estado de ánimo el efecto analgésico brinda la sensación de no estar inmerso en los eventos que ocurren alrededor del individuo, generando un estado agradable de relajación (Kalant, 2002). Algunos de los mecanismos del sistema nervioso central involucrados en disminuir la percepción del dolor, producen bienestar, por este motivo los opiáceos se consumen con fines diferentes a los terapéuticos (Goodman, 1996).

## 2.5 Intoxicación aguda por opiáceos

Los opiáceos pueden causar intoxicación aguda como consecuencia de una sobredosificación accidental en individuos que usan la droga por primera vez, al consumir la droga con mayor pureza o en cantidades mayores, también al reiniciar el uso antiguos consumidores que presentaban tolerancia y que vuelven a consumir las mismas cantidades que acostumbraban. Es común la

intoxicación en combinación con otras sustancias que pueden potenciar los efectos de los opiáceos que llevan a la depresión respiratoria seguida de insuficiencia respiratoria o paro cardíaco.

## **2.6 Tratamiento común**

A pesar de los esfuerzos y logros obtenidos en el campo de las adicciones, es muy frecuente que a los hospitales ingresen personas en estado crítico de intoxicación aguda por el consumo de opiáceos. El tratamiento más común que se aplica a estos pacientes consiste en la administración de fármacos antagonistas, capaces de revertir los efectos de los opiáceos. Los fármacos más comúnmente utilizados son la naloxona y la naltrexona, sin embargo, estos tratamientos presentan algunos inconvenientes, entre ellos se puede mencionar que: a) la acción de los antagonistas es más breve que la de muchos opioides (Goodman, 1996), b) la administración prolongada de antagonistas incrementa la densidad de los receptores de opioides en el encéfalo (Goodman, 1996), c) estos fármacos antagonizan la acción de todos los opioides, incluyendo a los péptidos opioides, provocando problemas emocionales en el paciente (Florez, 1997; Nestler, 2002) y d) los efectos adversos derivados del uso de estos fármacos como son: Insomnio, ansiedad, somnolencia, náuseas, vómito, dolor abdominal, diaforesis y edema pulmonar (Rodríguez, 2005)

En contraste, los anticuerpos (Ab) son proteínas cuyo peso molecular es aproximadamente de 150 KDa, por lo tanto, no pueden cruzar la barrera hematoencefálica (BHE). Basándose este hecho, ninguna droga (200-400 Da) unida a un anticuerpo puede llegar al cerebro y causar sus efectos neurotóxicos. Debido a sus características estructurales, los anticuerpos se pueden unir a dos o más antígenos simultáneamente, dependiendo de su isotipo. Además, el tiempo de vida media de las inmunoglobulinas (Kuby et al., 2007) es mayor que el de los fármacos antagonistas.

## 2.7 El sistema inmune

El sistema inmune nos mantiene protegidos contra las enfermedades infecciosas. Este sistema está integrado por diferentes tipos de células y moléculas, la respuesta de estas en forma conjunta y coordinada se conoce como respuesta inmune.

La respuesta inmune innata implica una acción rápida contra elementos extraños al organismo. Este mecanismo siempre está listo para actuar. Sus principales componentes son; las barreras físicas y químicas, monocitos, neutrófilos, células asesinas naturales (NK) y el sistema del complemento.

Cuando esta respuesta no es capaz de detener un evento infeccioso, el organismo recurre a la respuesta inmune adaptativa que reacciona contra sustancias microbianas y no microbianas, esta tiene la cualidad de reconocer diferentes segmentos de una misma molécula, así como la de recordar y reaccionar con mas intensidad ante exposiciones posteriores contra el mismo estímulo antigénico. Los principales constituyentes de la respuesta adaptativa son los linfocitos y sus productos de secreción, los anticuerpos (Abbas *et al.*, 2007).

La respuesta inmune adaptativa tiene dos variantes conocidas como inmunidad humoral y celular. La primera está regulada por anticuerpos presentes en la sangre y las mucosas, estas proteínas son sintetizadas por linfocitos B (LB) que han sido activados, han proliferado y se han diferenciado en células plasmáticas productoras de Ab, este es el principal mecanismo de defensa contra microorganismos extracelulares. La inmunidad celular está mediada por linfocitos T (LT). Los LT se subdividen en diferentes poblaciones: linfocitos T citolíticos (CLTs) o  $CD8^+$  que detectan y destruyen células infectadas por microorganismos intracelulares, y los linfocitos cooperadores (LTh) o  $CD4^+$  que estimulan la activación, proliferación y diferenciación de LB, ya sea mediante el contacto directo entre moléculas de membrana o mediante la secreción de moléculas estimuladoras llamadas citocinas. Dependiendo de las citocinas que secreten los linfocitos se clasifican en Th1 y Th2. Los LTh1 secretan interleucina 2 (IL2) e interferón- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ), que activan macrófagos. Los LTh2 secretan IL4, e IL10, que activan LB para producir anticuerpos (Arnáiz, 1995).

## **2.8 Procesamiento y presentación de antígenos**

Para desencadenar la respuesta inmune adaptativa es necesario que el antígeno (Ag) sea capturado, procesado y presentado a LT por células presentadoras de Ag (APCs) que pueden ser células dendríticas (DC), macrófagos o LB. Las DC están presentes en órganos linfáticos, en el epitelio de la piel, en el tracto gastrointestinal y respiratorio, así como en la zona intersticial de órganos parenquimatosos. Las APCs llevan a cabo la presentación de Ag mediante el complejo principal de histocompatibilidad II (MHC II).

Las células dendríticas y los macrófagos expresan una variedad de receptores de superficie que reconocen patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs). Estas APCs capturan e internalizan Ag en endosomas, generando fragmentos peptídicos. A su vez, las moléculas del complejo principal de histocompatibilidad clase II (MHC II) son sintetizadas en el retículo endoplásmico de las APCs y vesiculadas en el aparato de Golgy, en su travesía hacia la superficie celular se fusionan con los endosomas donde se encuentran los Ag procesados. El complejo péptido-MHC II es enviado a la superficie de la APC, donde permanece expuesto para ser reconocido por células Th CD4<sup>+</sup> inexpertos que se localizan en órganos linfáticos secundarios. Esto ocasiona la activación, expansión clonal y diferenciación de estos linfocitos en células efectoras y linfocitos T de memoria (Abbas *et al.*, 2007).

## **2.9 Activación de L-B**

La respuesta inmune humoral inicia cuando el LB inexperto reconoce el Ag presentado por el LT. El Ag se une a inmunoglobulinas IgM e IgD presentes en la membrana celular del LB, activándolo. La activación conduce a la expansión clonal antígeno específica y a la diferenciación a células de memoria o a células plasmáticas productoras de Ab. Los LB activados que producen Ab de alta afinidad son seleccionados y expandidos preferencialmente, en un evento conocido como maduración de afinidad (Abbas *et al.*, 2007).

## **2.10 Anticuerpos**

Los anticuerpos son proteínas que se encuentran formando parte del complejo receptor (BCR) del LB y también como moléculas circulantes sintetizadas por células plasmáticas. Se conocen cinco clases de Ab, que se diferencian entre sí por cambios estructurales que les confieren diferentes funciones. Los cinco tipos de anticuerpos son: IgG, IgM, IgE, IgA e IgD. Estructuralmente están formados por cuatro cadenas peptídicas, dos pesadas y dos ligeras unidas entre sí de forma covalente. Las cadenas ligeras constan de una región variable y una constante mientras que las pesadas cuentan con una región variable y tres constantes. También es posible distinguir dos secciones: aquella que se encarga del reconocimiento y unión al antígeno llamada región de unión a antígenos (Fab) y otra implicada en las funciones efectoras de los anticuerpos y en su vida media en sangre, denominada fracción cristalizable (Fc). Las regiones donde se produce el reconocimiento por parte de un Ab hacia un epítipo, han sido denominadas regiones determinantes de complementariedad (CDR). Hay tres de estas regiones conocidas como: CDR1, CDR2 y CDR3, mismas que se localizan en las regiones variables de las cadenas ligera y pesada del Ab (Ruíz *et al.*, 2007).

## **2.11 Relación entre los opiáceos y la inmunidad**

En todas las civilizaciones se ha considerado a la salud un elemento indispensable para el adecuado desarrollo de la sociedad. Se sabe que los chinos en el siglo XI a.C. practicaban la variolización, es decir, inhalaban polvo obtenido de costras de las pústulas causadas por el virus de la viruela para inmunizarse contra esta enfermedad; desde entonces se han hecho esfuerzos para combatir enfermedades infecciosas ocasionadas principalmente por virus y bacterias mediante vacunas formuladas a partir de microorganismos vivos atenuados, muertos, o bien fracciones antigénicas inactivadas que permitan estimular el sistema inmunológico, generando anticuerpos contra estos patógenos. En este contexto, surge el reto de estimular la respuesta inmunológica para tratar enfermedades no infecciosas como las adicciones a opiáceos, moléculas no peptídicas de bajo peso molecular (200–400 Da) incapaces de estimular por sí mismas la respuesta inmune (Antón *et al.*, 2009).

A pesar de no inducir la producción de anticuerpos, las drogas pueden ser capturadas por estas inmunoglobulinas. Los haptenos, como se les denomina a estas moléculas, se vuelven inmunogénicas cuando se unen a una proteína acarreadora, formando un conjugado inmunogénico hapteno-molécula acarreadora, utilizado para vacunar individuos y estimular la producción los anticuerpos de interés.

### **2.12 Conjugados inmunogénicos antiadictivos**

Se trata de compuestos sintéticos que comparten la característica de unir covalentemente el hapteno (la droga de abuso) a través de un brazo espaciador a los grupos químicamente reactivos (residuos de lisina/arginina) presentes en una proteína inmunogénica que es usada como acarreadora.

El objetivo de estos modelos es presentar la droga como epítipo dominante al sistema inmunológico para activar la respuesta inmune humoral y así generar elevados niveles de anticuerpos contra la droga usada como hapteno (Antón *et al.*, 2009).

### **2.13 Tecnología de hibridomas**

Normalmente cuando se inmuniza a un organismo se generan diversos anticuerpos contra diferentes epítopos del inmunógeno, es decir, se desencadena una respuesta policlonal, pues, son muchos los linfocitos que se activan y diferencian con la intención de proteger al organismo. Para solucionar esta situación, en 1975 los investigadores George Köhler y Cesar Milstein desarrollaron la tecnología de hibridomas (Kohler & Milstein, 1975) que ha permitido obtener anticuerpos monoclonales homogéneos, específicos, en grandes cantidades y de forma prácticamente ilimitada. Los hibridomas son células obtenidas por la fusión *in vitro* de linfocitos B (LB) productores de anticuerpos y células de mieloma. Estas células mantienen las características de sus predecesoras, es decir, heredan del linfocito la capacidad de sintetizar anticuerpos, y del mieloma la capacidad de sobrevivir *in vitro* y bajo estas condiciones dividirse de forma rápida e ilimitada, hechos en los que se basa esta tecnología.

## **Células de mieloma**

Los mielomas son células cancerígenas que pueden inducirse en ratones al inyectarles aceite mineral en la cavidad peritoneal. Las primeras células de este tipo fueron aisladas de ratones Bagg Albinos (BALB/c) a principios de los años setenta y desde entonces se han utilizado para los experimentos de fusión celular. (Harlow, 1988). Las líneas celulares procedentes de ratón más comúnmente utilizadas en los protocolos de fusión celular son P3-X63Ag8, X63Ag8.653 y Sp2/0-Ag14. (Otero, 1995)

Estas células deben tener tres características importantes: 1) Haber sido genéticamente seleccionadas, de tal forma que no sinteticen sus propias inmunoglobulinas (George, 2000), 2) Deben ser histocompatibles con los LB que producen los anticuerpos, 3) Deben carecer de la enzima hipoxantina-guanina-fosforribosiltransferasa (HGRPT) (Rojas- Espinoza, 2006).

## **Inmunización**

Para obtener Ab específicos, el primer paso consiste en la inmunización de ratones con el inmunógeno que contiene el determinante antigénico contra el que se desea obtener los Ab.

Cuando se utiliza algún método de detección confiable, como lo es un inmunoensayo, y se demuestra la presencia de Ab en el suero de los animales previamente inmunizados, se procede a obtener las células del bazo. El siguiente paso es fusionar un número determinado de esplenocitos con células de mieloma previamente cultivadas *in vitro*.

## **Fusión celular**

La fusión celular (Figura 2) es un procedimiento mediante el cual dos células se integran estructuralmente, es decir, hay una integración de membranas, citoplasma y núcleos, en una nueva célula viable (Bartal, 1978). Esto se consigue utilizando un agente fusógeno como el poletilenglicol, que facilita la formación de células híbridas.

