



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

BIOLOGÍA

Producción de un hibridoma murino secretor de anticuerpos monoclonales con especificidad hacia la molécula de la morfina.

Tesis

Que para obtener el título de:

BIÓLOGO

Presenta:

César Javier Carranza Aguilar



México, D.F. 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.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

BIOLOGÍA

Producción de un hibridoma murino secretor de anticuerpos monoclonales con especificidad hacia la molécula de la morfina.

Tesis

Que para obtener el título de:

BIÓLOGO

Presenta:

César Javier Carranza Aguilar

Director de Tesis:

Dr. Benito Antón Palma

Asesor interno:

Biol. José Misael Vicente
Hernández Vázquez





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.

Con el apoyo de:

Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, **CONACYT** (Proyecto 106549)

National Institute on Drug Abuse, **NIDA** (Proyecto IC 1020203.0)

Instituto Nacional de Psiquiatría, **INP** (Proyecto IC 092919.0)

Instituto de Ciencia y Tecnología, **ICYT** (Proyecto IC 092019.1)

“Mientras los hombres sean libres para preguntar lo que deben; libres para decir lo que piensan; libres para pensar lo que quieran; la libertad nunca se perderá y la ciencia nunca retrocederá.”

Julius Robert Oppenheimer

Dedicatoria

A mis padres:

Maricela Aguilar Arellano y Santiago Carranza Villanueva que confiaron en mí, me apoyaron y motivaron en todo momento, me enseñaron el valor de la perseverancia, la importancia de la humildad, a tener pasión por lo que hago y a ser una persona mejor cada día, son mi gran ejemplo a seguir.

A mis hermanas: Adriana, Gaby, Vero, Lili y Diana por la compañía y el apoyo que me brindan, se que siempre contaré con ustedes.

A mis sobrinas Mireya, Yaeli y a mi sobrino Hector. Espero que ser un buen ejemplo para ustedes.

A Eréndira Daniela Ruíz Llamas con quien comparto mi vida y quien me ha permitido formar parte de la suya.

A mis amigos por todos los momentos que hemos pasado juntos. A Vero ya que con ella conocí el valor de una verdadera amistad, a Mary de quien he aprendido a ver la vida de una manera positiva y divertida, a Alfonso, Carlos y Roberto por tantas experiencias compartidas y a Fleuri por una amistad de tantos años. Gracias a todos por la motivación, el interés mostrado, las buenas vibras y todo lo que he recibido de ustedes en esta etapa de mi vida.

Agradecimientos

Gracias a todas aquellas personas que participaron en la realización de mi tesis:

A mi director de tesis el Dr. Benito Antón Palma por permitirme formar parte del equipo de trabajo, por compartir su conocimiento y por la confianza otorgada.

A Juan Carlos Calva y Agustín Gómez porque entre los tres creamos un gran grupo de trabajo en la sección de inmunoquímica. Gracias por la colaboración que tuvieron en cuanto a técnicas, conocimiento y experiencia.

A los investigadores que de muchas maneras forman parte de este gran proyecto: a Margarita, Hector y Jorge de la seccion de Sintesis Orgánica de Vacunas Antiadictivas, a Elizabet y Ricardo de la seccion de Inmunoensayos, a Iris, Silvia Susana y Sonia de Inmunología, a Anabel y Maura de Biología Molecular. Gracias por los conocimientos compartidos, los consejos, el gusto por hacer ciencia.

A mis sinodales: la Dra. María de Lourdes Mora García, la Biól. Reynalda Roldan Pérez, mi asesor interno el Biól. José Misael Vicente Hernández Vázquez y al Dr. Edelmiro Santiago Osorio. Quienes estuvieron en la fase final de mi tesis, gracias por su conocimiento, sus criticas y sugerencias.

| Índice | Pág. |
|---|-------------|
| Resumen..... | 1 |
| 1. Introducción..... | 2 |
| 1.1. Inmunidad mediada por anticuerpos..... | 2 |
| 1.2. Anticuerpos monoclonales..... | 5 |
| 1.3. Adicción a productos opiáceos..... | 8 |
| 1.4. Morfina y compuestos opiáceos relacionados..... | 9 |
| 1.5. Importancia de los anticuerpos monoclonales contra morfina..... | 15 |
| 1.6. Alternativas en el estudio de inmunoterapias y tratamientos de las adicciones..... | 16 |
| 2. Planteamiento del problema..... | 17 |
| 3. Justificación..... | 18 |
| 4. Hipótesis..... | 19 |
| 5. Objetivo General..... | 20 |
| 6. Objetivos particulares..... | 20 |

| | |
|--|----|
| 7. Metodología..... | 21 |
| 7.1. Cultivo de miolema..... | 21 |
| 7.2. Conteo y viabilidad celular..... | 21 |
| 7.3. Congelación y descongelación de mielomas e hibridomas..... | 22 |
| 7.4. Producción de factores de crecimiento necesarios en la fusión celular..... | 23 |
| 7.5. Fusión celular..... | 24 |
| 7.5.1. Preparación de las células de mieloma para fusión celular..... | 24 |
| 7.5.2. Obtención de los esplenocitos para la fusión celular..... | 24 |
| 7.5.3. Fusión..... | 25 |
| 7.6. Mantenimiento de Hibridomas..... | 25 |
| 7.7. Identificación y expansión de hibridomas productores de anticuerpos..... | 26 |
| 7.8. ELISA por captura de anticuerpo para la identificación de anticuerpos que reconozcan epítomos de la morfina y/o brazo espaciador..... | 26 |
| 7.9. Inmunoensayo para comprobar la especificidad únicamente hacia el epítomo inmunogénico de la morfina (sin brazo)..... | 28 |
| 7.10. Inmunoensayos de competencia a hibridomas positivos..... | 29 |

| | |
|--|-----------|
| 7.11. Inmunoensayo de afinidad y reactividad cruzada con opiáceos y metabolitos secundarios..... | 29 |
| 7.12. Tipificación del anticuerpo monoclonal murino contra morfina..... | 30 |
| 8. Resultados..... | 32 |
| 8.1. Fusión celular..... | 32 |
| 8.2. ELISA por captura de anticuerpo antimorfina realizado a hibridomas formados en el experimento de fusión celular..... | 33 |
| 8.3. ELISA de competencia a hibridomas positivos antimorfina..... | 35 |
| 8.4. Afinidad de anticuerpo producido por el hibridoma P8-D8 hacia productos derivados del opio y metabolitos secundarios..... | 38 |
| 8.5. Curvas de dilución de competidores y reactividad cruzada con derivados opiáceos y metabolitos secundarios..... | 39 |
| 8.6. Tipificación del anticuerpo monoclonal P8-D8..... | 40 |
| 9. Análisis de resultados..... | 42 |
| 10. Conclusiones..... | 49 |
| 11. Perspectivas..... | 50 |
| 12. Bibliografía..... | 51 |

Resumen.

Con la finalidad de contribuir con una herramienta biotecnológica en el tratamiento de las adicciones se generó la idea de producir un hibridoma secretor de anticuerpos monoclonales con la capacidad de reconocer el epítipo inmunogénico de la morfina que tiene en común con otros opiáceos y metabolitos secundarios, para esto se fusionaron *in vitro* células de mieloma con esplenocitos extraídos de un ratón inmunizado contra la molécula Morfina-Toxoide-Tetánico que es una vacuna experimental con la capacidad de provocar respuesta inmune hacia el hapteno morfina.

Mediante fusión celular se generaron 80 hibridomas productores de anticuerpos de los cuales 12 fueron inmunopositivos para el complejo antigénico morfina-brazo espaciador. Estos hibridomas se sometieron a una expansión clonal para determinar mediante la técnica de ELISA por captura de anticuerpo cuales eran específicos únicamente hacia la molécula de la morfina. Al identificar 3 hibridomas específicos se seleccionó al hibridoma P8-D8 por tener la mayor capacidad secretora de anticuerpos. El hibridoma P8-D8 se sometió entonces a ELISA de competencia con la finalidad de determinar su capacidad para unirse a derivados opiáceos y metabolitos secundarios, para esto se utilizaron concentraciones de competidores a 10 y 100 μM .

Se estableció que el hibridoma P8-D8 es capaz de reconocer sustancias análogas de la morfina como heroína y sulfato de morfina pero no es capaz de reconocer opiáceos con estructuras diferentes como la metadona. De la misma forma se determinó que también es capaz de reconocer los metabolitos secundarios de la morfina y la heroína que son la 6-monoacetil-morfina y la 6-glucuronido-morfina. Finalmente se analizó el isotipo de inmunoglobulina secretada por el hibridoma P8-D8 con la finalidad de conocer algunas de sus propiedades y funciones. El anticuerpo monoclonal P8-D8 pertenece al isotipo IgG₁ que es una inmunoglobulina capaz de transportarse en sangre y provocar opsonización.

La línea celular de hibridoma P8-D8 fue criopreservada para su posterior procesamiento y utilización en proyectos de investigación biotecnológica.

1. Introducción

1.1. Inmunidad mediada por anticuerpos

El sistema inmunitario tiene como función la defensa contra los microorganismos infecciosos o alguna sustancia que no tenga carácter infeccioso pero que pueda despertar una respuesta inmune. Los mecanismos que en condiciones normales protegen a las personas de las infecciones y eliminan sustancias ajenas pueden ser capaces de provocar una lesión tisular o una enfermedad. Por lo tanto, se puede describir a la respuesta inmunitaria como una reacción dirigida hacia componentes del microorganismo, a macromoléculas como proteínas o polisacáridos y a pequeños compuestos químicos que sean reconocidos como ajenos, con independencia de las consecuencias fisiológicas o patológicas que pueda acarrear una reacción de esta clase (Abbas *et al.*, 2011). Uno de los principales mecanismos de respuesta inmunitaria es la producción de anticuerpos.

Los anticuerpos o inmunoglobulinas (Ig), son producidos por los linfocitos B en respuesta a la presencia de antígenos en el organismo. Pueden estar unidos a la membrana sobre la superficie de linfocitos B actuando como receptores de antígenos y también residen en la sangre, tejidos y localizaciones mucosas. El organismo contiene millones de linfocitos B y cada uno puede responder a antígenos específicos. Un antígeno es cualquier sustancia que al ser introducida en el organismo genera una respuesta inmune y es capaz de combinarse con los anticuerpos específicos formados. Generalmente son proteínas o polisacáridos y tienen un alto peso molecular, mínimo 8000 a 10000 Daltons. Otras moléculas como polipéptidos, lípidos, ácidos nucleicos, etc. pueden actuar como antígenos (Kindt *et al.*, 2007).

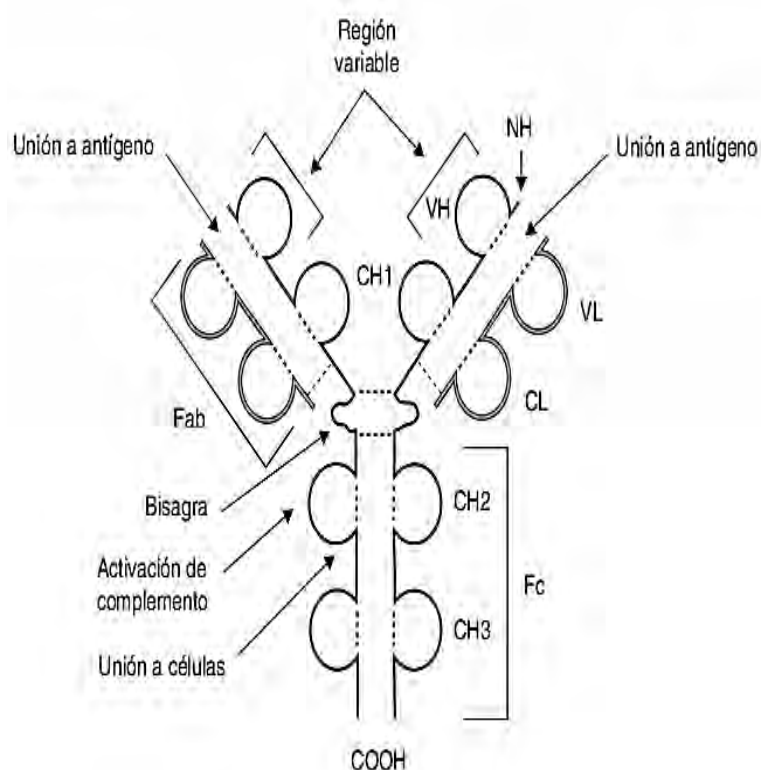
Existen sustancias de bajo peso molecular (aproximadamente 200 Daltons) que al ser muy pequeñas tienen que estar acoplados a una proteína acarreadora como la albumina de suero bovino (BSA) u otras matrices sintéticas para generar respuesta inmune. Estas sustancias son llamadas haptenos.

Existe una gran variedad de moléculas que pueden actuar como haptenos, algunas de ellas son: azúcares, fármacos, aminoácidos, péptidos, fosfolípidos o triglicéridos (Berg *et al.*, 2007).

En presencia de antígenos se activan las células B específicas de los ganglios linfáticos, el bazo o el tejido linfático del tubo digestivo. Se diferencian en plasmocitos que secretan anticuerpos específicos que circulan por la linfa y sangre para llegar al sitio de la invasión, activan el sistema de complemento y opsonizan agentes extraños aumentando su fagocitosis y excreción con la finalidad de impedir los efectos tóxicos en el organismo (Kindt *et al.*, 2007).

Los anticuerpos están formados por cuatro cadenas de aminoácidos, dos cadenas pesadas o cadenas H (del inglés heavy) y dos cadenas ligeras o cadenas L (del inglés light) unidas por puentes disulfuro. Las dos cadenas H y las dos cadenas L son idénticas entre sí (García, 2010) Fig. 1.

Fig. 1. Esquema de la estructura de una inmunoglobulina. Las cadenas pesadas aparecen en negro y las ligeras en gris claro. **CH:** dominios de la región constante de la cadena pesada; **CL:** dominio constante de la cadena ligera; **COOH:** extremo carboxiterminal; **Fab y Fc:** fragmentos resultantes de proteólisis; **NH:** extremo aminoterminal; **VH:** dominio variable de la cadena pesada; **VL:** dominio variable de la cadena ligera. (Esquema tomado de García, 2010).



Las inmunoglobulinas se clasifican en distintos subtipos e isotipos dependiendo de las diferencias en la región CH. Estas clases y subclases se denominan IgM, IgD, IgG, IgE e IgA. Las dos cadenas ligeras de una única molécula de Ig son del mismo isotipo κ o λ y se diferencian en su región C (Abbas *et al.*, 2011). Estas clases de anticuerpos tienen diferentes propiedades funcionales las cuales se describen en la figura 2.

| Isotipo de anticuerpos | Semivida en suero (días) | Funciones |
|------------------------|--------------------------|--|
| IgA | 6 | <p>Inmunidad en las mucosas. Secrecion de IgA a la luz de los aparatos digestivo y respiratorio.</p> <p>Activacion del complemento por la via de lecitina o por la via alternativa.</p> |
| IgD | 3 | <p>Receptor de antígeno de linfocitos B virgenes.</p> |
| IgE | 2 | <p>Defensa frente a parasitos heiministicos, hipersensibilidad inmediata.</p> <p>Desgranulacion de los mastocitos.</p> |
| IgG | 23 | <p>Opcionizacion de antigenos para su fagositocis por macrofagos y neutrofilos.</p> <p>Activacion de la via clasica del complemento.</p> <p>Citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos mediada por lifocitos NK y macrofagos.</p> <p>Inmunidad neonatal, paso de los anticuerpos de la madre a travez de la placenta y el intestino.</p> <p>Inhibicion por retroalimentacion de la activacion de linfocitos B.</p> |
| IgM | 5 | <p>Receptor del antígeno de linfocitos B virgenes por anticuerpos de membrana.</p> <p>Activacion de la via clasica del complemento.</p> |

Fig. 2. Funciones efectoras de los diferentes isotipos de anticuerpos (Abbas *et al.*, 2011).

1.2. Anticuerpos monoclonales.

Una de las primeras demostraciones de la inmunidad adaptativa fue el hallazgo de Von Behring y Kitasato en 1890 de que las toxinas inactivadas por procesos químicos podían inducir inmunidad protectora cuando se inyectaban en animales de experimentación y que la protección se podía transferir a otros animales susceptibles inyectándoles el suero de sus homólogos inmunizados (Kindt *et al.*, 2007).

En 1975 George Köhler y César Milstein de la universidad de Cambridge desarrollaron una técnica que otorgaba la posibilidad de producir cantidades ilimitadas de anticuerpos idénticos y específicos hacia un antígeno en particular (Köhler *et al.*, 1975).

Esta técnica se basa en el hecho de que cada linfocito B sintetiza anticuerpos de una especificidad única. Pero como los linfocitos B no se reproducen indefinidamente era necesario “inmortalizar” estas células. Esto se hizo mediante la hibridación somática celular entre un linfocito B y una célula de mieloma. Los anticuerpos que producen estos hibridomas son llamados anticuerpos monoclonales (Kindt *et al.*, 2007).

Los anticuerpos monoclonales son producidos mediante la técnica de fusión celular utilizando un agente fusógeno capaz de disolver parte de la membrana, para esto se utiliza el bazo de un ratón hiperinmune a un antígeno en particular y una línea celular de mieloma. Las células se mezclan en presencia del disolvente no volátil polietilenglicol (PEG) que es el fusógeno mayormente utilizado en experimentos de fusión celular ya que en comparación con otros agentes químicos produce una mayor proporción de hibridomas y es poco toxico para las células (Hockfield *et al.*, 1993). Fig.3.

Durante la fusión celular se producen los siguientes fenómenos: las membranas celulares de diferentes células entran en contacto y la presencia de PEG disuelve parte de la membrana, se forman puentes citoplasmáticos (Latorre *et al.*, 1996) en el lugar de la lesión lo que aumenta su adherencia y finalmente ocurre el intercambio del material citoplasmático, posteriormente los núcleos de las células se fusionan por cariogamia.

Las células de mieloma utilizadas para la fusión celular son incapaces de sintetizar la enzima HGPRT (hipoxantina-guanidin-fosforibosil-transferasa) por lo que para sintetizar su ADN obtienen nucleótidos a partir de aminoácidos. El medio para cultivo de hibridomas contiene HAT (hipoxantina, aminopterina, timidina). La aminopterina bloquea la síntesis de nucleótidos a partir de aminoácidos por lo que las células de mieloma no sobreviven en presencia de este compuesto. Las células no fusionadas mueren, mientras que los hibridomas proliferan debido a que poseen la enzima HGPRT aportada por los esplenocitos. Recientemente se recomienda utilizar factores tróficos en experimentos de fusión celular con la finalidad de promover la activación de su ciclo celular y aumentar la proliferación (Hockfield *et al.*, 1993).

Mediante técnicas de biología molecular e ingeniería genética se han desarrollado anticuerpos monoclonales de ratón con la capacidad de ser administrados en la especie humana. En 1985 se crearon los primeros anticuerpos quiméricos en los cuales los genes que codifican la región variable de las Ig de ratón se unen con genes que codifican la región constante humana. En 1986 se desarrolló una técnica de humanización de anticuerpos con el fin de minimizar los componentes del anticuerpo de ratón generadores de respuesta inmune humana. En este proceso se transfieren CDR de las Ig de ratón a estructuras de las regiones variables de cadenas pesadas o ligeras de una Ig proveniente de humano (Bruggemann *et al.*, 1989).

Los anticuerpos monoclonales tienen una importancia y utilidad relevante en la medicina y la investigación, esta importancia radica en las funciones que pueden desarrollar:

Uno de sus usos más generalizados es la caracterización y cuantificación de sustancias a nivel biológico como hormonas o enzimas. También se han empleado en la cuantificación, fraccionamiento y aislamiento de subpoblaciones celulares al identificar antígenos presentes en las membranas, como las moléculas CD3⁺, CD4⁺ y CD8⁺ (Peakman *et al.*, 2011).

En el trasplante de órganos han sido utilizados para inhibir la activación de los linfocitos T en caso de amenaza de rechazo agudo (García, 1997) por ejemplo, el

anticuerpo monoclonal quimérico Basiliximab antiCD-25 que bloquea la citocina IL-2 (Kahan *et al.*, 1999).

En oncología se utilizan para la localización y posible destrucción de células tumorales al marcar los anticuerpos con sustancias radiactivas o drogas citotóxicas y dirigirlos directamente a la célula tumoral. Los más utilizados son contra HER2 en cáncer de mama dirigiéndolos contra el factor de crecimiento epidérmico (Romond *et al.*, 2005) o los antiCD20 para linfomas (McLaughlin *et al.*, 1998).