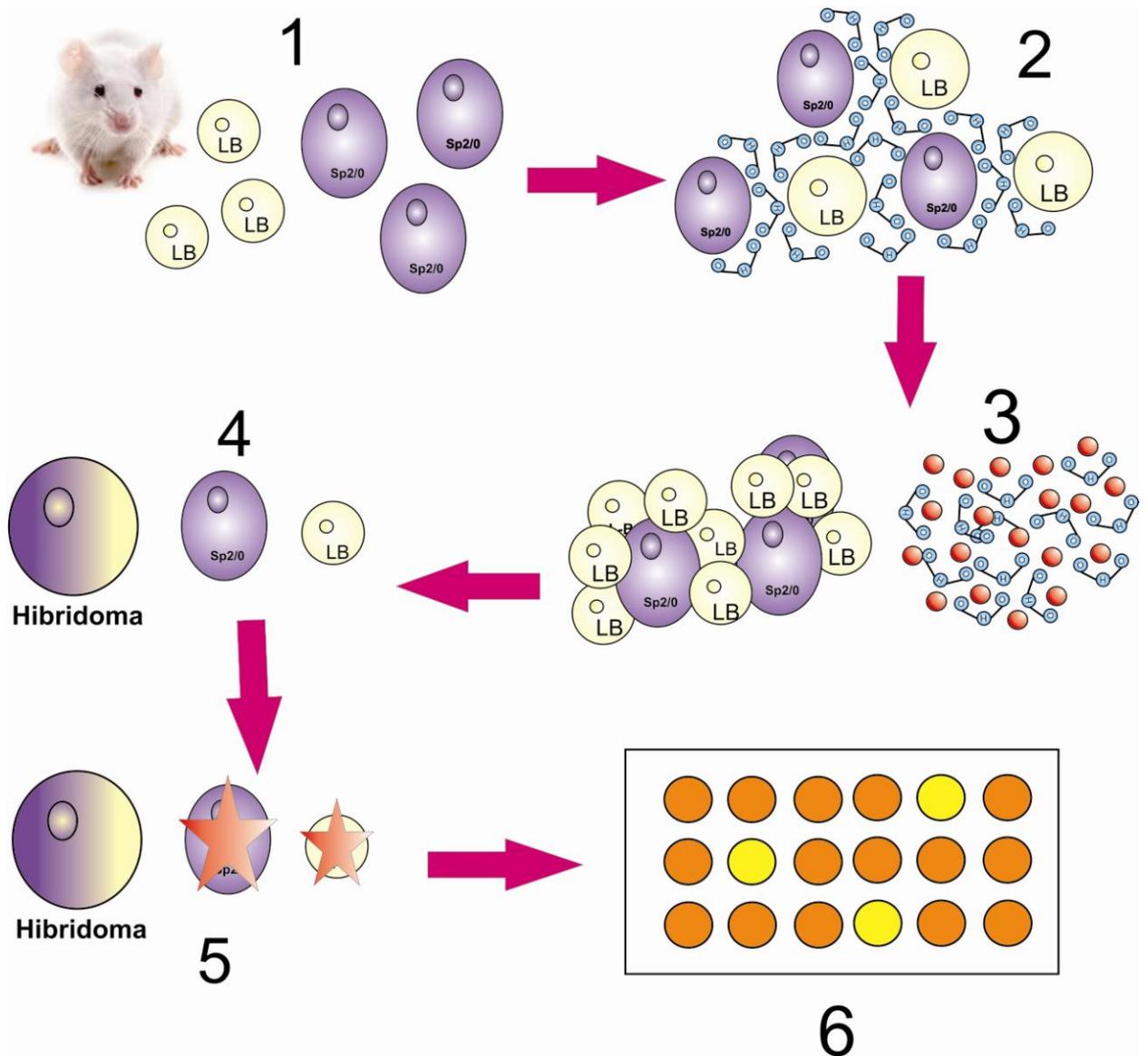


Figura 2. El esquema resume los pasos seguidos para obtener hibridomas. 1) Para el experimento de fusión se requieren LB de un animal inmunizado y células de mieloma. 2) Las células encuentran en un medio líquido. 3) Para favorecer el proceso de fusión, se adiciona el agente fusógeno PEG. 4) Adición del medio selectivo HAT. 5) Solo sobrevivirán los hibridomas formados por LB y Mielomas. 6) Mantenimiento de los hibridomas obtenidos. Imagen propia.

Las células recién fusionadas deben colocarse en placas de cultivo para ser incubadas a 37 °C, 5 % de dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) y humedad relativa de 95 %. Los hibridomas serán visibles bajo el microscopio después de cuatro días y a simple vista después de siete u ocho días. (Hokfield *et al.*, 1993; Harlow, 1988).

### Formación de hibridomas

La fusión celular es un evento completamente al azar y puede ocurrir entre células de la misma especie (mieloma-mieloma, LB-LB), obteniéndose un homocarión, si se trata de células de especies diferentes, entonces se forma un heterocarión (mieloma-LB). En ambos casos se trata de una célula con dos o más núcleos dentro de un solo citoplasma. La célula híbrida viable (hibridoma) se forma cuando el heterocarión entra en el primer ciclo mitótico, formándose un único uso acromático, después de este evento cada célula hija obtiene un solo núcleo con cromosomas procedentes de las dos células progenitoras. (Bartal, 1978).

### Selección de hibridomas

Para seleccionar únicamente a los híbridos formados por la fusión de LB y mielomas, se utiliza un medio de cultivo selectivo que contiene Aminopterina, Hipoxantina y Timidina (HAT). La aminopterina bloquea la síntesis de DNA por la vía endógena. Las células que sobreviven al tratamiento con aminopterina utilizan una vía alterna (exógena) para sintetizar DNA a partir de hipoxantina mediante la acción de la enzima Hipoxantina-guanina fosforribosiltransferasa, enzima es aportada por el LB durante la fusión celular (Abbas *et al.*, 2007).

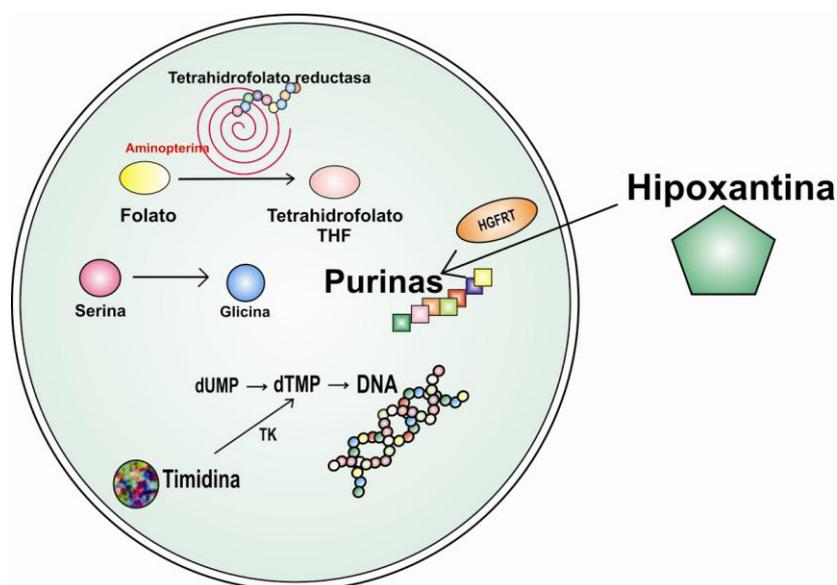


Figura 3. Selección enzimática de hibridomas. La aminopterina inhibe la síntesis purinas.

## **Identificación y mantenimiento de hibridomas**

Después de cuatro o cinco días de haber fusionado se deben revisar las placas de cultivo bajo el microscopio para determinar la ubicación de los hibridomas formados, entonces se les debe adicionar más medio de cultivo selectivo para favorecer su desarrollo. Lo más habitual es adicionar 100  $\mu$ L del medio de cultivo y volver a incubar las placas. Después de tomar el sobrenadante es necesario reponer el mismo volumen de medio selectivo fresco (Hokfield *et al.*, 1993; Harlow, 1988).

## **Método de detección**

Para identificar los hibridomas productores de los MAb de interés, es importante contar con el método de detección adecuado (Hockfield *et al.*, 1993). El ensayo debe aportar resultados contundentes y solo se debe utilizar pequeños volúmenes de sobrenadante (100  $\mu$ L o menos). El método debe ser rápido y fácil de llevar a cabo. Se debe contar con controles positivos y negativos confiables.

Los Ab pueden ser identificados mediante diversos métodos. Los métodos de detección más comúnmente utilizados son aquellos que utilizan como marcadores una enzima (Harlow, 1998).

## **ELISA de captura de anticuerpo**

Este ensayo, mejor conocido como ELISA indirecto, proporciona un medio muy eficiente para analizar los sobrenadantes de los hibridomas formados. Se utiliza una enzima como marcador para mediar la formación de complejos antígeno-anticuerpo. El marcador enzimático que se emplea en estos análisis está acoplado a un ligando que en este caso se trata de un anticuerpo contra el anticuerpo primario. El método consiste en fijar el antígeno (Ag) a la superficie de una placa de poliestireno de 96 pozos (fase sólida) y hacer un lavado de la placa para eliminar lo que no se adhirió. El sobrenadante de los hibridomas se incuba en estos mismos pozos, se hace un segundo lavado de la placa y posteriormente se adiciona el anticuerpo secundario marcado con una enzima. Se requiere un tercer lavado de la placa para eliminar el conjugado enzimático libre antes de proceder a determinar la cantidad de conjugado enzimático enlazado. A continuación se adiciona un sustrato cromogénico, entonces los

pozos que contienen el Ab de interés adquiere un color característico que evidencia la reacción catalítica de la enzima sobre el sustrato, esto permite la identificación inmediata de los hibridomas que producen el anticuerpo de interés (Hockfield *et al.*, 1993).

### **Expansión de los hibridomas positivos**

Una vez identificados los hibridomas positivos, se deben expandir inmediatamente, a recipientes de mayor capacidad, desde placas de 96, 24, 12 y 6 pozos hasta frascos de cultivo de 50 mL y 200 mL. Es recomendable que durante el proceso de expansión clonal se congelen muestras de estos hibridomas para poder responder a cualquier contingencia como la contaminación con hongos, bacterias, levaduras o micoplasmas (Hockfield *et al.*, 1993).

### **Conservación de los hibridomas**

Los hibridomas pueden conservarse congelados por periodos de tiempo relativamente largos. Los mejores resultados se obtienen congelando las células mientras se encuentran dividiéndose de forma logarítmica (Hockfield *et al.*, 1999). El objetivo principal de la criopreservación es que la célula conserve la propiedad de sintetizar anticuerpos monoclonales específicos. El método está basado en formar una suspensión de hibridomas en algún agente criopreservador como el dimetilsulfóxido (DMSO) al 7% y congelar a -80°C en refrigeradores (REVCO) o a -260 °C en nitrógeno líquido.

### **Anticuerpos monoclonales**

Los anticuerpos monoclonales (MAb) son inmunoglobulinas secretadas por células que descienden de un sola célula progenitora, clonas genéticamente idénticas, y todas sus interacciones con un antígeno definido son siempre las mismas.

Siguiendo esta tecnología a principios de 1980 se desarrollaron los anticuerpos monoclonales de primera generación, anticuerpos obtenidos de ratón, rata y conejo; sin embargo, las secuencias peptídicas de la región Fc de estos anticuerpos son antigénicas para el ser humano, es decir, inducen la síntesis de anti-anticuerpos, hecho que obstaculizó su aplicación terapéutica.

Los avances de la biología molecular e ingeniería genética han permitido disminuir la inmunogenicidad de estas moléculas al obtener anticuerpos monoclonales quiméricos, humanizados y anticuerpos completamente humanos, este grupo se conoce como anticuerpos monoclonales de segunda generación (Kaur *et al.*, 2007).

La obtención de anticuerpos monoclonales de primera y segunda generación han sido el antecedente de la seroterapia de tercera generación también llamada faboterapia, el término se refiere a la administración del fragmento dimérico de unión a antígenos F (ab')<sub>2</sub>, el fragmento de unión a antígenos (Fab) ó bien, el fragmento de cadena sencilla (scFv) de los anticuerpos, estas porciones se obtienen mediante proteólisis enzimática de las inmunoglobulinas. Tales fragmentos conservan la capacidad de reconocer y unirse al antígeno con la misma afinidad y especificidad que el anticuerpo completo. Entre las ventajas de esta nueva metodología se puede mencionar que a diferencia de un anticuerpo intacto, tanto los Fab como los scFv pueden ser eliminados por filtración glomerular y en general presentan mejor farmacocinética que el Ab completo, así mismo, se consigue disminuir la inmunogenicidad de estas moléculas (Zhu *et al.*, 2009).

Actualmente los anticuerpos monoclonales se utilizan como reactivos biológicos principalmente para el diagnóstico y tratamiento en tres áreas clínicas: enfermedades autoinmunes, oncología y enfermedades infecciosas. También se utilizan en diversas áreas de la investigación como: Inmunología, biología celular, bioquímica, microbiología, virología, parasitología, fisiología y biología molecular (George, 2000).

Ahora, también existe la posibilidad de sintetizar anticuerpos catalíticos, estos anticuerpos al igual que las enzimas son capaces de reconocer estados de transición de la molécula blanco y así hidrolizarla. Como los estados de transición de los sustratos enzimáticos son muy inestables, se sintetiza un análogo estructural del estado de transición de interés y se utiliza como inmunógeno para generar los anticuerpos catalíticos específicos (Nevinsky *et al.*, 2000).

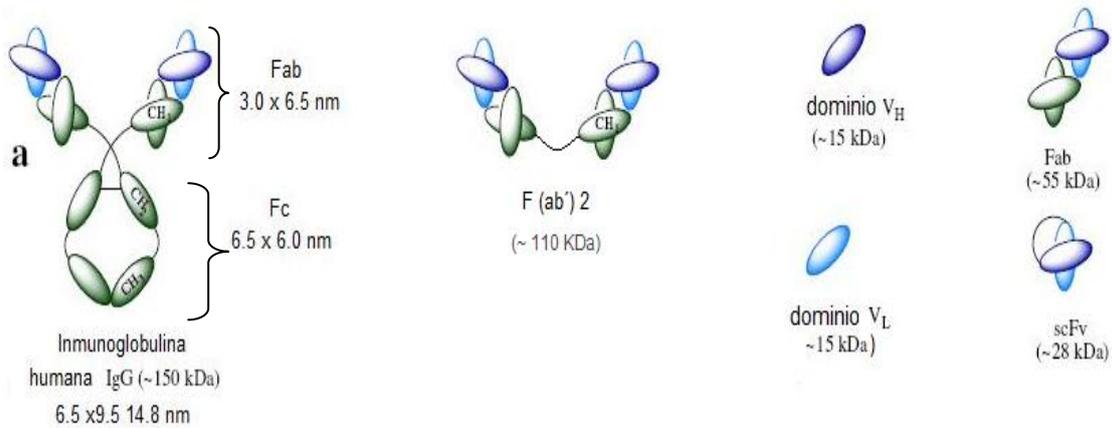


Figura 4. Representación esquemática de las inmunoglobulinas y sus fragmentos. Se representa la estructura general de un anticuerpo monomérico. Se distinguen dos regiones principales, la fracción de unión al antígeno (Fab) y la fracción constante (Fc). También se ejemplifican los fragmentos F(ab')<sub>2</sub>, Fab y scFv. Imagen modificada de Zhu *et al.*, 2009.

### Inmunofarmacoterapia

Debido a sus características de homogeneidad, especificidad y gran potencial terapéutico, hoy en día los anticuerpos monoclonales son el centro de atención de las industrias farmacéutica y biotecnológica, lo que ha impulsado nuevas estrategias terapéuticas como las inmunofarmacoterapias dirigidas contra la adicción a opiáceos, pues, como ya se mencionó los tratamientos convencionales que involucran terapia conductual y el uso de fármacos agonistas o antagonistas de estas sustancias, no han mostrado resultados definitivos en el tratamiento de las adicciones.