Los anticuerpos monoclonales se han empleado con otras finalidades como la prevención de complicaciones de enfermedades virales o el tratamiento de intoxicaciones por fármacos (Berger, 2002).

Además de las aplicaciones clínicas también han permitido el desarrollo y optimización de técnicas de laboratorio como la citometría de flujo o la prueba de ELISA.

Desde el punto de vista general los anticuerpos monoclonales han ido sustituyendo a los antiseros y tratamientos convencionales principalmente por su alta especificidad y por la posibilidad de producirlos industrialmente tanto para su utilización en la investigación como en la clínica al ser usados como medio terapéutico y diagnóstico.

1.3. Adicción a productos opiáceos

Una adicción es una enfermedad crónica con recaídas, se caracteriza por la búsqueda y el uso compulsivo de la sustancia a la que se es adicto, generalmente produce cambios neuroquímicos y moleculares en el cerebro. Esta dependencia persiste a pesar de sus consecuencias, provoca graves alteraciones de salud, psicológicas y sociales por lo que el consumo de la sustancia representa una pesada carga para el individuo y la sociedad. En 1969 la Organización Mundial de la Salud definió a una droga como “toda sustancia que introducida en un organismo vivo pueda modificar una o varias de sus funciones”. El mismo año declaró como droga de abuso “aquella de uso no médico con efectos psicoactivos capaz de producir cambios en la percepción, el estado de ánimo, la conciencia y el comportamiento” (OMS, 1969).

En la actualidad las drogas más utilizadas incluyen: heroína, cocaína, sustancias tipo morfina, barbitúricos, alcohol, café, anfetaminas y alucinógenos (Goodman *et al.*, 2011). Los derivados opiáceos son de las drogas más peligrosas a las que se ha expuesto el ser humano. Son productos extraídos de la planta *Papaver somniferum* también conocida como amapola (López *et al.*, 2007). Esta planta crece principalmente en Afganistán, Pakistán, India, México, Perú, Ecuador, Irán, Tailandia, y China. (UNODC, 2009). Los ejemplos más conocidos de este tipo de drogas son la heroína, morfina, codeína, hidrocodeína, hidroximorfina, oxicodeína, metadona, fentanil y sus análogos (Vega, 2005).

En países desarrollados como Canadá, Estados Unidos y varios de Europa, más del 2% de los jóvenes reporta el uso de heroína, casi el 5% admitió haber fumado cocaína durante su vida. El 8% de los jóvenes de Europa occidental y más del 20% en Estados Unidos reconoció haber utilizado cuando menos un tipo de droga ilícita además de *Cannabis sativa* (UNODCCP, 2002). Según una encuesta europea los productos derivados del opio son las drogas que representan el más alto riesgo a la salud. (Instituto de Estadística de la Comisión Europea, 2008). En México es un problema que va en aumento, aproximadamente 10 a 15% de personas de la población mexicana de edades comprendidas entre 17 y 60 años tiene problemas debido al consumo de drogas legales o ilegales (Secretaría de Salud, 2011).

1.4. Morfina y compuestos opiáceos relacionados.

Es una sustancia constituida por un nitrógeno heterocíclico además de un núcleo fenantrénico formado con tres anillos de benceno. Debido a su estructura y a su efecto en el sistema nervioso se considera un alcaloide fenantreno del opio (Troy, 2006). Su estructura molecular es $C_{17}H_{19}NO_3$. La síntesis química de los derivados morfínicos se dio a partir de 1951. En 1806, el farmacéutico Friedrich Wilhelm Adam Sertürner reportó el aislamiento por cristalización de una sustancia pura que llamó morfina en honor al dios griego de los sueños Morfeo (Goodman *et al.*, 2011).

Los fármacos opiáceos activan principalmente a los receptores de membrana μ , δ y κ (Vega, 2005) que se expresan principalmente en el cerebro y la medula espinal, además están ampliamente distribuidos en una variedad de tejidos cardiacos, pulmonares, intestinales y células circulantes (Goodman *et al.*, 2011).

Las características estructurales de los opiáceos contribuyen a la selectividad del receptor, por lo tanto los efectos y reacciones con los receptores μ , δ y κ pueden ser estudiados basándose en el modelo estructural de cada alcaloide .Fig. 4.

Entre los análogos de la morfina que comparten el núcleo fenantrénico se encuentran la heroína, la codeína y la tebaína. Existen compuestos naturales y sintéticos derivados de la morfina que tienen efectos similares a la morfina al ser administrados en el organismo, sin embargo tienen una estructura diferente por lo cual se unen a los receptores opioides en diferente proporción, entre estos compuestos se encuentran la metadona, el fentanilo y la meperidina (Goodman *et al.*, 2011). Fig. 5.

Varios estudios de vacunación contra el hapteno morfina han señalado que los compuestos análogos de la morfina que comparten el núcleo fenantrénico pero con distintos grupos funcionales resultan ser más antigénicos cuando el brazo acarreador se acopla a la posición 6 de la estructura (Antón *et al.*, 2009). Además, se ha demostrado que la estructura fenantrénica y especialmente la zona nitrogenada de la morfina tiene alta afinidad por los receptores opioides μ (Goodman *et al.*, 2011).

Las interacciones entre el fármaco y el receptor están involucradas en respuestas de analgesia, depresión respiratoria, miosis, dependencia física y euforia. Los receptores μ predominan en las áreas asociadas con la percepción de dolor como el tálamo medio y el área gris periventricular (Mansour *et al.*, 1994).

La morfina puede ser consumida en su forma sulfatada con fines medicinales por vía oral, rectal, subcutánea o intravenosa y de manera ilegal es posible que sea inhalada. Al ser administrada en el organismo se une a la albumina plasmática donde su distribución y metabolismo es muy rápido (Muriel, 2007). El efecto se da inmediatamente y su duración es de aproximadamente 4 horas.

De la dosis administrada, aproximadamente el 87% se concentra en el hígado y el porcentaje restante en órganos como el bazo, pulmones, riñón, músculo estriado y a pesar de su hidrofilia es capaz de atravesar la barrera hematoencefálica. La morfina es metabolizada mediante la enzima UDP-glucuronosiltransferasa-2B7 (Goodman *et al.*, 2011) los productos de esta reacción son: aproximadamente 60% de morfina-3-glucurónido (M3G), 10.6% de morfina-6-glucurónido (M6G) y en menor cantidad se da la formación de normorfina por N-desmetilación (Almeida, 1991). Fig. 6.

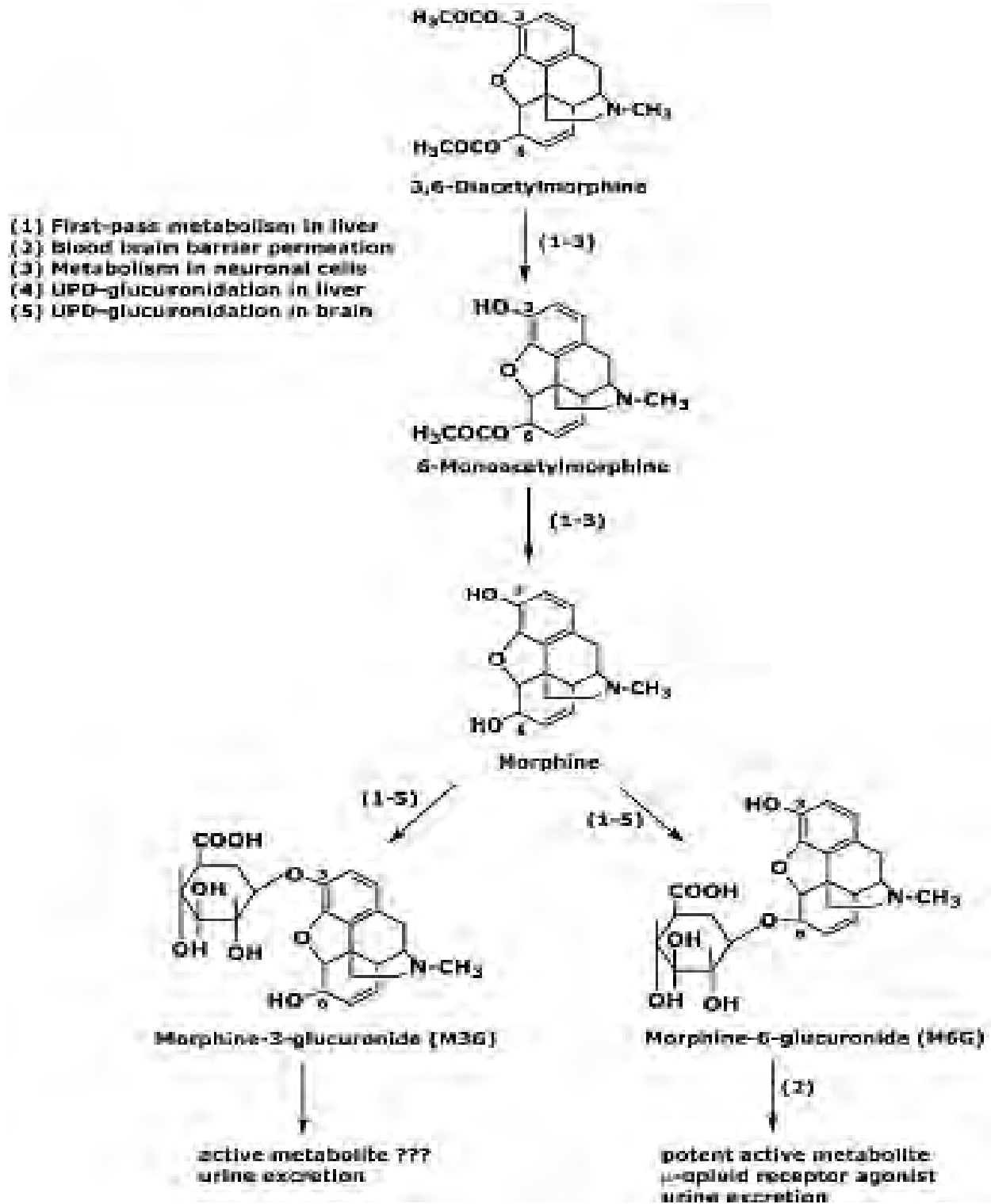


Fig. 6. Metabolismo de Heroína y morfina. (Tomado de Antón *et al.*, 2009)

La morfina es un analgésico muy potente comúnmente utilizado para el tratamiento del dolor intenso y persistente ya que, además de eliminar el dolor, puede relajar y conducir a una sensación de bienestar. Sin embargo, también se ha reportado la tendencia de la morfina a producir dependencia. La euforia que se experimenta al tomarla se transforma rápidamente en una adicción ya que al ser tolerada por el organismo el individuo necesita una dosis cada vez mayor para obtener el mismo efecto causando dependencia física y psicológica progresiva (Almeida, 1991).

Algunos de los efectos negativos más comunes de la morfina son: náuseas, vómitos, estreñimiento, confusión, desmayos, palpitaciones, adormecimiento, inquietud, boca seca y cambios en el estado de ánimo. Algunos de los efectos en el organismo a largo plazo son: pancreatitis aguda, fallo renal y toxicidad química. (Seidenberg, 2000). Con la morfina y sus derivados glucurónidos como principal detonante, el individuo puede sufrir depresión respiratoria aguda, baja presión sanguínea, estado de coma y la muerte.

La excreción de los metabolitos secundarios y pequeñas cantidades de morfina se realiza principalmente por vía renal y del 7 a 10% por excreción biliar. En orina se excreta aproximadamente 4.3% de morfina, 13.7% de M6G y 56% de M3G. El tiempo de eliminación es muy variable, dependiente de la dosis administrada. Aproximadamente de 3 horas para la morfina y de 2.5 a 7 horas para los metabolitos secundarios (Almeida, 1991). Posteriormente se produce la circulación enterohepática de morfina y sus glucurónidos que representa la presencia de pequeñas cantidades de morfina en las heces y la orina durante varios días después de la última dosis (Goodman *et al.*, 2011).

La dependencia a la morfina se debe a la hiperexcitabilidad de varios núcleos cerebrales cuando se ocupan prolongadamente los receptores opioides. Aumenta la actividad de la adenilciclase y de proteínas G, se facilita el flujo de salida de K^+ y la entrada de Ca^{2+} con aumento de actividad bioeléctrica. Estos fenómenos contribuyen a contrarrestar las reacciones agudas de la morfina pero al mismo tiempo participan en la tolerancia, de manera que cuando el fármaco es totalmente eliminado la hiperactividad celular se detiene rápidamente, causando la conducta adictiva (Goodman *et al.*, 2011).

1.5. Importancia de los anticuerpos monoclonales contra morfina.

Los anticuerpos monoclonales específicos hacia productos opiáceos pueden tener muchas aplicaciones clínicas, terapéuticas y en el ámbito de la investigación (Berger, 2002). Principalmente como agente terapéutico en personas adictas a productos derivados del opio; los anticuerpos pueden usarse para prevenir la recaída en individuos dependientes de morfina, heroína y otros productos análogos ya que al formar un complejo antígeno-anticuerpo induciría la eliminación y excreción por diferentes vías metabólicas y evitaría que el fármaco entrara en el sistema nervioso central reduciendo los efectos farmacológicos y forzando la abstinencia en los adictos.

Podría ser utilizado para frenar el desarrollo de la adicción en las primeras etapas de la enfermedad debido a que la molécula producto de la unión de el anticuerpo y el antígeno es demasiado grande como para atravesar la barrera hematoencefálica (Bradbury, 1990), por lo tanto no desencadenará ningún efecto euforizante relacionado con la droga, el efecto de refuerzo se extingue y se puede detener el ciclo adictivo

Cuando existe una intoxicación por opiáceos se generan muchos efectos en el organismo como depresión respiratoria, náuseas, miosis etc. Los cuales podrían detenerse al facilitar la eliminación del fármaco por medio de los anticuerpos monoclonales. En el tratamiento de sobredosis aguda o crónica los anticuerpos podrían administrarse y de manera inmediata prevenir un paro respiratorio, insuficiencia cardíaca, un estado de coma e incluso la muerte.

El tratamiento con cualquier inmunoterapia en los casos de adicción a drogas siempre tiene que combinarse con intervenciones psicosociales de apoyo (García, 2007).

Por medio de anticuerpos monoclonales se puede realizar la detección y cuantificación de la morfina y sus principales metabolitos en los fluidos biológicos con la finalidad de vigilar abusos, diagnosticar dependencia física de opiáceos, confirmar un diagnóstico de intoxicación o participar en una investigación de la muerte médico-legal (Zola, 2001).

1.6 Alternativas en el estudio de inmunoterapias y tratamientos de las adicciones.

Las inmunoterapias son una forma innovadora de tratar la adicción a las drogas, la idea de la vacunación contra drogas se describió por primera vez en 1974 en un estudio donde monos inmunizados mostraron una reducción en su autoadministración de heroína (Bonese *et al.*, 1974). En el área de investigación se han desarrollado principalmente vacunas antiadictivas y anticuerpos monoclonales (Montoya, 2008), estos últimos tienen la ventaja de ser específicos y de no dañar al organismo o crear dependencia como lo han hecho algunos otros fármacos.

En los últimos años se ha investigado la inmunización pasiva en ratones con anticuerpos monoclonales hacia la cocaína, anfetamina, nicotina y penciclidina, sin embargo no se han generado resultados de gran impacto. También existen diversos estudios de inmunización activa por medio de vacunas hacia la cocaína, heroína, metanfetaminas y nicotina. (Montoya, 2008).

Los modelos de estudio de producción de anticuerpos monoclonales son principalmente en ratones. Estos anticuerpos no pueden ser administrados en humanos ya que provocan una respuesta inmune inmediata. Por eso se están fabricando modelos de anticuerpos monoclonales quiméricos y humanizados a partir de anticuerpos murinos, posibilitando así la terapia en humanos (Rabinovich, 2004).

Los tratamientos de las adicciones con fármacos antagonistas y agonistas parciales son los más comúnmente utilizados en modelos con humanos, por ejemplo, en un estudio realizado por la Universidad de Yale se trataba con metadona la adicción a la cocaína y se buscaba eliminar el efecto placentero de la droga aumentando el nivel de anticuerpos contra la cocaína en sangre (Martell, 2009).

Para la adicción a la morfina el tratamiento más utilizado en humanos es con los antagonistas puros naloxona y naltrexona, éstos revierten los efectos. Sin embargo tienen diversas complicaciones a la salud como pueden ser: hipertensión arterial sistémica, edema pulmonar, rotura de aneurisma cerebral, arritmias auriculares y ventriculares, paro cardíaco, muerte súbita, dolor postoperatorio, etc. (Goodman *et al.*, 2011).

2. Planteamiento del problema

Una de las metas de diversas investigaciones científicas es obtener una sustancia o tratamiento que ayude a curar la adicción a las drogas sin afectar la salud de las personas, sin embargo los resultados han sido escasos y ha aumentado la producción y consumo de nuevas drogas legales e ilegales afectando principalmente la salud y desencadenando una serie de consecuencias negativas a nivel social. Por lo tanto, siguiendo la idea de las inmunoterapias como apoyo a tratamientos contra las adicciones, nos planteamos la posibilidad de generar un hibridoma secretor de anticuerpos monoclonales con la capacidad de reconocer y bloquear drogas opiáceas en el organismo utilizando la molécula de la morfina como molde estructural análogo a otras drogas derivadas del opio y así contribuir con una alternativa de diagnóstico y tratamiento eficaz de las adicciones.

3. Justificación

En la actualidad la producción, distribución y consumo de productos opiáceos es un problema nacional e internacional que difícilmente podrá ser controlado. Este problema afecta principalmente la salud de los individuos generando una dependencia incontrolada que llevaría a la persona a otro tipo de complicaciones como pueden ser: patologías psiquiátricas provocadas por el abuso de agentes psicotrópicos, complicaciones en su salud que podrían provocar paro respiratorio, insuficiencia cardiaca, estado de coma o la muerte, además conlleva el riesgo de contagio de otro tipo de enfermedades como el SIDA o la Hepatitis C, etc.

Las personas adictas generan un grave problema en la sociedad por diferentes ámbitos: el deterioro de su salud provoca que las personas víctimas de la enfermedad no puedan adaptarse y generalmente son excluidas de la sociedad al no ser funcionales, buscan drogas y recurren a la delincuencia como medio de vida, provocan un aumento de la demanda y el tráfico de drogas facilitando y aumentando el consumo.

En la actualidad no existen anticuerpos monoclonales con las características que sugiere esta investigación y el número de anticuerpos monoclonales utilizados para el diagnóstico es demasiado bajo, lo cual aumenta el precio y la disponibilidad.

La producción de un anticuerpo monoclonal contra productos opiáceos basándonos en el modelo estructural de la morfina es de gran importancia en las terapias que buscan frenar el desarrollo de la adicción a estas drogas en cualquiera de sus etapas. Evitando así la problemática individual y social a la que se encuentra sometido el adicto.

Además de las múltiples aplicaciones mencionadas, la generación y producción de anticuerpos monoclonales contra morfina servirá para desarrollar una serie de estudios que necesitan del reactivo biológico como base para investigaciones futuras relacionadas con las adicciones y su tratamiento.

4. Hipótesis

Si se fusionan *in vitro* células inmortales de mieloma con esplenocitos de un ratón hiperinmune a la molécula de morfina acoplada a toxoide tetánico como proteína acarreadora altamente inmunogénica (MTT), se obtendrán hibridomas secretores de anticuerpos contra epítopos del inmunógeno MTT. Posibilitando así la selección, identificación y aislamiento de una línea celular “inmortal” en el sentido de que podrá subcultivarse indefinidamente. Además, cada célula será secretora de anticuerpos monoclonales que reconozcan a la molécula de morfina y posiblemente al epítipo estructural que tiene en común con otros productos derivados del opio y metabolitos secundarios

5. Objetivo general

- Producir un hibridoma secretor de anticuerpos monoclonales murinos que reconozcan a la molécula de morfina a partir de la fusión de células de mieloma y células de bazo de un ratón inmunizado contra la morfina.

6. Objetivos particulares

- Seleccionar hibridomas productores de anticuerpos contra diferentes epítopos del complejo morfina-brazo espaciador.
- Identificar mediante inmunoensayos los hibridomas productores de anticuerpos específicos para morfina.
- Seleccionar y proliferar las líneas celulares productoras de anticuerpos específicos para morfina.
- Identificar hibridomas productores de anticuerpos afines a epítopos de otros productos opiáceos y metabolitos secundarios.
- Tipificar los anticuerpos monoclonales producidos por el hibridoma formado.
- Críopreservar las diferentes líneas celulares de hibridomas para su posterior utilización en proyectos de investigación.