La inmunofarmacoterapia dirigida al tratamiento de la adicción a drogas de abuso, se basa en la generación o administración de anticuerpos (completos o fragmentados) capaces de unirse de forma específica a una droga, antes de que esta llegue al cerebro (Janda *et al.*, 2004) evitando así sus efectos neurotóxicos (Montoya, 2010), por esta razón, la inmunofarmacoterapia es más segura que los tratamientos convencionales que actúan directamente sobre receptores de las células nerviosas (Antón *et al.*, 2009). Para lograr este objetivo algunos investigadores se han dado a la tarea de generar vacunas que se encuentran en diferentes etapas de desarrollo contra sustancias altamente adictivas tales como la cocaína (Carrera *et al.*, 2000), nicotina (Cerny, 2009), metanfetaminas (Gentry *et al.*, 2009) y morfina/heroína (Antón *et al.*, 2009).

Actualmente existen tratamientos terapéuticos a base de anticuerpos monoclonales en diferentes etapas clínicas de desarrollo, dirigidos a tratar las sobredosis por el consumo de drogas como la fentaciclina (McClurkan *et al.*, 1993 en Peterson *et al.*, 2006) y metanfetaminas (Peterson *et al.*, 2006).

En investigaciones preliminares se ha considerado la idea de estimular el sistema inmunológico para producir anticuerpos contra los opiáceos, un estudio realizado por Bonse *et al* (1974) describe la inmunización de monos con un conjugado inmunogénico de morfina-6-hemisuccinato-albúmina sérica bovina, los resultados revelaron una autoadministración reducida de heroína en los animales inmunizados. Otros grupos de investigación como Glasel *et al* (1983) estudiando la caracterización de receptores de opiáceos y, por otro lado, Zawada *et al* (1988) analizando la estructura de los receptores opiodes obtuvieron anticuerpos monoclonales contra la morfina, sin embargo, en ambos casos los anticuerpos obtenidos presentaron débil reactividad cruzada con antagonistas de los opioides. Rahbarizadeh *et al* (2000) reportan la obtención de anticuerpos monoclonales contra la morfina, el objetivo de su trabajo fue modificar un inmunoensayo para la detección del opiáceo sustituyendo la enzima HRP comúnmente utilizada por la penicililaza. LI *et al* (2005) también han obtenido anticuerpos monoclonales anti morfina cuya principal característica es que reconocen mejor la heroína que la morfina.

### **III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN**

Actualmente la adicción a sustancias como la morfina y heroína es un problema de impacto global, para tratar la adicción contra los opiáceos se han empleado tradicionalmente fármacos antagonistas de los opioides como la naloxona y la naltrexona, capaces de desplazar cualquier opioide unido a los receptores  $\mu$ ,  $\kappa$  o  $\delta$  de las células nerviosas y así revertir sus efectos; sin embargo el uso de estos fármacos no ha mostrado resultados definitivos en el tratamiento de las adicciones, esto ha impulsado a varios grupos de investigación para desarrollar nuevas alternativas terapéuticas contra estas enfermedades. El logro experimental de generar un hibridoma productor de anticuerpos monoclonales contra la estructura molecular de la morfina, nos da la oportunidad de brindar una mejor atención a un amplio sector de la población que se encuentra en riesgo de padecer graves problemas de salud o incluso de perder la vida a causa de la intoxicación por el consumo de opiáceos, además de poder detectar estas sustancias en fluidos corporales. De manera indirecta se combaten los problemas de violencia y delincuencia que se asocian al consumo de drogas.

Tomando como punto de referencia los efectos que el consumo de opiáceos genera en el cerebro, el sistema inmunológico, la conducta y en el ámbito social, así como las limitaciones de los procedimientos clásicos utilizados para tratar los casos de intoxicación ocasionados por el consumo de estas sustancias, es claro que las estrategias biotecnológicas como la que se presenta en este trabajo, cada vez están cobrando mayor presencia e importancia en el área clínica y de investigación. En este sentido, el presente trabajo explica la generación e identificación de un hibridoma de origen murino capaz de sintetizar anticuerpos monoclonales contra la estructura molecular de la morfina y otros opiáceos.

#### **IV. Hipótesis**

Si los procedimientos de inmunización con el complejo inmunogénico M-TT y la fusión celular se llevan a cabo adecuadamente, entonces se podrían obtener hibridomas productores de anticuerpos monoclonales anti-morfina capaces de reconocer y unirse selectivamente a esta sustancia y quizás a otros opiáceos análogos estructurales de la morfina. Si se consigue estabilizar y mantener viables los hibridomas productores de anticuerpos monoclonales anti-morfina, entonces se contará con un valioso reactivo inmunológico que podría someterse a procedimientos de purificación, producción masiva, pruebas de inmunoprotección en animales, secuenciación y finalmente hacerlo apto para su uso terapéutico en humanos.

## **V. Objetivos del trabajo**

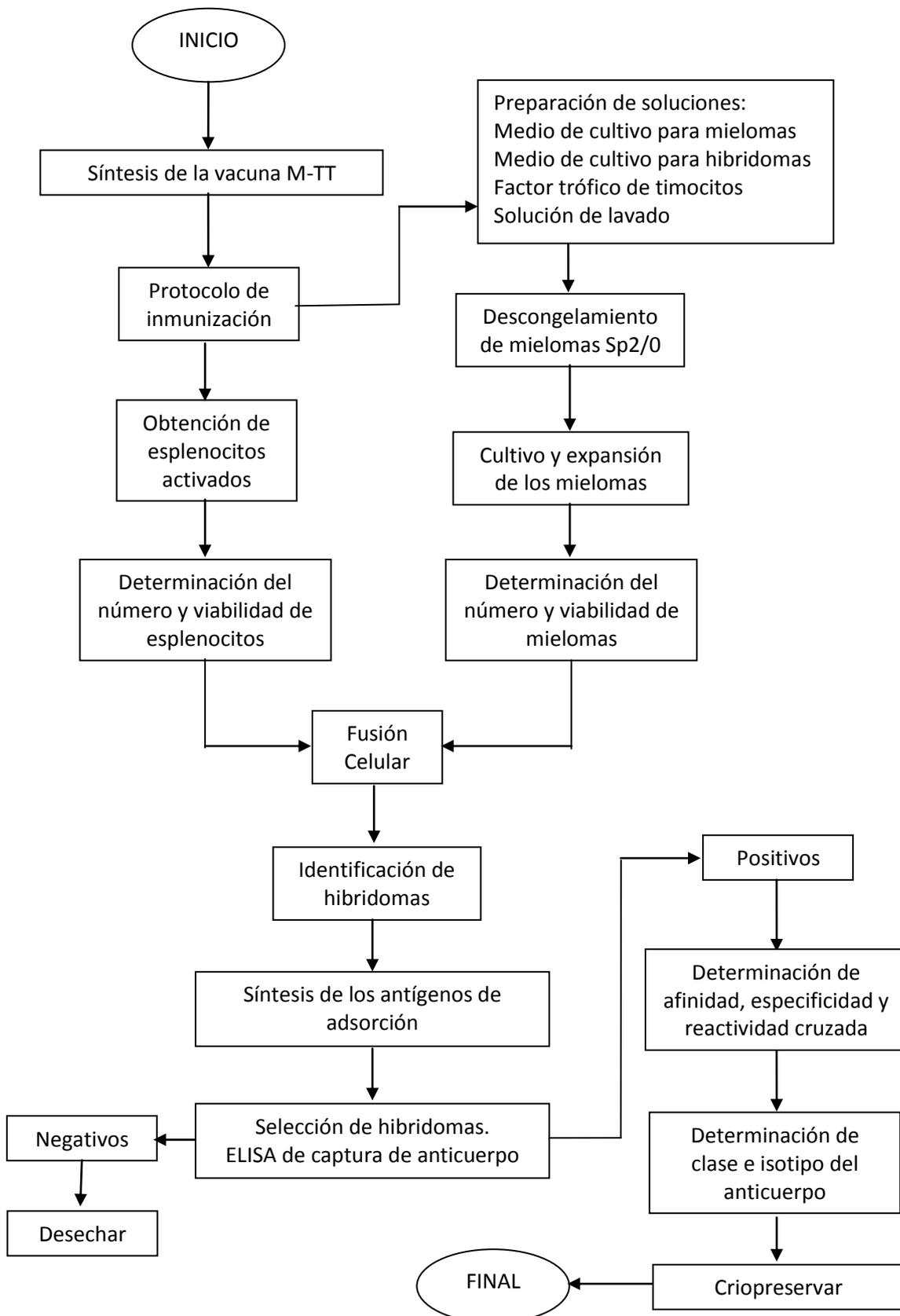
### **5.1 Objetivo general**

Obtener “*in vitro*” un hibridoma productor de anticuerpos monoclonales murinos que reconozcan la molécula de la morfina como blanco, empleando la técnica de fusión celular entre células de mieloma Sp2/0 y linfocitos activados de un ratón BALB/c inmunizado con la vacuna M-TT (Morfina Toxoide tetánico), así como la identificación de dicho hibridoma mediante ensayos inmunoenzimáticos de ELISA.

### **5.2 Objetivos específicos**

- ❖ Controlar las condiciones de asepsia que requiere el cultivo celular.
- ❖ Realizar de forma adecuada el cultivo de mielomas.
- ❖ Obtener, mantener y preservar el hibridoma producto de la fusión celular.
- ❖ Identificar el hibridoma productor del anticuerpo de interés mediante inmunoensayos de ELISA.
- ❖ Determinar la afinidad y especificidad del MAb, utilizando ensayos inmunoenzimáticos de ELISA por captura de anticuerpo y ELISA de competición.
- ❖ Determinar la clase e isotipo de la inmunoglobulina.

## VI. DIAGRAMA DE FLUJO



## VII. MATERIALES Y MÉTODOS

### 7.1. CULTIVO DE MIELOMAS

#### Descongelación

El procedimiento se llevó a cabo siguiendo un método estándar para descongelar células descrito por Hockfield y colaboradores (1993). En un tubo de 50 mL (CORNING<sup>R</sup>) para centrifuga se adicionaron 2 mL de medio de cultivo para mieloma que consta de RPMI 1640 (GIBCO<sup>R</sup>), Suero Fetal Bovino al 10% (GIBCOBRL<sup>R</sup>), L-Glutamina 1X (SIGMA<sup>R</sup>), buffer HEPES 25 Mm (GIBCO<sup>R</sup>) y los siguientes antibióticos Penicilina Estreptomicina y Neomicina PSN 1X (GIBCO<sup>R</sup>). Se procedió a descongelar tres crioviales (Nunc CrioTube<sup>TM</sup>) que se encontraban a -80° C y cada uno contenía 1 mL de suspensión celular (mielomas murinos Sp2/0) a una concentración de  $1 \times 10^6$  células por mililitro. Los viales se descongelaron en un baño María, se removió su contenido con una pipeta estéril y de forma individual se depositaron en tres tubos de 50 mL (CORNING) que contenían 2 mL de medio de cultivo. Se resuspendió suavemente la pastilla y se adicionaron 7 mL más de medio de cultivo. Los 10 mL de suspensión celular se centrifugaron a 200xg por 10 minutos a temperatura ambiente en una centrifuga EPENDORF (5804R). Se desechó el sobrenadante, la pastilla se resuspendió en 10 mL de medio de cultivo para mielomas y se colocó con la ayuda de una pipeta estéril en tres frascos de cultivo de poliestireno de 50 mL (nunc<sup>R</sup>) (Hockfield *et al.*, 1993).

#### Cultivo y expansión de la línea celular Sp2/0

Las células de mieloma descongeladas se colocaron en incubadoras (NUARIRE NO.NU 4850) a una temperatura de 37° C, concentración de CO<sub>2</sub> del 5 %, 95 % de aire y humedad relativa del 95 %.

Estas células se revisaron diariamente. Aproximadamente tres días después de haberlas descongelado, el medio de cultivo se tornó amarillo y el número de células se incremento notablemente, en otras palabras, las células entraron en fase logarítmica ( $1 \times 10^6$  células/ml (Hockfield *et al.*, 1993)) de división. Se decidió expandir el cultivo hacia frascos de mayor capacidad. En un frasco de cultivo de poliestireno (NUNCMT) de 200 mL se colocaron 7 mL

de la suspensión celular y se adicionaron 5 mL más de medio de cultivo. Tres días más tarde se repitió el mismo procedimiento.

### **Determinación del número y viabilidad de células de mieloma Sp2/0**

Ambas determinaciones se llevaron a cabo utilizando la tinción de azul de tripan y un hemocitómetro o cámara de Neubauer. Se raspo la superficie del frasco de cultivo con un scraper para obtener el mayor número posible de células y se homogeneizó la suspensión celular por pipeteo. La tinción se preparó con 10  $\mu$ L de suspensión celular y 10  $\mu$ L de una solución al 0.4 % azul de tripan (GIBCOR). El conteo celular se realizó en las cuadrículas de las esquinas del hemocitómetro aplicando 10  $\mu$ L de la tinción. La determinación de viabilidad se realizó contando el número total de células y determinando el porcentaje de células viables y no viables.

## **7.2. GENERACIÓN DE HIBRIDOMAS**

### **Protocolo de inmunización**

Se utilizaron siete ratones hembra de la cepa BALB/c de tres semanas de edad. El primer paso consistió en obtener el suero de los animales antes de inmunizarlos (suero preinmune), posteriormente los animales fueron inmunizados vía subcutánea con 100  $\mu$ g (dosis única) del inmunógeno M-TT y al día siguiente se tomo la primer muestra de sangre. A los 14 días se repitió el procedimiento de inmunización y toma de muestra. Esto se repitió cuatro veces más, de tal forma que el protocolo consistió en una vacunación y cinco reinmunizaciones.

### **Síntesis de la vacuna M-TT**

La vacuna para inmunizar a los animales fue sintetizada y proporcionada por el área de "síntesis orgánica de vacunas".

### **Preparación de mielomas para la fusión**

Los mielomas fueron descongelados y expandidos una semana antes de realizar el experimento de fusión, las condiciones de incubación fueron 37° C, concentración de CO<sub>2</sub> del 5 %, 95 % de aire y humedad relativa del 95 %. Al

término de este tiempo se determinó que estas células eran aptas para la fusión, pues se contaba con  $5.12 \times 10^7$  células cuya viabilidad era del 90%.