7. Metodología

7.1. Cultivo de mieloma

Las células murinas utilizadas en proyectos de fusión celular son células tumorales de mieloma múltiple que pueden crecer indefinidamente en cultivo. Estas células tienen la finalidad de conferir inmortalidad a los hibridomas. Se utilizó la línea celular de mieloma SP2/0 caracterizada por tener un rápido crecimiento y replicación, además no secreta inmunoglobulinas.

Los mielomas se sembraron a una densidad inicial de 1×10^6 cel/ml en frascos para cultivo en una incubadora (Nuair modelo UN-4600) con humedad y temperatura constante de 37°C y una exposición a 5 % de CO_2 y 95 % de aire.

Se hicieron revisiones diarias de los cultivos celulares con un microscopio invertido monitoreando que cada frasco de cultivo permaneciera a una confluencia máxima del 80 % a una densidad aproximada de 4×10^5 a 6×10^5 cel/ml manteniendo el cultivo en fase de crecimiento logarítmico. También se evaluaron las condiciones morfológicas de las células, la velocidad de crecimiento, las condiciones del medio de cultivo y se vigiló que no existiera algún tipo de contaminación.

Todo el proceso de cultivo celular se realizó bajo condiciones estrictas de esterilidad.

7.2. Conteo y viabilidad celular

Se realizó empleando una Cámara de Neubauer. La cual tiene dos secciones donde se distribuye por capilaridad la suspensión celular. Cada sección tiene un patrón de cuadrículas de 16 secciones con capacidad de $0.1 \mu\text{l}$. Conociendo este dato fue posible cuantificar las células contenidas en el medio de cultivo. Se tomó una alícuota de $10 \mu\text{l}$ de suspensión celular previamente homogeneizada y se mezcló con el colorante Azul de Tripán al 4 % en una dilución 1:1. Se aplicaron $10 \mu\text{l}$ de la mezcla a cada una de las celdas de la cámara y se contaron las células utilizando un microscopio invertido.

Siguiendo la misma metodología se realizó la prueba de viabilidad celular, para esto fue necesario identificar las células que se tiñen de azul, esta coloración se debe a que las células muertas permiten el paso del colorante al interior de la célula a diferencia de las células vivas que mantienen su membrana plasmática intacta. Al calcular la proporción de células vivas y muertas fue posible determinar la viabilidad del cultivo.

7.3. Congelación y descongelación de mielomas e hibridomas.

La criopreservación es de gran utilidad para almacenar células durante un largo periodo de tiempo. La congelación y descongelación de células se realizó basándose en el protocolo descrito por Hockfield y colaboradores (1993).

Al estar en fase de crecimiento logarítmico, las células se homogeneizaron mediante pipeteo continuo y se tomaron alícuotas para realizar el conteo celular y determinar la viabilidad. Se centrifugó la suspensión celular a 200 g por 10 minutos, se desechó el sobrenadante y se resuspendió el pellet en medio de congelación DMSO 10x, inmediatamente se depositó 1 ml de la suspensión celular en criotubos a una densidad de 1×10^6 cel/ml con viabilidad superior al 90 % y se guardaron a -80 °C. La preservación de las células en estas condiciones puede ser durante meses o años.

En el caso de los hibridomas, también se congeló el sobrenadante de los cultivos celulares ya que está enriquecido con anticuerpos específicos para la molécula de la morfina. Este sobrenadante se congeló a -20 °C.

Los mielomas e hibridomas se descongelaron a temperatura ambiente y se hizo una dilución de la suspensión celular en medio de cultivo a 37 °C la cual se centrifugó a 200 g por 10 min con la finalidad de eliminar el medio de congelación, una vez terminado el lavado se sembraron las células en un frasco para cultivo con 10 ml de medio de cultivo nuevo preparado con RPMI-1640, 10 % de suero fetal bovino (SFB), L-glutamina, solución buffer de HEPES y una mezcla de antibióticos: penicilina, estreptomina, y neomicina (PSN).

7.4. Producción de factores de crecimiento necesarios en la fusión celular

Cuando se fusionan células de mieloma en cultivo y esplenocitos recién extraídos de un ratón, las condiciones de vida y el metabolismo de las células cambia (Gil, 2011). Por esa razón el medio de cultivo para los hibridomas formados mediante fusión celular fue enriquecido con factores de crecimiento que participaron en la adaptación y activación del ciclo celular disminuyendo el número de células que entran en proceso apoptótico y provocando la proliferación (Heyworth *et al.*, 1997).

Para producir el medio condicionado de timocitos se siguió el protocolo propuesto por Hockfield y colaboradores (1993). En condiciones de esterilidad se extirpó el timo de 4 ratones sacrificados por dislocación cervical. Se hizo una incisión en la región ventral hasta exponer el timo que se extrajo y se lavó en 4 cajas Petri. Se disgregó frotando y presionando suavemente el tejido con un embolo. Una vez obtenidas las células del timo se transfirieron a un tubo con 15 ml de medio de cultivo y se contaron 2.7×10^8 células. La suspensión celular se centrifugó a 800 g por 10 min a temperatura ambiente y el botón celular se resuspendió a una concentración 4×10^6 cel/ml en un medio preparado con DMEM, SFB al 10 %, antibióticos (PSN) y buffer HEPES.

La suspensión celular fue transferida a frascos estériles para cultivo a una densidad de 2×10^8 células en 50ml de medio de cultivo. Los frascos se dejaron en incubación durante 48 horas a 37 °C y expuestos a 5 % de CO₂ y 100 % de humedad.

Transcurrida la incubación se tomó todo el sobrenadante y se centrifugó a 1000 g durante 5 min. El sobrenadante fue filtrado con un filtro estéril de 0.2 µm. Este medio condicionado de timocitos se guardó en tubos estériles a -70 °C.

7.5. Fusión celular

La fusión de esplenocitos con células de mieloma se realizó en presencia de polietilenglicol (PEG) que es un detergente capaz de disolver una parte de la membrana celular permitiendo la formación de hibridomas con características de cada tipo de células.

Las células de mieloma para la fusión celular fueron de ratón de la línea SP2/0 incapaces de sintetizar la enzima HGPRT. Los esplenocitos para la fusión celular fueron obtenidos de un ratón de la cepa Balb/c inmunizado con morfina acoplada a toxoide tetánico mediante un brazo espaciador (Morfina Toxoide Tetánico) (Antón *et al.*, 2009).

7.5.1 Preparación de las células de mieloma para fusión celular.

Las células de mieloma fueron descongeladas, cultivadas y expandidas de manera que estuvieran en las condiciones ideales 10 días antes de la fusión. El cultivo de mieloma se consideró candidato para la fusión cuando cumplió las siguientes características: los porcentajes de viabilidad sobrepasaron el 90 %, la replicación celular se encontraba en fase logarítmica de crecimiento y la densidad celular fue de 1×10^6 cel/ml.

7.5.2 Obtención de los esplenocitos para la fusión celular.

Los esplenocitos fueron extraídos de un ratón hiperinmune a la molécula MTT proporcionado por el Laboratorio de Investigación Biopsicosocial en Adicciones del Instituto Nacional de Psiquiatría Ramón de la Fuente Muñiz. El sacrificio por dislocación cervical y la disección se realizaron siguiendo el protocolo descrito por Coligan (2005).

En condiciones de esterilidad se colocó al ratón sobre su costado derecho y se hizo una incisión de 2.5 cm entre la costilla y la cadera hasta dejar expuesto el bazo que fue extraído cortando el tejido conectivo y sin romper la cápsula esplénica. Se lavó el bazo en tres cajas Petri con medio DPS (DMEM y antibióticos PSN 1x). Las células fueron expulsadas de la cápsula esplénica presionando suavemente y dejando los esplenocitos suspendidos en el medio DPS que se transfirió a un tubo estéril de 50 ml donde se cuantificaron 2×10^8 células totales.

7.5.3 Fusión

La fusión celular se realizó siguiendo el protocolo descrito por Hockfield y colaboradores (1993) y algunas modificaciones propuestas por Wayne (1999).

Se utilizaron 40×10^6 células de mieloma para 200×10^6 esplenocitos. Estas células se centrifugaron por separado a 400 g por 5 min a temperatura ambiente y se desechó el sobrenadante. Cada botón celular se resuspendió en 10 ml de medio DPS a 37°C, se combinaron las células y se centrifugaron combinadas a 400 g por 5 min a temperatura ambiente. Se removió casi todo el sobrenadante y se resuspendió el botón celular en aproximadamente 0.5 ml de medio DPS. Lentamente por un periodo de 30 segundos se adicionó 1 ml de la solución RPMI y PEG al 50 % a 37 °C agitando lentamente durante los 30 segundos, inmediatamente después se agregaron 12 ml de la solución DPS por un periodo de 4 min siguiendo la misma dinámica. Se centrifugó la suspensión celular a 400 g por 5 min a temperatura ambiente. Se removió el sobrenadante y se suspendieron las células en medio de cultivo para hibridomas preparado con RPMI1640, 20 % de SFB, 5% de HAT, 1 % de HEPES, 1% de L-Glutamina, 5 % de factores tróficos (medio condicionado de timocitos) y 1 % de antibióticos PSN.

Se sembraron 1248 pozos en 13 placas de 96 en un volumen de suspensión celular de 200 µl por pozo a una densidad celular de 2×10^5 cel/pozo aproximadamente.

Las placas donde se sembraron los productos de la fusión permanecieron en incubación a 37 °C con 5 % de CO₂ y 100 % de humedad durante 2 meses.

7.6. Mantenimiento de Hibridomas.

Cinco días después de la fusión se revisaron los cultivos y se registraron las condiciones en las que se encontraban. De 10 a 15 días después de la fusión se alimentaron nuevamente los cultivos adicionando 50 µl de medio para hibridomas a cada pozo y se procedió a la búsqueda e identificación de hibridomas.

7.7. Identificación y expansión de hibridomas productores de anticuerpos.

Todos los pozos de cada placa fueron revisados periódicamente con la finalidad de localizar hibridomas en crecimiento. A nivel microscópico se observó el crecimiento celular y el medio se volvió amarillo debido al metabolismo presente en ese pozo. Cuando la confluencia celular en los pozos fue igual o superior al 30% se tomó una muestra de 100 μ l de sobrenadante a la cual se le realizó una prueba de ELISA por captura de anticuerpo para saber si el hibridoma era secretor de anticuerpos capaces de detectar epítopos de la molécula morfina.