### **Factor trófico**

Se preparó un factor trófico a partir de timocitos. El medio para cultivar timocitos contenía: DMEM (GIBCO), L-Glutamina (SIGMA), Glucosa (4.5 g/l), buffer HEPES 25 mM (GIBCO), PSN 1X (GIBCO) y piruvato de sodio 1X. Se colocaron 10 mL de medio de cultivo DMEM a temperatura ambiente en tres cajas petri. Se procedió a sacrificar 4 ratones BALB/c de 2 a 3 semanas de edad por dislocación cervical. Se removió el timo y se colocaron las 4 glándulas en una de las cajas petri que contenían medio de cultivo, se realizó un lavado secuencial hacia la segunda y la tercera caja. Se disociaron las 4 glándulas utilizando el embolo de una jeringa. El tejido disgregado se vertió en un tubo para centrifuga (CORNING) de 15 mL. Los restos de tejido se dejaron sedimentar y se transfirió el sobrenadante a otro tubo nuevo, desechando los restos de tejido. Se contaron los timocitos en un hemocitómetro. Esta suspensión celular se centrifugó a 800xg por 10 minutos a temperatura ambiente. Se desechó el sobrenadante y se resuspendió el pellet en medio de cultivo fresco de tal forma que se obtuvo una concentración final de  $4 \times 10^6$  células por mililitro (50 mL finales de suspensión). La suspensión celular se transfirió a frascos de cultivo estériles (nunc<sup>R</sup>) de 50 mL de tal forma que la concentración de celular sea mantuvo en  $2 \times 10^8$  células por frasco de cultivo. Los frascos se incuban a una temperatura de 37° C, concentración de CO<sub>2</sub> del 5 %, y humedad relativa del 95% por 48 horas. Después de este tiempo el medio se transfirió a tubos (CORNING) de 50 mL y se centrifugó a 1000xg por 10 minutos a temperatura ambiente. Se desecharon las células y el sobrenadante se filtró a través de membranas (Millipore) de 0.2 µm de diámetro, finalmente se almacenaron a 4 ° C.

### **Obtención de los esplenocitos activados del ratón inmunizado con la vacuna M-TT**

Para llevar a cabo este procedimiento se utilizó un ratón BALB/c previamente inmunizado con la vacuna morfina toxoide tetánico (M-TT), el ratón inmunizado fue proporcionado por la sección de “inmunoensayos”.

Se pipetearon 20 mL de solución de lavado, preparada a partir de DMEM, penicilina, estreptomina y neomicina (DPS) a 37° C en tres cajas petri estériles. El ratón se sacrificó por dislocación cervical. Se removió el bazo y se colocó en una de las cajas petri. El bazo se lavó pasándolo secuencialmente de una caja a otra. Para la disociación de tejido se utilizó el embolo de una jeringa. El tejido disociado se depositó en un tubo (CORNING) de 50 mL. Se dejó que sedimentaran los restos del tejido y el sobrenadante se transfirió a otro tubo 50 mL, llevándolo a un volumen final de 50 mL con la solución de lavado a 37° C. Se contaron los esplenocitos utilizando el hemocitómetro.

### **Determinación del número y viabilidad de esplenocitos**

La viabilidad y el número de esplenocitos se calcularon de la misma forma que en el caso de los mielomas, obteniendo  $1.984 \times 10^7$  de esplenocitos con una viabilidad del 90%. Se hizo el cálculo correspondiente para determinar el número de mielomas necesarios para mantener una relación 5:1 entre esplenocitos y mielomas respectivamente.

### **Fusión celular**

Se empleó el protocolo de fusión celular descrito por Hockfield y colaboradores (1993). Las suspensiones celulares obtenidas en el paso anterior fueron centrifugadas por separado a 400xg por cinco minutos a temperatura ambiente. Se resuspendió cada pastilla en 10 mL de DPS a 37° C. Se mezclaron ambas suspensiones celulares en un solo tubo (CORNING) de 50 mL, se ajustó el volumen a 50 mL con DPS a 37° C y se centrifugó a 800xg por 5 minutos a temperatura ambiente, se removió el sobrenadante y se resuspendió nuevamente la pastilla en DPS a 37° C. Este procedimiento se repitió dos veces más. En el último paso se removió casi todo el sobrenadante del tubo manteniendo la pastilla intacta en una pequeña cantidad de líquido. Se disgregó la pastilla suavemente, y lentamente se adicionó 1 mL de PEG (Gibco) estéril al 50 % a 37° C. Se sumergió el tubo en un baño María a 37° C y se agitó suavemente el contenido del tubo durante 1 minuto. Mientras se continuaba agitando del tubo se adicionó DPS durante un periodo de 4

minutos como se indica: a) Se adicionó 1 mL por goteo durante el primer minuto, b) Se adicionaron 2 mL por goteo durante el segundo minuto, c) Se adicionaron 3 mL por goteo durante el tercer min, d) Se adicionaron 6 mL por goteo durante el minuto. Se centrifugó la suspensión celular a 400xg por 5 minutos a temperatura ambiente. Se removió el sobrenadante teniendo cuidado de no disgregar la pastilla.

### **Selección de hibridomas**

Cuidadosamente se adicionaron al pellet 250 mL de medio selectivo para hibridomas que contiene RPMI 1640 (GIBCO<sup>R</sup>), Suero Fetal Bovino al 20% (GIBCOBRL<sup>R</sup>), L-Glutamina 1X (SIGMA<sup>R</sup>), buffer HEPES 25 Mm (GIBCO<sup>R</sup>), 5 % de factor trófico de timo, mezcla de antibióticos Penicilina Estreptomicina y Neomicina (PSN 1X GIBCO<sup>R</sup>), así como Aminopterina Hipoxantina y Timidina (1X HAT) . La pastilla se resuspendió y se dejó reposar entre 5 y 20 minutos a temperatura ambiente. La suspensión celular se repartió en 13 placas de poliestireno (NUNC<sup>TM</sup>) de 96 pozos utilizando una octapipeta, de tal forma que en cada pozo hubiera aproximadamente  $2 \times 10^5$  en un volumen de 200  $\mu$ L de suspensión celular. Las placas se colocaron en incubadoras a una temperatura de 37° C, concentración de CO<sub>2</sub> del 5 %, 95 % de aire y humedad relativa del 95 %.

### **Detección y Mantenimiento de los primeros hibridomas**

Las placas puestas en incubación se revisaron una semana después de la fusión celular y durante los siguientes días para ubicar a los hibridomas formados, los cuales se detectaron visualmente al observar un cúmulo de células con la apariencia de un lunar blanco, para confirmar que se trataba de una colonia celular se observó bajo el microscopio invertido de contraste de fases (LEICA) pudiendo identificar la presencia de núcleos celulares en división. El mantenimiento de estos consistió en adicionar 100  $\mu$ L de medio de cultivo selectivo a los pozos donde se detectó visualmente la formación de hibridomas.

### 7.3. IDENTIFICACIÓN DE HIBRIDOMAS

Durante esta etapa que inició 13 días después de la fusión celular, se removieron 100  $\mu\text{L}$  del sobrenadante de aquellos pozos donde se identificó el crecimiento de hibridomas, mismos que ya cubrían al menos dos terceras partes del pozo.

#### Estructura de los antígenos de adsorción: Morfina-6-hemisuccinato BSA con brazo y Morfina-6-hemisuccinato BSA sin brazo

Los antígenos de adsorción fueron sintetizados y proporcionados por el área de "síntesis orgánica de vacunas". La proteína utilizada como acarreadora fue albúmina sérica bovina (SIGMA<sup>R</sup>).

#### Morfina-6-hemisuccinato-BSA con brazo espaciador

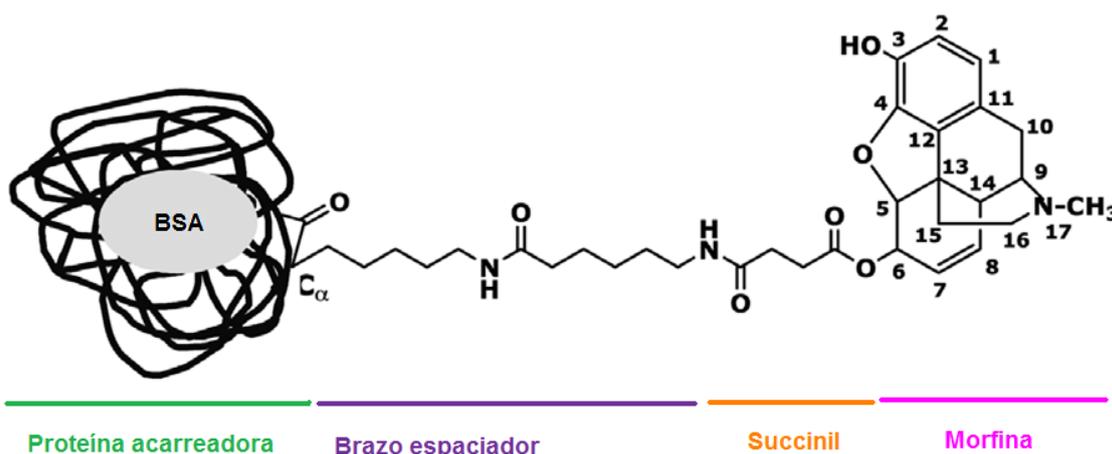


Figura 5. Antígeno de adsorción con brazo espaciador. Modificado de Antón et al, 2009.

#### Morfina-6-hemisuccinato BSA sin brazo espaciador

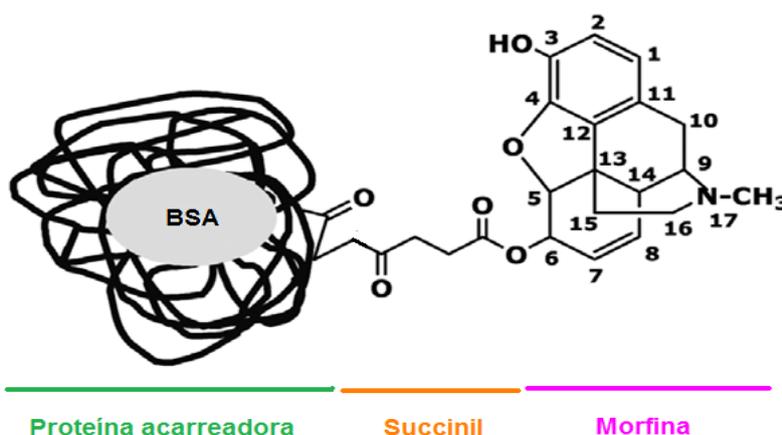


Figura 6. Antígeno de adsorción sin brazo espaciador. Modificado de Antón et al, 2009.

## **ELISA de captura de anticuerpo en fase sólida, utilizando morfina-6-hemisuccinato BSA con brazo, para identificar los hibridomas que potencialmente sintetizan anticuerpos capaces de identificar y unirse a la morfina**

La evaluación de sobrenadantes obtenidos de los hibridomas identificados visualmente después de la fusión celular, se llevó a cabo aplicando un procedimiento estándar del análisis inmunoenzimático de ELISA, descrito por Hockfield y colaboradores (1993). Como antígeno se utilizó morfina-6-hemisuccinato acoplada a Albúmina Sérica Bovina (BSA) mediante un brazo espaciador, se adsorbió 1 µg de antígeno por pozo a la fase sólida que consta de placas de poliestireno (NUNCTM) de 96 pozos, diluido en 100 µL de buffer de fosfatos (PBS) pH: 8.0-8.5. Después de la adsorción se hicieron cinco lavados con PBS y posteriormente se bloqueó la placa con una solución de de PBS, 1% de gelatina de teleósteo y 0.3% de Tween-20 (a 4°C). A continuación se adicionaron 100 µL de sobrenadante de hibridoma diluido 1:3 con PBS, se incubó dos horas a 37 ° C. Después de la incubación se lavó la placa cinco veces con PBS. Se adicionó un segundo anticuerpo acoplado a una enzima (peroxidasa de rábano) a una dilución 1:5000 con 100 µL PBS. Después de haber incubado dos horas a temperatura ambiente se lavó una vez más con PBS, como en los casos anteriores. Se agregaron 100 µL del sustrato cromogénico O-fenilendiamina (OPD) para hacer legible la reacción mediante el aumento de coloración y absorbancia a 490 nm en un lector automatizado de longitud de onda variable de ELISAs (Epoch) en los pozos con inmunoreacción positiva, es decir, aquellos pozos donde se llevó a cabo la unión de anticuerpos específicos de los sobrenadantes ensayados, al antígeno adsorbido a la fase sólida de la placa de poliestireno.

### **Expansión y conservación de los hibridomas positivos**

Aquellos hibridomas identificados como productores de anticuerpos potencialmente anti-morfina se expandieron a recipientes de mayor capacidad, bajo las condiciones de incubación ya mencionadas. Cuando los hibridomas se encontraban en placas de 6 pozos, se congelaron muestras de estos siguiendo

el método descrito por Hockfield y colaboradores (1993). Se desprendieron los hibridomas adheridos a la superficie del frasco de cultivo por pipeteo suave. Se homogeneizó la suspensión, se tomaron 0.5 mL de la misma y se procedió a contar las células siguiendo el método de Neubauer. Se preparó una suspensión que contenía  $1 \times 10^6$  células por mililitro. La suspensión se centrifugó a 400xg por 10 minutos, se desechó el sobrenadante, la pastilla se resuspendió en dimetil sulfóxido (DMSO) de tal forma que se mantuvo la concentración de  $1 \times 10^6$ . Se colocó 1 mL de la suspensión celular en crioviales (nuncR) y se congelaron a  $-80^{\circ}\text{C}$ .

#### **7.4. VALIDACIÓN DE LA AFINIDAD Y ESPECIFICIDAD DEL ANTICUERPO, PARA RECONOCER LA ESTRUCTURA MOLECULAR DE LA MORFINA**

**Validación inicial del MAb anti-morfina. ELISA competitivo, se utilizó el antígeno de adsorción morfina-6-hemisuccinato BSA con brazo espaciador para determinar la afinidad del MAb hacia los competidores en solución**

La validación inicial de hibridomas que generan anticuerpos monoclonales capaces de reconocer y unirse a los competidores en solución se llevó a cabo mediante un ensayo inmunoenzimático de ELISA competitivo descrito por Hockfield y colaboradores (1993). En este ensayo se utilizaron placas de poliestireno (NUNCTM) de 96 pozos, donde se adsorbieron 1  $\mu\text{g}$  del antígeno. Por otra parte en tres viales se dejaron reaccionar tres sustancias (competidores) diferentes: sulfato de morfina, morfina-6-hemisuccinato y morfina-6-hemisuccinato acoplada al brazo espaciador, con el sobrenadante de aquellas clonas que dieron resultados positivos en los ensayos de ELISA por captura de anticuerpo, la mezcla se mantuvo en agitación constante durante 24 horas. Se adicionaron 100  $\mu\text{L}$  de la mezcla anterior diluida 1:3 con PBS a la placa con el antígeno adsorbido. Se lavó 5 veces con PBS. Se adicionó el segundo anticuerpo diluido 1:5000 en 100  $\mu\text{L}$  PBS. Después de haber incubado dos horas a temperatura ambiente se lavó cinco veces más con PBS. Se agregaron 100  $\mu\text{L}$  del sustrato cromogénico O-fenilendiamina (OPD) para hacer legible la reacción mediante el aumento de coloración y absorbancia a 490 nm en un lector automatizado de longitud de onda variable de ELISAs (Epoch).