Cuando se detectaron muestras positivas en los inmunoensayos se realizó una expansión clonal a través de diferentes ciclos de dilución y expansión celular.

Para obtener anticuerpos monoclonales es necesario que los hibridomas tengan un mismo origen, es decir, que desciendan de una sola célula. Para esto fue necesario hacer una dilución limitante rápida siguiendo el protocolo de Harlow y Lane (1988). Cuando se detectaron hibridomas inmunopositivos a morfina se tomaron 100 μ l de la suspensión celular y se diluyeron en 600 μ l de medio de cultivo para hibridomas enriquecido con factores tróficos, esta dilución se sembró en 3 pozos nuevos en placas de 96. Este paso se repitió en los nuevos pozos hasta observar una densidad celular muy baja (de 1 a 10 células en cada pozo), se realizaron ensayos de ELISA a cada pozo con células en proliferación con la finalidad de comprobar la producción de anticuerpos contra morfina.

7.8. ELISA por captura de anticuerpo para la identificación de anticuerpos que reconozcan epítopos de la morfina y/o brazo espaciador.

El ratón utilizado para la fusión fue inmunizado con un inmunógeno formado por el hapteno morfina unido al acarreador toxoide tetánico mediante un brazo espaciador que genera una distancia de aproximadamente 20.15 Å. Fig.7.

Transcurrida la incubación se identificaron las muestras positivas porque mostraron en primera instancia una coloración ámbar. Se tomó una lectura de la absorbancia a 490nm en el lector automatizado de longitud de onda variable Epoch. Los resultados fueron registrados y se graficaron para su análisis.

Los hibridomas productores de anticuerpos que reconocen a la molécula de morfina y/o brazo espaciador se expandieron y criopreservaron.

7.9. Inmunoensayo para comprobar la especificidad únicamente hacia el epítipo inmunogénico de la morfina (sin brazo)

El objetivo de este ensayo fue identificar los hibridomas productores de anticuerpos que reconozcan solo epítipos de la molécula morfina. Se utilizó una fase sólida constituida por BSA unido a M6H sin brazo espaciador que genera una distancia de aproximadamente 8.96 Å entre las dos moléculas Fig.9.

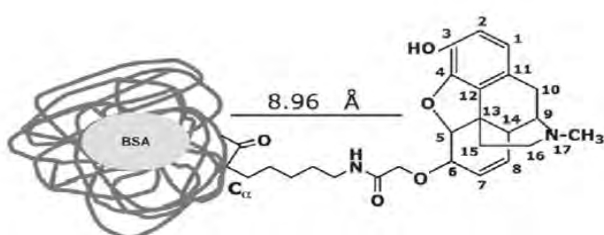


Fig. 9. Fase sólida sin brazo espaciador.

(Antón *et al.*, 2009)

Los pozos se lavaron 5 veces con buffer de ELISA, se aplicaron 100 μ l del sobrenadante a cada pozo y se incubaron durante 12 horas a 4 °C. Al terminar la incubación los pozos se lavaron 5 veces con solución amortiguadora y se le adicionaron 100 μ l del segundo anticuerpo comercial antiIgG de ratón conjugado con peroxidasa en buffer de ELISA (dilución 1:5000). Se incubaron durante 1 hora a 37 °C y se lavaron 5 veces con buffer de ELISA, se agregó el sustrato OPD protegiéndolo de luz y se dejó incubar 1 hora a temperatura ambiente. Se tomó lectura de la absorbancia a 490 nm con el equipo Epoch. Los resultados se registraron y se graficaron para su análisis.

7.10 Inmunoensayos de competencia a hibridomas positivos.

Como prueba adicional y para seleccionar la clona de hibridomas con mayor capacidad para secretar anticuerpos o con mayor actividad celular, se realizó una ELISA por captura de anticuerpo de competencia. En este ensayo se utilizó la fase sólida M6H unido a BSA con brazo espaciador.

Se sembraron 1×10^6 células de cada clona positiva en 10 ml de medio de cultivo y se cultivaron en las mismas condiciones durante 1 semana. Se tomaron 100 μ l de sobrenadante de cada clona y se colocaron durante 24 horas en presencia de los antígenos competidores: Morfina Base (MB), Sulfato de Morfina (SM), Morfina-6-hemisuccinato (M6H), Morfina-6-hemisuccinato-brazo (M6H-B) y Brazo (B) en concentraciones de 10 y 100 μ M.

Se aplicaron 100 μ l de la mezcla sobrenadante-competidor a cada pozo preparado con fase sólida y se incubaron durante 12 horas a 4 °C. Al terminar la incubación los pozos se lavaron 5 veces con buffer de ELISA y se le adicionaron 100 μ l del segundo anticuerpo comercial antiIgG de ratón conjugado con peroxidasa en buffer de ELISA (dilución 1:5000). Se incubaron durante 1 hora a 37 °C y posteriormente se lavaron 5 veces con buffer de ELISA, se agregó el sustrato OPD protegiéndolo de luz y se dejó incubar 1 hora a temperatura ambiente.

Transcurrido este tiempo se tomó lectura de la absorbancia a 490 nm con el equipo Epoch. Los resultados se registraron y se graficaron para su análisis.

7.11. Inmunoensayo de afinidad y reactividad cruzada con opiáceos y metabolitos secundarios.

Se realizó una prueba de ELISA para comprobar si los anticuerpos comparten afinidad hacia el epítipo estructural de la molécula morfina que tiene en común con otros productos opiáceos y metabolitos secundarios.

Se tomaron 100 μ l de sobrenadante de los hibridomas positivos para las pruebas anteriores y se colocaron durante 24 horas en presencia de los antígenos competidores: Sulfato de Morfina (SM), Heroína (H), 6-Mono-acetil-morfina (6MAM), 6-Glucurónido-Morfina (6GM), Morfina-6-hemisuccinato-brazo (M6H-B) y Metadona (MET) en concentraciones de 10 y 100 μ M.

Se aplicaron 100 μ l de la mezcla sobrenadante-competidor a cada pozo preparado con fase sólida y se incubaron durante 12 horas a 4 °C. Al terminar la incubación los pozos se lavaron 5 veces con buffer de ELISA y se le adicionaron 100 μ l del segundo anticuerpo antiIgG de ratón conjugado con peroxidasa en buffer de ELISA (dilución 1:5000). Se incubaron durante 1 hora a 37 °C y posteriormente se lavaron 5 veces con buffer de ELISA, se agregó el sustrato OPD protegiéndolo de luz y se dejó incubar 1 hora a temperatura ambiente. Transcurrido este tiempo se tomó lectura de la absorbancia a 490 nm con el equipo Epoch. Los resultados se registraron y se graficaron para su análisis.

7.12 Tipificación del anticuerpo monoclonal murino contra morfina.

Los anticuerpos se presentan en el organismo en diferentes formas clases o isotipos y dependiendo de esto difieren en sus propiedades, funciones, localización y capacidad para reconocer antígenos. Para determinar el isotipo de la inmunoglobulina secretada por el hibridoma positivo se realizó un ensayo utilizando un kit de tipificación (Thermo Fisher Scientific Inc).

En 9 pozos de una placa de 96 se adicionaron 50 μ l de una solución de antígeno preparada con 0.5 mg/ml de anticuerpos de cabra antiratón en PBS a un pH de 7.4 con 10 % de glicerol y 0.05 % de azida de sodio y se incubaron 2 horas a temperatura ambiente. Se vaciaron los pozos, se añadió 125 μ l de solución de bloqueo y se incubaron durante 1 hora a 37 °C. Se lavaron 4 veces con buffer de lavado (PBS y 50 % de Tween 20). Posteriormente se añadieron 50 μ l de sobrenadante de hibridoma a cada uno de los pocillos y se dejó en incubación durante 1 hora a 37°C.

Los pozos se lavaron 4 veces y se añadieron 50 μ l de anticuerpo específico de conejo antiratón a 8 de los pozos y 50 μ l de suero de conejo normal al control negativo. Se dejaron incubar durante 1 hora a 37 °C. Se lavaron los pozos y se añadieron 50 μ l del anticuerpo secundario de cabra anticonejo marcado con peroxidasa de rábano y se dejó incubar durante 1 hora a 37 °C. Transcurrido este tiempo se lavaron los pozos y agregaron 100 μ l del sustrato ABTS 1x a cada pocillo. Se dejó incubar durante 30 min a temperatura ambiente y se tomó lectura de la absorbancia a 405 nm con el equipo Epoch. Los resultados se registraron y se graficaron para su análisis.

8. Resultados.

8.1 Fusión celular

(A)

| Experimento de fusión celular | Resultados |
|--|----------------------|
| Células de bazo | 200 X10 ⁶ |
| Mielomas | 40 X10 ⁶ |
| Relación Células de bazo: mielomas | 5:1 |
| Número de pozos sembrados | 1248 |
| Hibridomas no formados | 1168 |
| Hibridomas formados | 80 |
| Hibridomas positivos para morfina-brazo | 12 |
| Hibridomas productores de anticuerpos monoclonales antimorfina | 1 |
| Eficiencia de fusión | 6.35% |

(B)

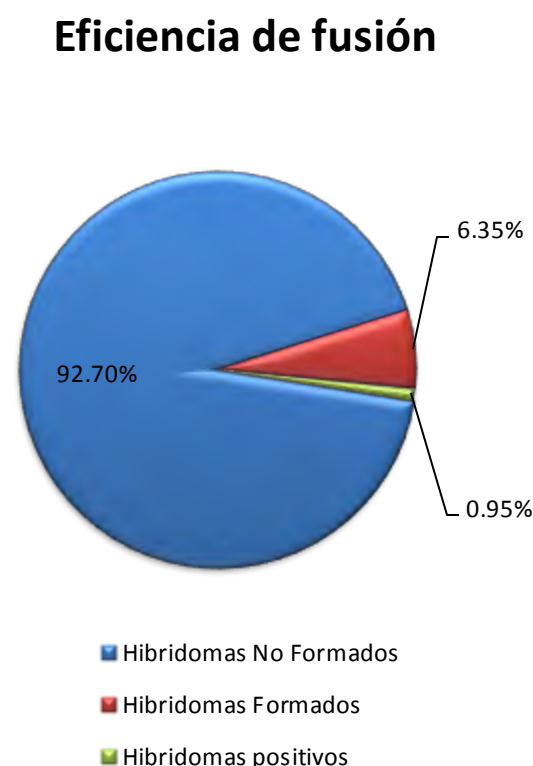


Fig. 10. Resumen de los resultados del experimento de fusión entre células de bazo activadas productoras de anticuerpos contra morfina y células murinas de mieloma múltiple (A) y gráfica donde se representa la eficiencia de fusión celular (B).