**Validación de la especificidad del MAb. ELISA competitivo, se utilizó el antígeno de adsorción morfina-6-hemisuccinato BSA sin brazo espaciador para determinar la especificidad del MAb hacia los competidores en solución**

La validación de la especificidad de los anticuerpos monoclonales para reconocer exclusivamente la morfina como epítipo inmunogénico a partir de sobrenadantes de hibridomas productores de anticuerpos monoclonales anti-morfina, se llevó a cabo mediante un ensayo inmunoenzimático estándar de ELISA competitivo descrito anteriormente, con la diferencia de que en este ensayo el antígeno adsorbido a la placa no incluye el brazo espaciador, solo consta de morfina-6-hemisuccinato BSA, el brazo espaciador se excluye de este ensayo para evitar falsos positivos, pues podría haber hibridomas que generen anticuerpos contra el brazo. Los competidores fueron los mismos.

## **7.5. EVALUACIONES COMPLEMENTARIAS**

**Pruebas de reacción cruzada del MAb hacia sustancias con actividad farmacológica homóloga a la morfina. ELISA competitivo en fase sólida para determinar la monoespecificidad del MAb hacia otros opiáceos que comparten el mismo epítipo inmunogénico**

Las pruebas de afinidad complementaria hacia otros opiáceos se llevaron a cabo de la misma manera que en el caso anterior, solo hubo variación respecto a los competidores utilizados para dicha determinación. El antígeno de adsorción empleado fue morfina-6-hemisuccinato BSA sin brazo espaciador.

**Perfil inmunológico del anticuerpo monoclonal. Ensayo de ELISA para determinar la clase y subclase del anticuerpo monoclonal**

Para la determinar la clase y subclase de la inmunoglobulina se utilizó un kit comercial de tipificación (Thermo SCIENTIFIC), El método utiliza el mismo procedimiento de un ELISA indirecto, mediante este kit es posible determinar la clase y subclase de anticuerpos presentes en los sobrenadantes de medios de cultivo. Como antígeno de adsorción se empleó 1 µg de morfina-6-hemisuccinato BSA sin brazo espaciador, diluido en 50 µL de buffer de

fosfatos. La fase sólida fueron placas de poliestireno de 96 pozos (NUNC™). Después de adsorber el antígeno, se adicionaron 125 µL de solución de bloqueo, se cubrió la placa y se dejó incubar a 37°C una hora. La placa se lavo cuatro veces con 125 µL de buffer de lavado. Se adicionar 50 µL de sobrenadante de medio de cultivo y se dejó incubar a 37°C 1 hora. La placa se lavo cuatro veces con 125 µL de buffer de lavado. Se adicionaron 50 µL de cada anticuerpo primario (incluidos en el kit) y se dejó incubar a 37°C 1 hora. La placa se lavo cuatro veces con 125 µL de buffer de lavado. Se adicionaron 50 µL del anticuerpo secundario acoplado a una enzima peroxidasa y se dejó incubar a 37°C. Se hicieron cuatro lavados con 125 µL de buffer de lavado. Se adicionaron 100 µL de sustrato enzimático a los pozos, se cubrieron las placas y se dejaron incubar a 37 °C. Las placas se leyeron a una longitud de onda de 490 nm en un lector automatizado de longitud de onda variable de ELISAs (Epoch).

## VIII. RESULTADOS

La vacunación con el inmunógeno morfina toxoide tetánico (M-TT), permitió inmunizar eficazmente un ratón BALB/ c del que se obtuvieron esplenocitos activados que fueron fusionados con células de mieloma Sp2/0 (de origen murino). Después de llevar a cabo los experimentos de fusión celular, selección y cultivo de los hibridomas formados, se obtuvieron 75 clonas diferentes, distribuidas en varias placas de fusión. A partir de aquellos pozos donde se detectó la presencia de poblaciones celulares, se colectaron 100 µl del medio de cultivo sobrenadante como muestras a ensayarse para la detección e identificación de los hibridomas productores de anticuerpos anti-morfina en inmunoensayos de ELISA de captura de anticuerpo y ELISA competitivo. Los inmunoensayos de captura de anticuerpo permitieron identificar 9 clonas con capacidad de sintetizar anticuerpos que potencialmente reconocían la morfina como epítipo inmunogénico. Posteriormente los sobrenadantes de cultivo de estas 9 clonas, fueron sometidos a pruebas de reactividad cruzada mediante ensayos de ELISA competitivo. Se determinó que de las 9 clonas, solo el hibridoma P5-G9 produce anticuerpos con características reconocimiento de complementariedad antigénica y unión hacia la morfina, heroína y los metabolitos de estas sustancias. Finalmente se determinó la clase y subclase de la inmunoglobulina, pudiendo definirse como un anticuerpo monoespecífico IgG1.

### **Selección del ratón que generó mayor cantidad de anticuerpos anti-morfina.**

Para tener mayores posibilidades de formar hibridomas con LB productores de anticuerpos monoclonales anti-morfina, se seleccionó el animal que presentó mayores títulos de anticuerpos. En la figura 7, se muestran los títulos séricos de anticuerpos anti-morfina en los siete animales inmunizados.

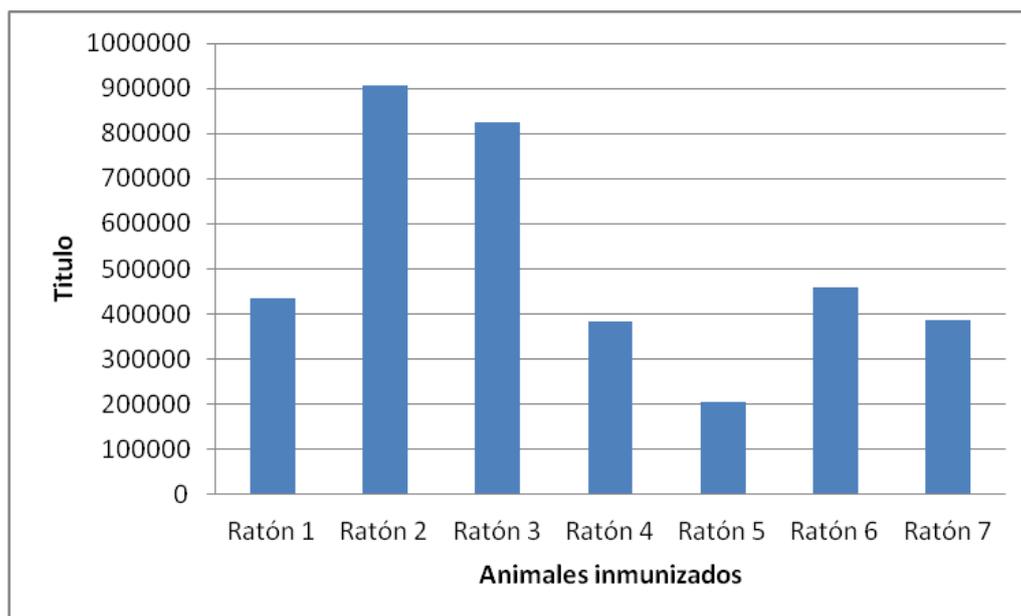


Figura 7. Títulos séricos de anticuerpos anti-morfina correspondientes al sexto sangrado. El gráfico permite comparar la cantidad de anticuerpos entre los siete animales, para seleccionar aquel con mayores títulos.

Como se aprecia en la figura 7, los ratones dos y tres presentan los mayores títulos de anticuerpos 1:800 000 y 1:900 000 respectivamente; sin embargo, se decidió emplear al animal número dos para el experimento de fusión celular.

### **Obtención e identificación de hibridomas que potencialmente sintetizan anticuerpos monoclonales contra la estructura molecular de la morfina.**

#### **ELISA de captura de anticuerpo**

Los sobrenadantes de cultivo de los hibridomas formados en las placas postfusión fueron inicialmente analizados para determinar cuáles sintetizaban anticuerpos con características de reconocimiento y unión hacia algún componente del antígeno de adsorción. Esta prueba se llevó a cabo mediante

ensayos de ELISA de captura de anticuerpo. En la figura 8, se muestran las 9 clonas identificadas como positivas. Cada alícuota de medio de cultivo sobrenadante fue ensayada a una dilución de 1:3, para demostrar la presencia de anticuerpos afines al inmunógeno M-TT se recurrió al uso de una proteína acarreadora diferente, albúmina sérica bovina (BSA), acoplada con el mismo brazo espaciador al mismo hapteno.

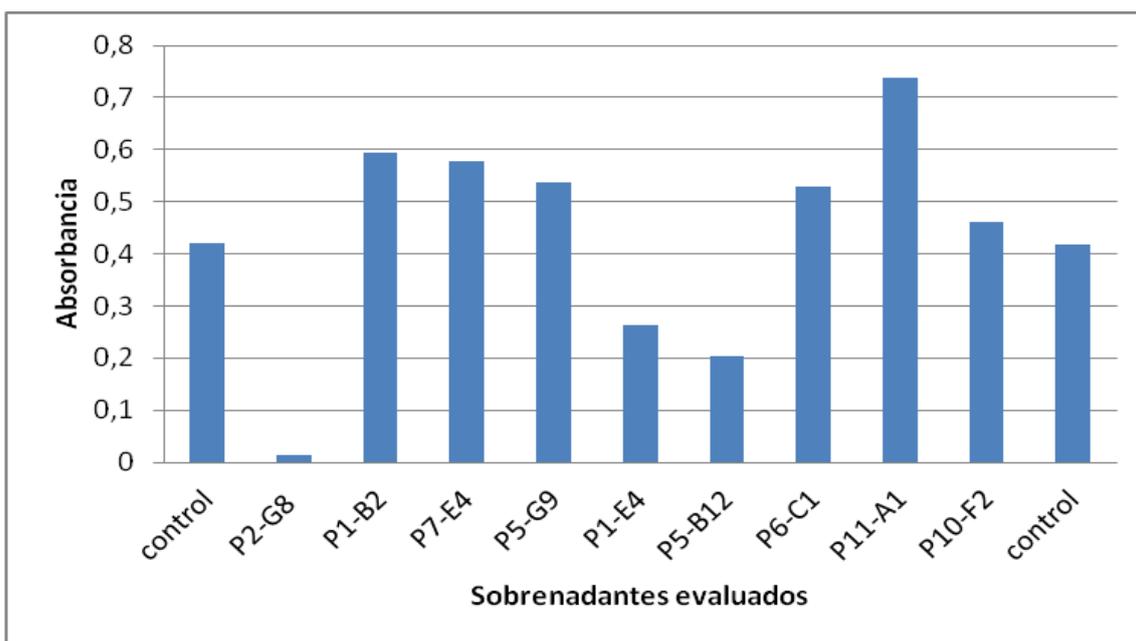


Figura 8. ELISA de captura de anticuerpo. Se muestran las lecturas a 490 nm de los sobrenadantes de cultivo evaluados, el control positivo es el anticuerpo Anti-Morphine-6 (QED Bioscience inc), el control negativo es la clona P2-G8.

### **Validación de afinidad y especificidad de los anticuerpos monoclonales anti-morfina. ELISA competitivo**

Las 8 líneas celulares identificadas como potenciales productoras de anticuerpos anti-morfina fueron subclonadas. El medio de cultivo sobrenadante de estas células fue ensayado para determinar si los anticuerpos sintetizados poseían características de afinidad y especificidad para reconocer y unirse únicamente a la morfina en ensayos de ELISA competitivo, utilizando como antígeno de adsorción a la fase sólida morfina-6-hemisuccinato BSA con brazo espaciador y morfina-6-hemisuccinato BSA sin brazo espaciador. Para realiza

esta determinación se emplearon tres competidores: morfina, morfina-6-hemisuccinato y morfina-6-hemisuccinato con brazo.

En el ensayo de competencia con brazo, los resultados presentados en la figura 9 indican que de las 8 clonas ensayadas solo el hibridoma P5-G9 sintetiza anticuerpos con afinidad hacia la morfina. En el caso de los demás sobrenadantes evaluados, se sugiere que su afinidad está dirigida hacia distintas regiones del antígeno adsorbido a la fase sólida.

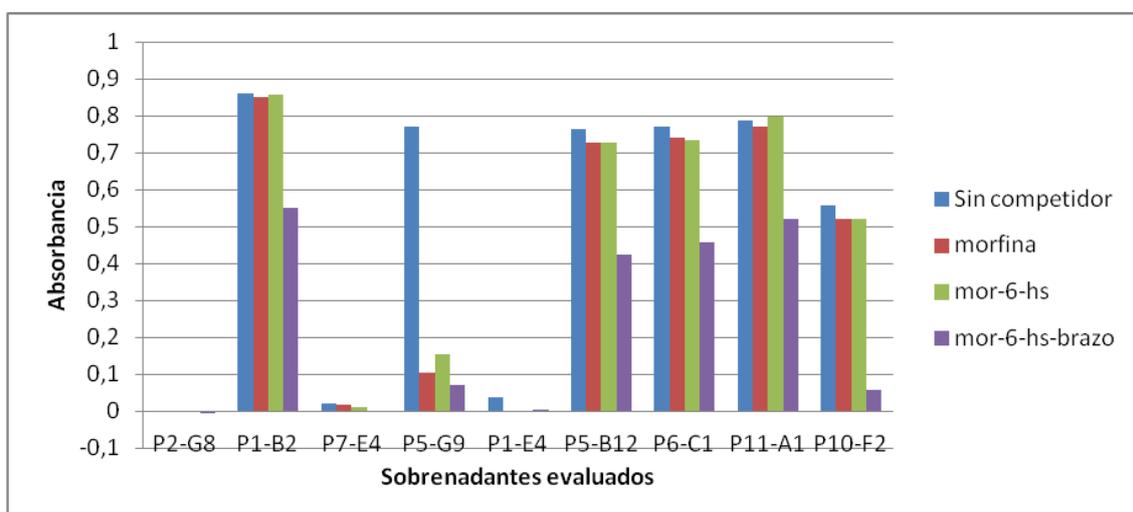


Figura 9. ELISA competitivo empleando como antígeno de adsorción a la fase sólida morfina-6-hemisuccinato BSA con brazo espaciador. Los anticuerpos presentes en los sobrenadantes se hicieron reaccionar con los competidores (morfina, morfina-6-hemisuccinato y morfina-6-hemisuccinato con brazo) y posteriormente con el antígeno adsorbido a la fase sólida de la placa de ensayo.