Se observa en la gráfica B de la figura 10 que el rendimiento de la fusión fue de 6.35% al haber detectado 80 poblaciones celulares en los pozos originales de fusión, esta búsqueda de hibridomas se realizó en un periodo de dos meses. De estos 80 hibridomas detectados solo 12 resultaron ser positivos hacia el complejo morfina-brazo espaciador pero solo 1 cumplió con todos los parámetros para ser expandido y criopreservado. Al ser considerado secretor de anticuerpos monoclonales antimorfina.

8.2. ELISA por captura de anticuerpo antimorfina realizado a hibridomas formados en el experimento de fusión celular.

Los 80 hibridomas detectados fueron ensayados mediante un ELISA por captura de anticuerpo cuando su densidad celular representó el 30% de confluencia en el pozo de fusión.

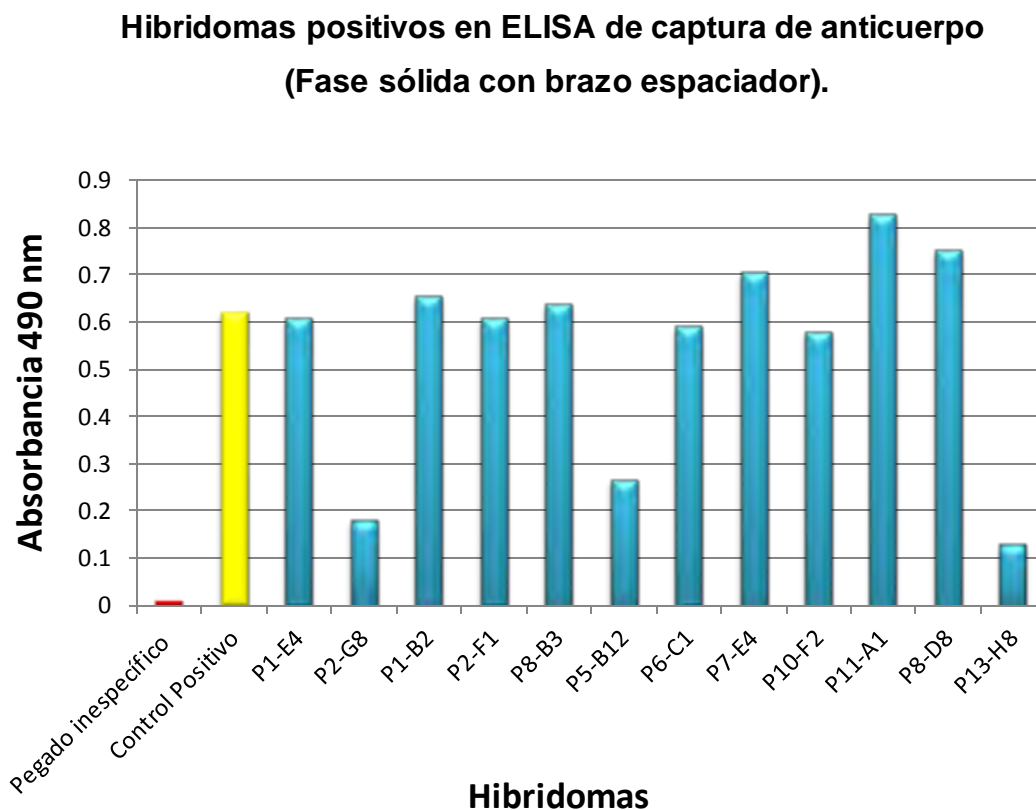


Fig. 11. Gráfica de absorbancia a 490 nm de los resultados de ELISA por captura de anticuerpo en un ensayo donde el antígeno adsorbido al pozo fue BSA acoplado a M6H mediante un brazo espaciador. Se observa de izquierda a derecha: la columna de pegado inespecífico donde no se aplicó muestra, la columna de control positivo que es un anticuerpo comercial antiM6H (QED Bioscience inc.) y las 12 muestras positivas de sobrenadante de hibridoma.

En la grafica de la figura 11 se muestra la absorbancia de los 12 hibridomas positivos detectados utilizando BSA-brazo-M6H como antígeno adsorbido al pozo. Estos hibridomas se sometieron a varios ciclos de dilución y expansión clonal asegurando así su origen monoclonal. Se puede observar que las clonas P2-G8, P5-B12 y P13-H8 representan una baja afinidad por la fase sólida del pozo, sin embargo se consideran positivos al tener la posibilidad de seguir produciendo anticuerpos pero en baja concentración. Las 68 muestras negativas de hibridomas formados fueron omitidas.

A continuación se presenta la grafica del ensayo realizado los 12 hibridomas positivos detectados pero esta vez utilizando BSA-M6H como antígeno adsorbido al pozo.

**Hibridomas positivos en ELISA por captura de anticuerpo
(Fase solida sin brazo espaciador).**

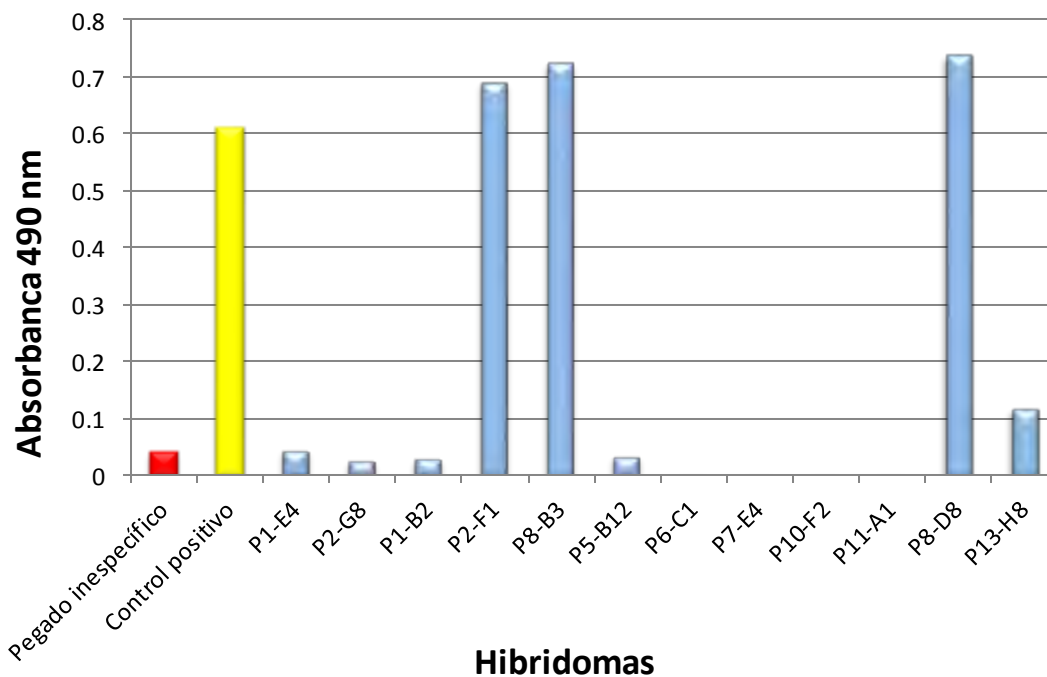


Fig. 12. Gráfica de absorbancia a 490 nm donde se exponen los resultados de ELISA por captura de anticuerpo en un ensayo donde el antígeno adsorbido al pozo fue BSA acoplado a M6H sin brazo espaciador. Se observa la columna de pegado inespecífico donde no se aplicó muestra, el anticuerpo comercial antiM6H (QED Bioscience inc.) y las 12 muestras positivas de sobrenadante de hibridoma.

Existe la posibilidad de que los anticuerpos producidos por estas 12 clonas de hibridoma tengan afinidad por la morfina, por el brazo espaciador o por ambos, para descartar esa posibilidad y para asegurar la especificidad del anticuerpo hacia el epítipo inmunogénico de la morfina se realizó una ELISA por captura de anticuerpo a las 12 clonas obtenidas, pero esta vez el antígeno adsorbido al pozo fue BSA-M6H. La corta distancia entre BSA y M6H genera una disposición espacial del antígeno donde solo queda expuesta la región nitrogenada y el núcleo fenantrénico de la morfina para su unión con los anticuerpos monoclonales. En la figura 12 se pueden ver las 9 muestras negativas y las 3 muestras positivas: P2-F1, P8-B3 y P8-D8.

8.3. ELISA de competencia a hibridomas positivos antimorfina.

Mediante un inmunoensayo se compitió al anticuerpo monoclonal con sustancias sintéticas derivadas de la morfina. Esto se realizó utilizando los competidores en suspensión: Morfina Base (MB), Sulfato de Morfina (SM), Morfina-6-hemisuccinato (M6H) y Morfina-6-hemisuccinato-brazo (M6H-B) ya que estas sustancias comparten similitudes en su estructura. También se utilizó el brazo (B) como competidor no antigénico y la clona P2-G8 como control negativo.

El ensayo de competencia se realizó sometiendo los 3 anticuerpos positivos antimorfina a dos fases de comparación: la primera con el sobrenadante enriquecido de anticuerpos directo sobre el pozo de ELISA con antígeno BSA-M6H en su fase sólida. La segunda fase se realizó exponiendo previamente el sobrenadante a competidores morfínicos en suspensión con la finalidad de formar el complejo antígeno-anticuerpo previo al inmunoensayo en fase sólida.

Los resultados de este ensayo se presentan en la figura 13. La fase sólida antigénica fue BSA-M6H.

Hibridomas positivos P2-F1, P8-B3, P8-D8 y control negativo P2-G8 en competidores: Morfina Base (MB), Morfina-6-hemisuccinato (M6H) y Morfina-6-hemisuccinato-brazo (M6H-B) a 10 μ M.