Después de hacer reaccionar los competidores con los anticuerpos de cada sobrenadante, cinco de los sobrenadantes no mostraron afinidad por alguno de los competidores en solución. Como lo indican las elevadas absorbancias en la figura 9, estos mismos anticuerpos: P1-B2, P5-B12, P6-C1, P11-A1 y P10-F2 mostraron alta afinidad por algún componente del antígeno de adsorción. En el caso de los sobrenadantes P7-E4 y P1-E4 la absorbancia es casi nula, lo que permite proponer que las anteriores lecturas de absorbancia de estas dos clonas (figura 8), corresponden a anticuerpos sintetizados por LB no fusionados, o bien a que la célula híbrida perdió la capacidad de sintetizar inmunoglobulinas potencialmente anti-morfina. Respecto a los anticuerpos de

la clona P5-G9 (figura 9), es claro que tienen afinidad por alguna región de los competidores. En lo referente al sobrenadante sin competidor (figuras 9 y 10), este se encuentra diluido (1:3), y bajo estas condiciones se adiciono a la placa que contiene el antígeno de adsorción, por esta razón se observa la máxima absorbancia, ya que no se forman inmunocomplejos con ningún competidor, únicamente con el antígeno de adsorción.

En la siguiente prueba de competencia (figura 10), se utilizó como antígeno de adsorción a la fase sólida morfina-6-hemisuccinato BSA sin brazo espaciador, y los mismos competidores que en el ensayo anterior. Los resultados indican que de los 8 sobrenadantes de cultivo evaluados, únicamente los anticuerpos sintetizados por el hibridoma P5-G9 muestran propiedades de especificidad de reconocimiento inmunológico hacia la morfina.

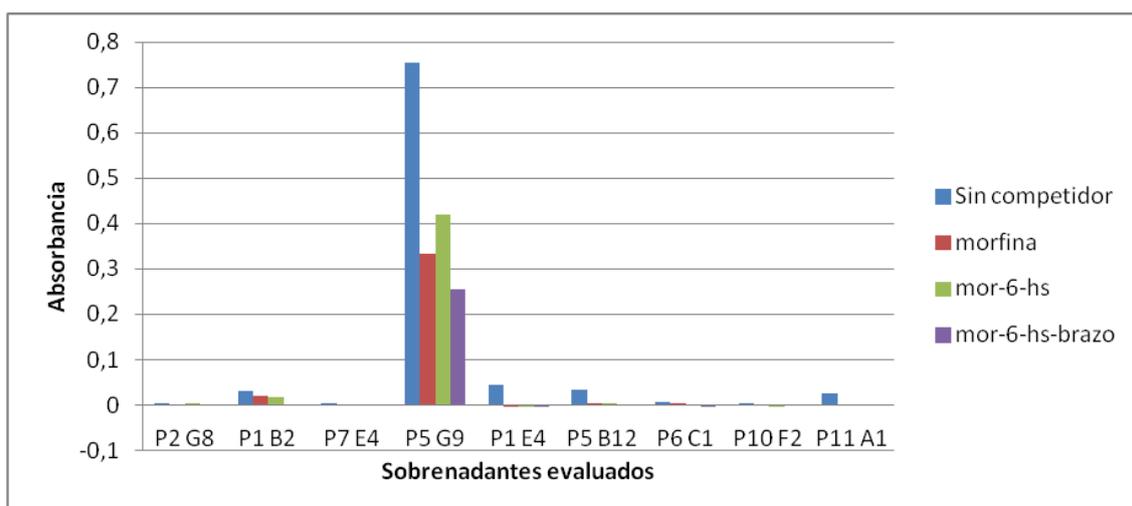


Figura 10. ELISA competitivo utilizando como antígeno de adsorción a la fase solida morfina-6-hemisuccinato BSA sin brazo espaciador. Las señales que se aprecian indican el reconocimiento inmunológico de los anticuerpos hacia algún epitope del antígeno de adsorción. mor-6-HS: morfina-6-hemisuccinato, Mor-6-HS-B: morfina-6-hemisuccinato con brazo espaciador.

En la figura 10 se distingue que solamente el sobrenadante del cultivo del hibridoma P5-G9 mostró resultados positivos; al utilizar un antígeno de adsorción que no incluye brazo espaciador, es posible determinar que el reconocimiento de complementariedad antigénica de estos anticuerpos está

dirigido hacia una estructura común entre los competidores y el antígeno de adsorción. Los resultados obtenidos en ambas pruebas demuestran que solamente el hibridoma P5-G9 sintetiza anticuerpos monoclonales con características de afinidad y especificidad únicas que le permiten reconocer y unirse selectivamente a la morfina. En este sentido es factible proponer que el reconocimiento de complementariedad antigénica de este anticuerpo está dirigido hacia la morfina que es el hapteno estructural del complejo M-TT.

Las evidencias de afinidad y especificidad del anticuerpo P5-G9 por la morfina permitieron proponer ensayos de reactividad cruzada, para evaluar la posible afinidad del anticuerpo hacia otros opiáceos y sus metabolitos, que poseen analogía estructural a la morfina; así mismo estas pruebas tendrían la utilidad de demostrar o rechazar la posibilidad de reactividad cruzada con antagonistas de los opioides como la metadona.

**Pruebas de reactividad cruzada del anticuerpo monoclonal hacia sustancias con actividad farmacológica homóloga a la morfina. Ensayo de ELISA competitivo para determinar afinidad del anticuerpo monoclonal hacia otros opiáceos y sus metabolitos**

En las pruebas de reactividad cruzada se evalúa la capacidad del anticuerpo para reaccionar con determinantes antigénicos iguales o similares en otras moléculas.

Las evaluaciones de reactividad cruzada de los anticuerpos secretados por el hibridoma P5-G9 fueron realizadas mediante ensayos de ELISA competitivo, utilizando como antígeno de adsorción a la fase sólida morfina-6-hemisuccinato BSA sin brazo espaciador. Los resultados de esta prueba indican que el anticuerpo no solo tiene afinidad por los compuestos con morfina, sino que también es afín a la heroína y su metabolito 6-monoacetilmorfina. En el caso del competidor metadona, no existe reconocimiento por parte del anticuerpo, independientemente de su concentración.

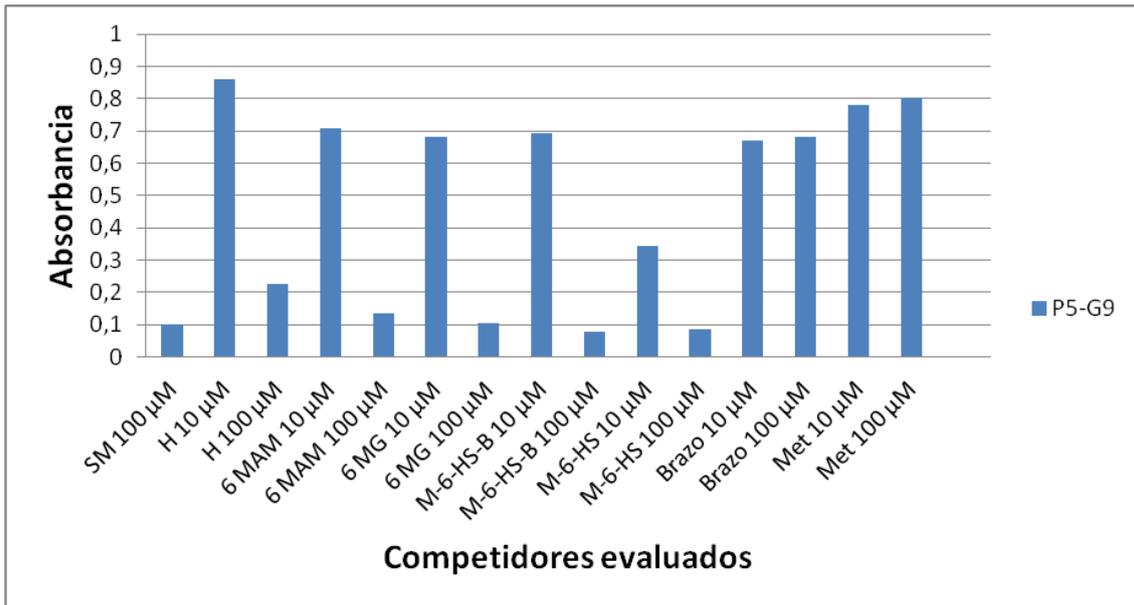


Figura 11. Afinidad complementaria. Inmunoensayo de ELISA competitivo utilizando como antígeno de adsorción morfina-6-hemisuccinato BSA sin brazo espaciador. Se muestra la afinidad complementaria del anticuerpo P5-G9 hacia los competidores: Sulfato de morfina (SM), Heroína (H), 6-Monoacetilmorfina (6-MAM) y morfina-6-gucurónido (6-GM).

En la figura 11, se puede distinguir que a menor concentración de competidor hay mayor lectura de absorbancia y viceversa, esto, ocurre porque al utilizar una concentración de 10 μM queda una elevada cantidad de anticuerpo sin reaccionar con los competidores, estos anticuerpos finalmente se unen a la morfina presente en antígeno de adsorción a la fase sólida.

Los resultados de reconocimiento complementario (afinidad) del anticuerpo hacia otras sustancias que presentan analogía estructural y farmacológica a la morfina se muestran en la figura 11, estos confirman que los anticuerpos monoclonales sintetizados por el hibridoma P5-G9 reconocen y se unen de forma selectiva y específica a un epítipo estructural que es común a la morfina y las otras sustancias empleadas como competidores. Nótese que no se detectó la formación de inmunocomplejos con la metadona ni con el brazo espaciador.

Para poder comparar cuantitativamente la afinidad y especificidad del anticuerpo P5-G9 por la morfina y sus análogos estructurales, fue necesario construir curvas estándar que permitieran calcular la concentración inhibitoria 50 y el porcentaje de reactividad cruzada.

### Concentración inhibitoria 50 (IC50) y porcentaje de reactividad cruzada

A partir de las curvas estándar que se muestran en la figura 12, fue posible obtener valores numéricos de concentración inhibitoria 50 y porcentaje de reactividad cruzada, que son de utilidad para comparar las propiedades de afinidad y especificidad de el anticuerpo P5-G9 por la morfina y sus análogos estructurales evaluados. Los resultados de estas determinaciones se obtuvieron con el software Origin 6.1.

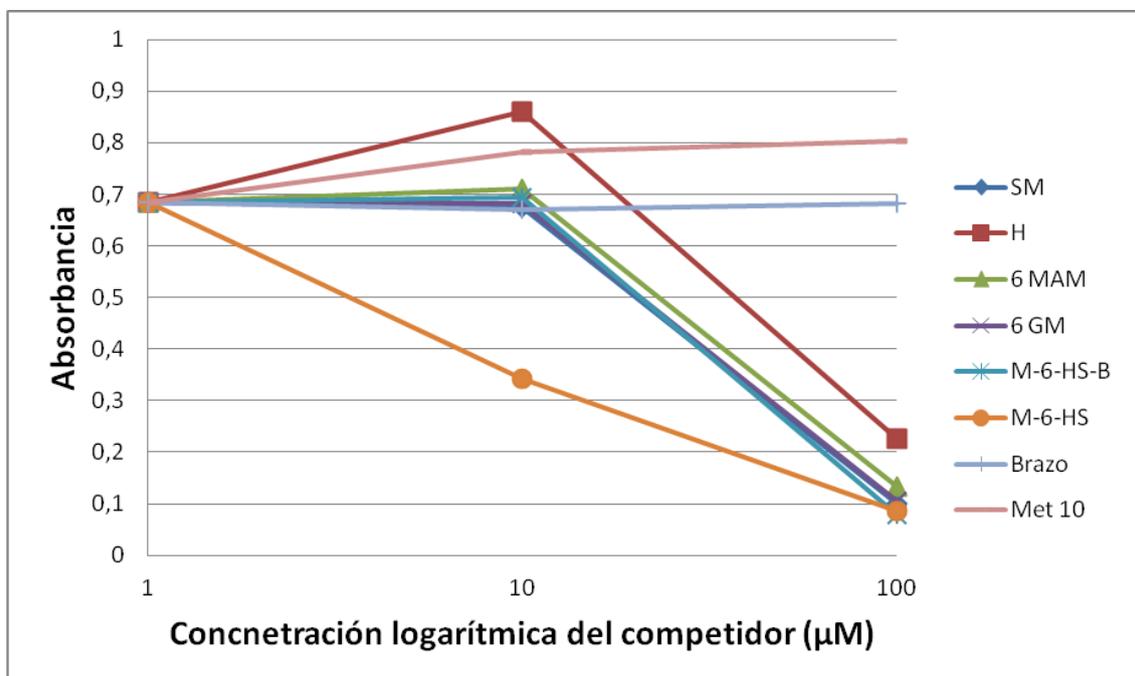


Figura 12. Curvas estándar. ELISA competitivo utilizando como antígeno de adsorción morfina-6-hemisuccinato BSA sin brazo espaciador. Se aprecia la afinidad del anticuerpo por los competidores: Sulfato de morfina (SM), Heroína (H), 6-Monoacetilmorfina (6-MAM), morfina-6-glucurónodo (6-GM, )morfina-6-hemisuccinato con brazo espaciador (M-6-HS-B) y morfina-6-hemisuccinato (M-6-HS). Del mismo modo se aprecia que el anticuerpo no posee afinidad por la metadona (Met) ni por el Brazo espaciador (B).

En la tabla No.1, se muestran los valores de IC50 y el porcentaje de reactividad cruzada del anticuerpo por los diferentes competidores, en ambas determinaciones se consideró la concentración relativa del sulfato de morfina como punto de referencia para las comparaciones que se hacen. Es evidente

que no hay reacción entre el anticuerpo P5-G9 y los competidores metadona y brazo espaciador, en contraste con el elevado porcentaje de reconocimiento de la inmunoglobulina por la morfina, heroína y los metabolitos de estas dos sustancias morfina-6-glucurónido y 6-monoacetilmorfina, respectivamente.

Tabla No.1. Concentración inhibitoria 50 y porcentaje de reconocimiento cruzado del anticuerpo monoclonal P5-G9

Competidor	SM	M-6-HS	B	H	6 MAM	6 GM	MET
IC50 ( $\mu\text{M}$ )	4.5	8		40	23	22	
% de reactividad cruzada	100	100	0	100	100	100	0

SM: Sulfato de morfina, M-6-HS: Morfina 6 hemisuccinato, B: Brazo espaciador, H: Heroína, 6 MAM: 6-Monoacetilmorfina, 6 GM: morfina-6-glucurónido, MET: Metadona, IC50: Concentración inhibitoria 50,

En la tabla No.1, se exponen los valores de IC50, es decir, las concentraciones a las cuales cada competidor causa el 50% de inhibición de unión del anticuerpo al antígeno de adsorción (morfina-6-hemisuccinato BSA), un menor valor de IC50 indica mayor afinidad del anticuerpo por el competidor, considerando este hecho, las sustancias por las que el anticuerpo presenta mayor afinidad son, en orden decreciente: Sulfato de morfina, morfina-6-hemisuccinato, morfina-6-glucurónido, 6-monoacetilmorfina y heroína.

En la determinación de reactividad cruzada se evaluó la especificidad del anticuerpo hacia los competidores señalados en la tabla No.1, la respuesta expresada en porcentaje es del 100 % para todos los análogos de la morfina, este porcentaje representa el reconocimiento específico de complementariedad antigénica del anticuerpo por un solo epítipo estructural presente en la morfina y sus análogos estructurales. Como era de esperarse, en los competidores metadona y brazo espaciador no se detectaron lecturas de absorbancia que sugieran algún porcentaje de reactividad cruzada.

### Determinación del perfil inmunológico del anticuerpo monoclonal

Como complemento a las pruebas anteriores se determinó el perfil inmunológico de la inmunoglobulina mediante un kit de tipificación comercial, los resultados (Figura 13) demuestran que se trata de una inmunoglobulina monomérica de la clase G y de subclase  $\gamma 1$ , es decir IgG1.

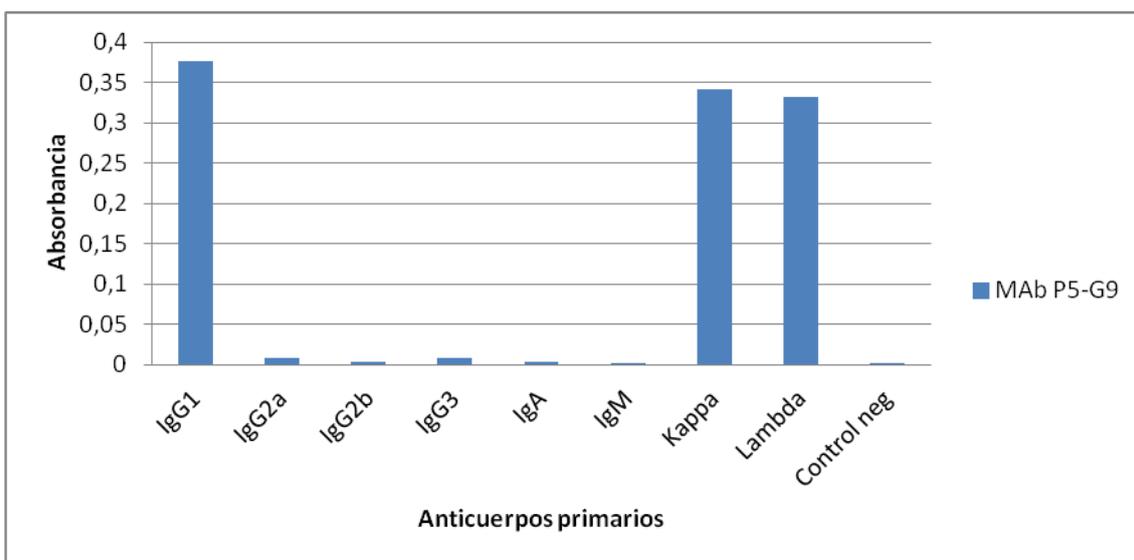


Figura 13. Determinación de la clase y subclase del anticuerpo mono específico P5-G9. Se distinguen las lecturas a 490 nm que determinan el perfil inmunológico del anticuerpo.

La clase y subclase de un anticuerpo es probablemente una de las características más importantes de estas moléculas, pues: a) de ello dependen sus propiedades efectoras, b) la correcta identificación permite elegir un método adecuado de purificación, c) la identificación de una sola subclase provee evidencias que garantizan la monoclonalidad de la célula híbrida. En la figura 12, se puede observar que el reconocimiento por la región Fc del anticuerpo mono específico P5-G9 se logra con el anticuerpo anti-Fc de ratón que reconoce específicamente la cadena pesada  $\gamma 1$ . La naturaleza de la cadena ligera no se puede determinar con los anticuerpos del kit de tipificación, ya que el reconocimiento de estos anticuerpos no es específico para la cadena  $\kappa$  o  $\lambda$ , este hecho explica que en la figura 12 aparezcan valores

de absorbancia prácticamente iguales para ambas cadenas; no obstante, considerando el proceso de exclusión alélica, se propone que la cadena ligera sea kappa.

Contar con un anticuerpo monoespecífico de la variedad IgG1 es un recurso muy valioso, desde el punto de vista inmunológico, por las propiedades de esta variedad de inmunoglobulinas, entre estas destacan: a) conforman la variedad plasmática más abundante de inmunoglobulinas, b) peso molecular aproximado de 156 KDa, c) tiempo de vida media de 21 días c) su Fc es reconocido por receptores de monocitos y neutrófilos, es decir, facilita la fagocitosis e) son capaces de cruzar activamente membranas biológicas, entre otras la placenta f) activan el sistema del complemento (Abbas *et al*, 2007 y Janeway *et al*, 2001).

## IX. DISCUSION

En este trabajo se logró generar y estabilizar el hibridoma murino P5-G9 que de acuerdo a las evaluaciones realizadas, posee la cualidad de sintetizar anticuerpos monoespecíficos cuya especificidad se propone, está dirigida hacia el núcleo fenantrénico de los opiáceos. Este anticuerpo no muestra afinidad por la metadona, por el contrario, presenta características interesantes de afinidad por la heroína, morfina y sus metabolitos: 6-monoacetilmorfina, morfina y morfina-6-glucurónido.

El principal desafío de este trabajo después sintetizar el conjugado inmunogénico M-TT, fue lograr fusionar los mielomas con LB productores de anticuerpos anti-morfina, pues como se explica en la metodología, para el experimento de fusión celular se utilizaron todas las células del bazo, esto implica la presencia de muchas poblaciones celulares como son: células del tejido conjuntivo, macrófagos, LT, LB no productores de Ab, células dendríticas y LB productores de Ab con afinidad y especificidad variables contra diversos antígenos a los que se haya enfrentado el animal, entre ellos el complejo inmunogénico M-TT. Considerando estas observaciones, la probabilidad de fusionar mielomas con LB productores de anticuerpos IgG1 anti-morfina, es extremadamente remota.

Después de fusionar las células, hubo que esperar a que los hibridomas se estabilizaran y comenzaran a dividirse. Esta etapa de la experimentación también fue regida por el azar, pues durante este periodo se lleva a cabo la segregación de cromosomas de la célula progenitora a las células hijas. Es en este preciso momento cuando se heredan los genes para sintetizar anticuerpos anti-morfina y aquellos que codifican para la enzima HGPRT que le permite a las células sobrevivir en el medio selectivo, dos requisitos sin los que este trabajo no hubiera sido posible.

El siguiente reto fue mantener y llevar los hibridomas recién formados de las placas de fusión a otros recipientes de mayor capacidad, con el riesgo constante de perderlos durante la manipulación o a causa de algún microorganismo contaminante (bacteria y hongos, principalmente). Esta etapa de expansión fue la parte más extenuante y cuidadosa del trabajo, pues el pase de una placa a otra con pozos de mayor capacidad, siempre representó incertidumbre, ya que no sabíamos si las clonas se adaptarían o no al nuevo

soporte. Y como ya se ha mencionado, en cada pase y cada vez que se hacían cambios de medio de cultivo estaba presente el riesgo de contaminación microbiana.

### **Selección de hibridomas**

A causa de la respuesta inmune policlonal, era de esperarse que en los sobrenadantes de cultivo de los hibridomas formados hubiera Ab contra determinantes antigénicos del toxoide tetánico, el brazo espaciador y la morfina. Tomando en cuenta lo anterior, la interacción del sobrenadante de cultivo con el antígeno de adsorción conduciría a la formación de inmunocomplejos contra el toxoide tetánico, el brazo espaciador y contra la morfina.

Para demostrar la presencia de anticuerpos con afinidad por el inmunógeno M-TT, fue necesario sintetizar un compuesto heterólogo donde se sustituyó el toxoide tetánico por la proteína BSA, este fue utilizado como antígeno de adsorción a la placa de 96 pozos, de esta forma se evitó la formación de inmunocomplejos con el toxoide tetánico.

En la figura 8, se muestra el primer ensayo al que fueron sometidas las clonas, las absorbancias indican que en ocho de los sobrenadantes evaluados hay Ab que forman inmunocomplejos con el brazo espaciador, con la morfina o con ambos. Se utilizó como control negativo la clona P2-G8.

### **Afinidad y especificidad de los anticuerpos**

Para realizar estas pruebas se utilizó el mismo compuesto heterólogo que en la prueba anterior y uno más, este último sin brazo espaciador. En las figuras 9 y 10 se tomó como punto de referencia la absorbancia del sobrenadante diluido (1:3) de cada clona para comparar si los anticuerpos de los hibridomas evaluados formaban inmunocomplejos con los competidores (morfina, morfina-6-hemisuccinato y morfina-6-hemisuccinato con brazo espaciador). En la figura 9, donde se utilizó como antígeno de adsorción morfina-6-hemisuccinato BSA con brazo espaciador, las débiles señales de absorbancia de la clona P5-G9 demuestran que sólo estos anticuerpos formaron inmunocomplejos con los tres competidores, donde el elemento estructural común es la morfina; también se observa que hubo reconocimiento inmunológico con el antígeno de adsorción (que también contienen morfina), quizás por un exceso de anticuerpos libres

que no formaron inmunocomplejos con los tres competidores. La evidencia permite proponer que estos anticuerpos tienen afinidad por la morfina. Por el contrario las elevadas señales de absorbancia del resto de las clonas evaluadas mostraron que sus anticuerpos no formaron inmunocomplejos con los competidores morfina y morfina-6-hemisuccinato; sin embargo al observar la absorbancia del competidor morfina-6-hemisuccinato con brazo espaciador, notamos que fue significativamente menor que la registrada para los otros 2 competidores, lo que nos llevó a proponer que las clonas P1-B2, P5-B12, P6-C1, P11-A1 y P10-F2 sintetizan anticuerpos cuya afinidad esta dirigida hacia el brazo espaciador del competidor y del antígeno de adsorción.

En la figura 10, donde se emplea como antígeno de adsorción morfina-6-hemisuccinato BSA sin brazo espaciador, corroboramos que las clonas P1-B2, P5-B12, P6-C1, P11-A1 y P10-F2 sintetizan anticuerpos contra el brazo espaciador, pues en este ensayo donde se suprime el brazo, son mínimas las señales de absorbancia que pudieran sugerir la formación de inmunocomplejos con este elemento, esto se puede comprobar incluso en la muestra de sobrenadante diluido 1:3, a la que no se le adicionó competidor alguno. En lo referente a la clona P5-G9, se consideró la absorbancia del sobrenadante diluido 1:3 como referente de la formación de inmunocomplejos con el antígeno de adsorción, las otras absorbancias se justifican por la presencia de un exceso de anticuerpos libres que no formaron inmunocomplejos con los competidores y terminaron uniéndose al hapteno del antígeno de adsorción. En este caso se confirma la afinidad y especificidad de los anticuerpos P5-G9 por la molécula de la morfina.

### **Pruebas de reactividad cruzada (afinidad complementaria)**

Esta prueba se hizo con el objetivo de determinar si los anticuerpos sintetizados por la clona P5-G9 poseían cualidades para reconocer otros opiáceos análogos estructurales de la morfina. Las absorbancias representadas en la figura 11, indican que estos anticuerpos fueron capaces de formar inmunocomplejos con el sulfato de morfina, heroína, 6-monoacetil morfina y morfina-6-glucurónido, esto se demuestra con las débiles absorbancias mostradas cuando se utiliza una concentración de 100  $\mu$ M de competidor, formándose una gran cantidad de inmunocomplejos y quedando

libre una pequeña fracción de anticuerpos libres que se unen al antígeno de adsorción. Las diferencias estructurales con la morfina se encuentran en los grupos sustituyentes de las posiciones 3 y 6 del núcleo fenantrénico de los opiáceos (ver figura 1).

También se evaluó la posibilidad de reconocimiento de estos anticuerpos por la metadona, opioide sintético utilizado en el tratamiento de la adicción a opiáceos, los resultados (Figura 11) mostraron que independientemente de la concentración usada de metadona, esta no formó inmunocomplejos con el anticuerpo P5-G9, sino que, todo el anticuerpo que se encontraba libre al no unirse a la metadona, se unió al antígeno de adsorción cuyo hapteno es la morfina. Lo mismo ocurrió cuando se usó el brazo espaciador como competidor, no hubo formación de inmunocomplejos. En el caso de estos dos competidores (metadona y brazo), al no ser análogos estructurales de la morfina, no hay posibilidad alguna de reconocimiento por complementariedad antigénica.

#### **IC50 y porcentaje de reactividad cruzada**

Los resultados de esta prueba demuestran numéricamente la existencia o ausencia de reconocimiento por complementariedad antigénica del anticuerpo P5-G9 por los competidores que han sido evaluados y una vez más se ha demostrado<sup>2</sup> que el anticuerpo sujeto de estudio solo reconoce y se une a la morfina y sus análogos estructurales, en este punto podemos decir que dicho reconocimiento se hace con afinidad variable y especificidad del 100%, en las curvas estándar de la figura 12, se puede apreciar visualmente la afinidad del anticuerpo por cada una de las sustancias empleadas como competidores y en la tabla No.1, se encuentran los valores numéricos de dicha evaluación. En la misma tabla se muestran los porcentajes de reactividad cruzada, que hacen referencia a la especificidad del anticuerpo por el núcleo fenantrénico de los opiáceos.

## Perfil inmunológico

Los resultados son contundentes (figura 13), las absorbancias nos indican que el anticuerpo P5-G9 es una inmunoglobulina IgG1, para esta determinación se utilizaron 5 anticuerpos (anti-IgG1, anti-IgG2a, anti-IgG2b, anti-IgG3, anti-IgA y anti-IgM) de conejo específicos contra la fracción Fc (cadenas pesadas) de los anticuerpos murinos P5-G9. El anticuerpo de conejo específico anti-IgG1 contra el Fc murino fue el único en reconocer y formar inmunocomplejos con el anticuerpo murino P5-G9, después se adicionó el anticuerpo secundario conjugado a una enzima peroxidasa y subsecuentemente el sustrato enzimática, la señal generada por esta reacción se midió con ayuda del espectrofotómetro, como se muestra en la figura 13, el anti-IgG1 fue el único anticuerpo que generó señales de absorbancia que no dejan lugar a dudas sobre la naturaleza del anticuerpo P5-G9.

Considerando los reordenamientos génicos de las inmunoglobulinas, brevemente se explica por que se propone que el anticuerpo P5-G9 sea de cadena ligera  $\kappa$ . Durante la ontogenia del LB, la primer proteína de cadena pesada ( $\mu$  o  $\delta$ ) producida por el reordenamiento de un alelo, inhibe irreversiblemente el reordenamiento del otro alelo, este evento se denomina exclusión alélica de cadenas pesadas. La producción de una proteína de cadena pesada en la célula pre-B estimula el reordenamiento de genes de la cadena ligera. Se cree que el reordenamiento de estos genes ocurre primero en el locus  $\kappa$ , si este es productivo y da lugar a la proteína  $\kappa$ , se bloquea el reordenamiento del alelo de la cadena ligera  $\lambda$ . Al igual que en las cadenas pesadas, si un alelo experimenta un reordenamiento no funcional, la recombinación del DNA puede ocurrir en otro alelo (Abass et al, 2007). Se ha considerado que esto mismo ocurrió con el anticuerpo P5-G9.

El proceso de maduración de afinidad permite justificar las propiedades efectoras (de cadena pesada en el Fc) del anticuerpo P5-G9. Una vez que se inmunizó al animal con el conjugado inmunogénico M-TT se indujo la respuesta inmune, al haber disminuido la concentración de antígeno en el organismo del animal, solamente aquellas células (LB) cuyos receptores de membrana (IgD e IgM) experimentaron reordenamientos genéticos en la región variable, conocidos como hipermutación somática, fueron activadas y seleccionadas preferencialmente para proliferar y convertirse en LB de memoria y células

plasmáticas productoras de anticuerpos de alta afinidad. Posteriormente la recombinación del DNA habilitó la secuencia codificante de la región variable para ser usada en combinación con otros genes que codifican para la región constante de las cadenas pesadas, este fenómeno es conocido como cambio de isotipo, y se produce por recombinación genética dentro de un grupo de genes donde se corta el gen de la cadena pesada expresado previamente (IgD o IgM) y se adosa un gen que codifica para otra cadena pesada (IgG, IgE o IgA), dando lugar anticuerpos de diferente clase, en el caso del anticuerpo P5-G9, el cambio de isotipo generó una IgG1, esto quiere decir que el gen de la cadena pesada adosado durante el cambio de isotipo codificó para la proteína  $\gamma$ , el número 1 indica que es la variedad de IgG más abundante en suero (Abass *et al*, 2007).

Trabajos hechos con anterioridad por otros grupos de investigación Glasel *et al* (1983), Sawada *et al* (1988), Usagawa *et al* (1993), Rahbarizadeh *et al* (2000), reportan la obtención de anticuerpos monoclonales anti-morfina; sin embargo, en los trabajos citados anteriormente también se menciona que tales anticuerpos monoclonales presentan reactividad cruzada con fármacos como naloxona, naltrexona y metadona, que se emplean en el tratamiento contra la adicción a opiáceos, lo que limita su uso en cualquier área donde puedan encontrarse las sustancias mencionadas. En 2005, LI *et al*, reportaron la obtención anticuerpos monoclonales anti-morfina que muestran mayor afinidad por la heroína en comparación con morfina y codeína.

Considerando los resultados obtenidos a partir de las pruebas realizadas a los anticuerpos producidos por el hibridoma P5-G9 y las características estructurales de los competidores evaluados, es factible proponer que el epítipo de reconocimiento por complementariedad antigénica común en los competidores es el anillo fenantrénico y la región que presenta el nitrógeno terciario metilado. Basándose en esta propuesta, entonces, el anticuerpo P5-G9 sería un anticuerpo monoespecífico para un solo epítipo, el anillo fenantrénico y la región que presenta el nitrógeno terciario metilado presente en la molécula de la morfina y sus análogos que posean esta característica estructural, basándose en estas consideraciones se asume que el anticuerpo

presentará elevada afinidad y especificidad por cualquier opiáceo que presente el epítipo antes mencionado (Ver figura 1).

El anticuerpo obtenido puede ser utilizado como método de detección de opiáceos en el área de la toxicología y como reactivo en diversas áreas de investigación; no obstante, el objetivo fundamental de este trabajo ha sido la obtención de un hibridoma productor de anticuerpos monoclonales anti-morfina que representen una alternativa terapéutica en el tratamiento de la adicción a opiáceos; para conseguir esta meta hace falta llevar a cabo estudios de inmunoprotección en animales que permitan determinar si estos anticuerpos son aptos para utilizarlos como terapéuticos. Si se demuestra su utilidad en este sentido, entonces se pensará en codificarlos genéticamente, humanizarlos y producirlos a mayor escala, para darles usarlos clínicamente en humanos.

## X. CONCLUSIONES

- ❖ Se logró obtener un hibridoma productor de anticuerpos monoclonales de origen murino que reconocen la molécula de la morfina como blanco. El hibridoma P5-G9 se obtuvo fusionando “*in vitro*” mielomas Sp2/0 y linfocitos B activados procedentes de un ratón BALB/c inmunizado con la vacuna MTT, la identificación del hibridoma productor de anticuerpos monoclonales al igual que las propiedades de estas proteínas, fueron determinados mediante ensayos inmunoenzimáticos de ELISA.
- ❖ Se consiguió la estandarización de condiciones adecuadas de cultivo, protocolos de asepsia y procedimientos técnicos.
- ❖ El cultivo de mielomas se realizó adecuadamente, ya que se obtuvo un número adecuado de estas células para el experimento de fusión celular.
- ❖ Los inmunoensayos de ELISA permitieron identificar eficazmente al hibridoma P5-G9 como productor de anticuerpos monoclonales anti-morfina.
- ❖ Se logró obtener, mantener y criopreservar el hibridoma P5-G9.
- ❖ Las determinaciones de afinidad y especificidad a las que se sometió el anticuerpo monoclonal P5-G9 han permitido proponer que se obtuvo un anticuerpo monoclonal anti-morfina capaz de reconocer y unirse con afinidad variable y de manera específica a la morfina, heroína y los metabolitos de estas sustancias.
- ❖ Se consiguió determinar la clase y subclase del anticuerpo P5-G9, definiéndose como una IgG1.

## XI. REFERENCIAS

- Abbas Abul K, Lichtman Andrew H, Pillal Shiv. 2007. Cellular and molecular immunology. 6<sup>th</sup> edition. ELSEVIER. China.
- Antón B, Salazar A, Flores A, Matus M, Marin R, Hernández JA, Leff F. (2009). Vaccines against morphine/heroin and its use as effective medication for preventing relapse to opiate addictive behaviors. ***Human Vaccines & Immunotherapeutics*, 5**: 214-229.
- Arnáiz Villena Antonio, J-R Regueiro, Carlos López Larrea. 1995. Inmunología. Editorial Complutense. Madrid.
- Bartal H. Ariel, Hirshaut Yashar. 1078. Methods of Hybridoma formation. The Humana Press Inc. United States of America.
- Bonse KF, Wainer BH, Fitch FW, Rothberg RM, Shuster CR. (1974). Changes in heroin self-administration by a feshus monkey after morphine immunization. ***Nature*, 252**: 708-710
- Carrera MR, Ashley JA, Zhou B, Wirsching P, Koob GF, Janda KD. (2000). Cocaine vaccines: Antibody protection against relapse in a rat model. ***Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97**: 6202–6206.
- Cerny HE, Cerny T. (2009). Vaccines against nicotine. ***Human Vaccines*, 5**: 200-205.
- Duarte Freire Danilo. (2005) Uma breve história do ópio e dos opióides. ***Revista Brasileira de Anestesiologi*, 55**: 135-146.
- Esteva de Sagrera Juan. (2005). El opio *De la farmacopea a la prohibición*. ***Revista de la oficina de farmacia*, 24**: 97-110.
- Florez Jesús. 1997. Farmacología humana. Tercera edición. Masson. Barcelona. España.
- Gavériaux-Ruff C, Matthes H, Peluso J, Kieffer B. (1988). Abolition of morphine-immunosuppression in mice lacking the  $\mu$ -opioid receptor gene. ***Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95**: 6326-6330.
- Gentry WB, Daniela Rüedi-Bettschen D, Owens SM.(2009). Development of Active and Passive Human Vaccines to Treat Methamphetamine Addiction. ***Hum Human Vacines*, 5**: 206–213.
- George Andrew JT, Urch Catherine E. 2000. Diagnostic and therapeutic antibodies. Humana Press. Totowa, New Jersey.

- Glasel JA, Bradbury WM, Venn RF. (1983). Properties of murine anti-morphine antibodies. *Molecular Immunology*, **20**: 1419-1422
- Goodman Gilman Alfred. 1996. Las bases farmacológicas de la terapéutica. Novena edición. Volumen uno. México.
- Harlow Edward, Lane David. 1998. Antibodies: a laboratory manual. Harbor Laboratory Press. United States of America.
- Hidalgo Dowing Eduardo. 2007. Heroína. Amargord. Madrid, España.  
URL:<http://books.google.es/books?id=zL0uFCgFU8UC&pg=PA30&lpg=PA30&dq=heinrich+dresser++heroína&source=bl&ots=sCXgW8FO7w&sig=f30lpuD1HUGGX5sZaeqx4GdL8Mc&hl=es&sa=X&ei=gug1T56hL-KRsALF6KmgAg&ved=0CF0Q6AEwCA#v=onepage&q=heinrich%20dresser%20%20heroína&f=false>
- Hockfield S., Carlson S., Evans C., Levitt R., Pintar J., Silberstein L. (1993). Molecular probes of the nervous system/ Volume 1. Selected methods for antibody and nucleic acid probes. Cold spring harbor laboratory press. United States of America.
- Janda KD, Meijler M, Matsushita M, Wirsching P. (2004). Development of Immunopharmacotherapy Against Drugs of Abuse. *Current Drug Discovery Technologies*, **1**: 77-89.
- Janeway Charles A Travers Paul, Walport Mark, Shlomchik Mark J. 2001. Immunobiology: the immune system in health and disease. 5th ed. Garland Publishing. United States of America.
- Kalant Harold, Walter H.E. Roschalud. 2002. Principios de farmacología médica. Sexta edición. Oxford México. México.
- Kaur J, Babyal DK., Khosla PP. (2007). Monoclonal antibodies: Pharmacological relevance. *Indian Journal of Pharmacology*, **39**: 5-14.
- Kohler G. Milstein C. 1975. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature*, **256**: 495-497.
- Kubly Janis, Kind Thomas J, Goldsby Richard A, Barbara Osborne Anne. 2007. Immunology. Sixth edition. Freeman and Company. United States of America.
- Li Lin, Liu Jie, Zhu Ping, Xu Jiang-pin, Fu Ning. 2005. Preparation anti-morphine monoclonal antibodies with complete cross reactivity with heroin. *Academic Journal of the First Medical College of PLA*, **25**: 833-836.

- Litter Manuel. 1992. Compendio de farmacología. Cuarta edición. EL ATENEO. Impreso en la Argentina.
- Lugo–Chillida AM, Renaud FL. (2002). IMMUNOSUPPRESSION IN DRUG ADDICTS: Cellular basis of withdraw effects in morphine tolerant macrophages. *FOCUS*, **1**: 5-14.
- Medina-Mora ME., Rojas E. (2003) La demanda de drogas: México en la perspectiva internacional. *Salud Mental*, **26**: 1-11
- Méndez M, Ruiz AE, Prieto B, Romano A. S Caynas S, Próspero O. (2010). El cerebro y las drogas, sus mecanismos neurobiológicos. *Salud Mental*, **33**: 451-456.
- Montoya Iván. (2010). Avances en la investigación de inmunoterapias contra las drogas de abuso. *Revista Colombiana de Psiquiatría*, **39**: 213-223
- National Institute of Drug Abuse (NIDA). InfoFax. [www.drugabuse.gov](http://www.drugabuse.gov)
- Nestler EJ, 2002. From neurobiology to treatment: progress against addiction. *Nature Neuroscience*, **5**: 1076-9
- Nevinsky GA, Kanishokova TG, Buenva VN. 2005. Natural Catalytic Antibodies (Abzimes) in Normalcy and Pathology. *Biokhimiya*, **65**: 1473-1487.
- Otero A. (1995). Anticuerpos monoclonales murinos: descripción de protocolos técnicos. *Revista Biomédica*, **6**: 157-165.
- Peterson E, Owens MS, Henry RL. (2006). Monoclonal Antibody Form and Function: Manufacturing the Right. Antibodies for Treating Drug Abuse. *American Association of Pharmaceutical Scientists' electronic journals*, **8**: 383-390.
- Rahbarizadeh F, Rasae MJ, Mandani R, Rahbarizadeh MH, Omidfar K. (2000). Preparation and characterization of specific and high-affinity monoclonal antibodies against morphine. *HYBRIDOMA AND HYBRIDOMICS*, **19**: 413-417.
- Rojas-Espinoza Oscar. 2006. Inmunología (de memoria). Tercera edición. Editorial medica panamericana. México.
- Roy S, Loh HH. (1996). Effects of opioids on the immune system. *Neurochem Res*, **22**: 1375-1386.
- Ruíz G et al. 2007. Anticuerpos monoclonales terapéuticos. Informe de vigilancia tecnológico. Genoma España. Madrid. España.

- Sawada J, Janejai N, Nagamatsu K, Terao T. (1988). Production and characterization of high-affinity monoclonal antibodies against morphine. ***Molecular Immunology*, 25:** 937-943.
- Usagawa T, Itoh Y, Hifumi E, Takeyasu A, Nakahara Y, Uda T. (1993). Characterization of morphine-specific monoclonal antibodies showing minimal cross-reactivity with codeine. ***Journal of Immunological Methods*, 157:** 143-148.
- Zhu X, Deffar K, Shi H, Li L, Wang X . (2007). Nanobodies - the new concept in antibody engineering. ***African Journal of Biotechnology*, 8:** 2645-2652.