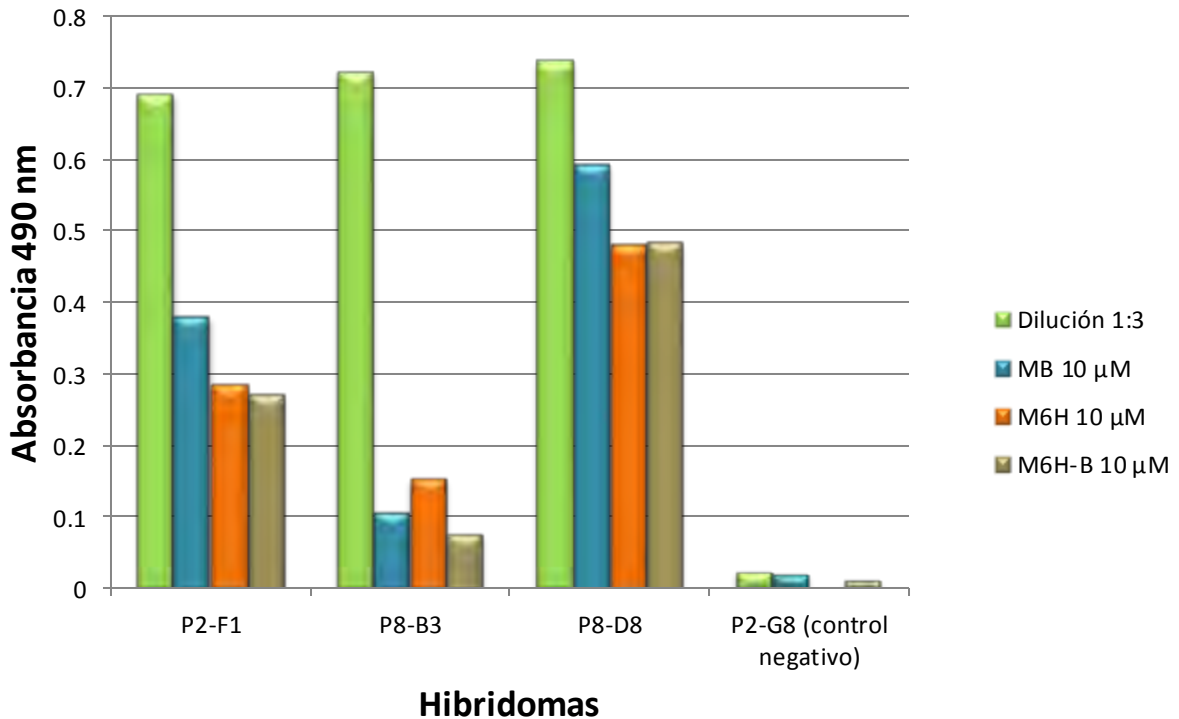


Fig. 13. Gráfica de absorbancia a 490 nm donde se muestran los resultados de ELISA de competencia realizados a las tres clonas productoras de anticuerpos contra morfina.

En la grafica de la figura 13 se observa que la primera columna de cada clona representa la primera fase donde se muestra la absorbancia mas alta que indica la unión de los anticuerpos a toda la fase solida del pozo. Las siguientes columnas representan la unión de los anticuerpos “libres” resultantes de la competencia con los compuestos morfínicos: MB, M6H y M6H-B a 10 μ M. El máximo pegado a la fase solida del pozo en cada etapa del ensayo esta representado por la clona P8-D8 indicando una gran cantidad de anticuerpos “libres” después de la competencia.

Hibridoma positivo P8-D8 y control negativo P2-G8 en competidores: Morfina Base (MB), Sulfato de Morfina (SM), Morfina-6-hemisuccinato (M6H), Morfina-6-hemisuccinato-brazo (M6H-B) y Brazo (B) a 10 y 100 μ M.

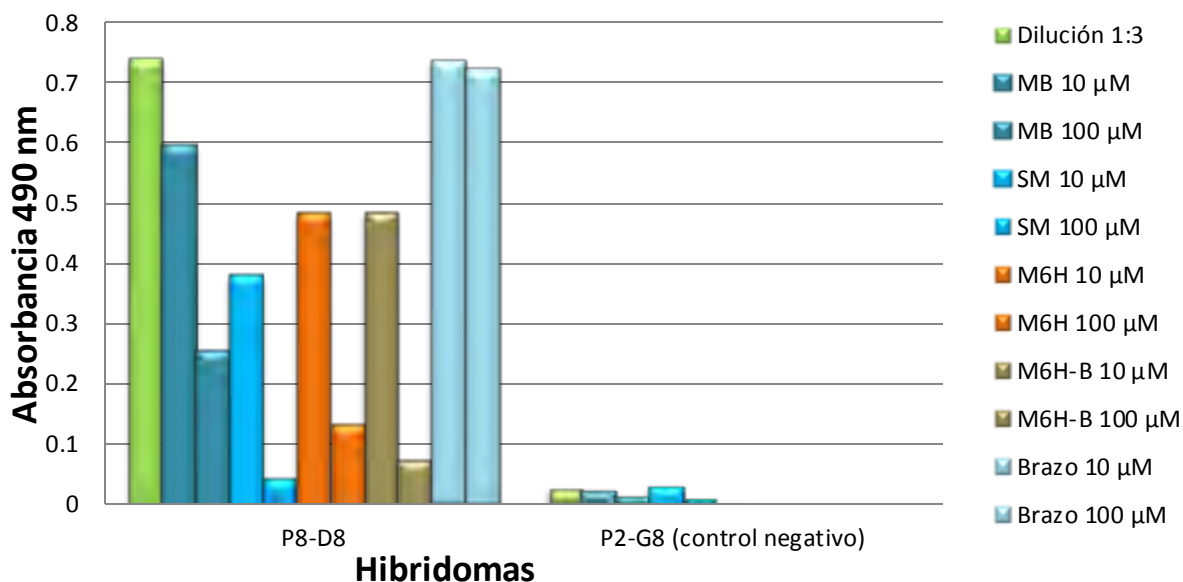


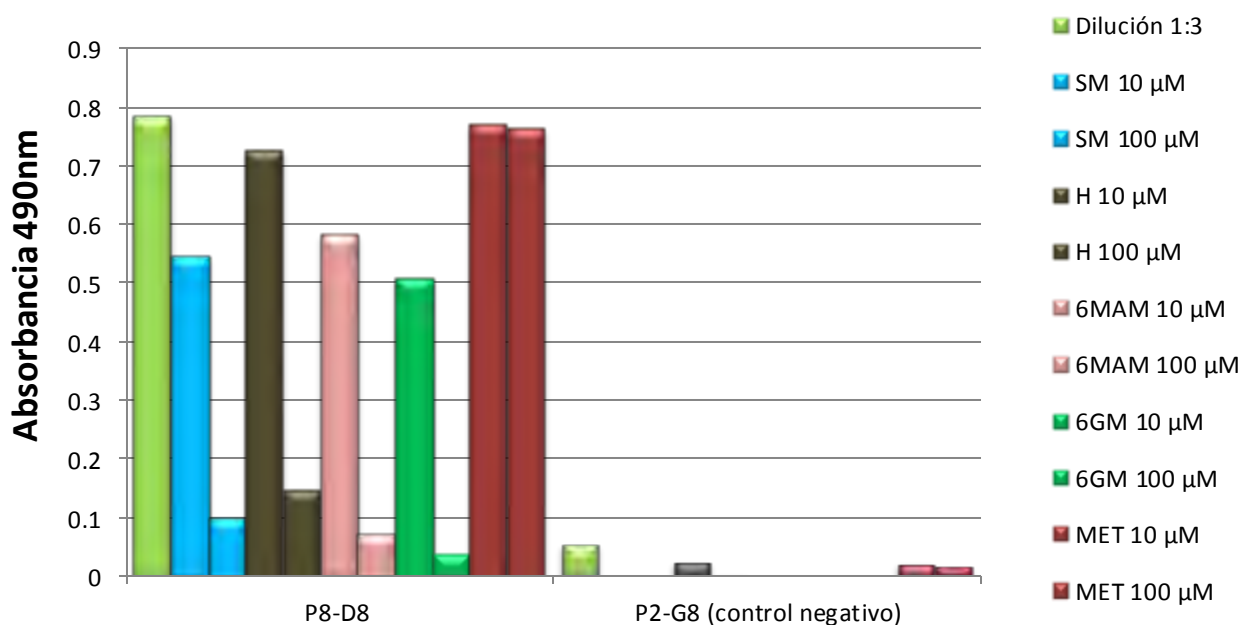
Fig.14. Gráfica de absorbancia a 490 nm donde se muestran los resultados de ELISA de competencia realizados a la clona P8-D8 que mostró la mejor capacidad para producir anticuerpos.

En la grafica de la figura 13 se observa la primera columna que es una dilución 1:3 del sobrenadante depositado directamente en el pozo sin competidor previo, posteriormente se observan las columnas donde los anticuerpos se compitieron previamente con las sustancias morfínicas en diferentes diluciones, se observa claramente que la tendencia de unión a la fase solida disminuye conforme se aumenta la concentración de competidor. Las ultimas dos columnas del anticuerpo P8-D8 muestran una unión total a la fase solida ya que los anticuerpos no tienen afinidad por el brazo espaciador utilizado como competidor.

8.4. Afinidad del anticuerpo producido por el hibridoma P8-D8 hacia productos derivados del opio y metabolitos secundarios.

La morfina es estructuralmente similar a otros productos derivados del opio y a algunos metabolitos secundarios generados por el metabolismo de estas drogas en el organismo. Para conocer la afinidad de los anticuerpos monoclonales producidos por P8-D8 se realizó una ELISA de competencia utilizando los opiáceos: Sulfato de Morfina (SM), Heroína (H) y Metadona (MET). También los metabolitos secundarios: 6-Monoacetil-Morfina (6MAM) y 6-Glucurónido-Morfina (M6G). La fase solida es BSA-M6H.

Hibridoma positivo P8-D8 y control negativo P2-G8 en competidores: Sulfato de Morfina (SM), Heroína (H), 6-Mono-acetil-Morfina (6MAM), 6-Glucurónido-Morfina (6GM) y Metadona (MET) a 10 y 100 μM .



Hibridoma productor de anticuerpos monoclonales

Fig.15. Gráfica de absorbancia a 490 nm donde se muestran los resultados de ELISA de competencia realizados a la clona de hibridoma P8-D8.

En la grafica de la figura 15 se presentan las absorbancias del antígeno adsorbido al pozo y la tendencia de disminución de absorbancia conforme se aumenta la concentración de competidor, también se observa que el anticuerpo no se une al competidor MET ya que la estructura de este opiáceo es diferente. Con estos resultados se comprueba la afinidad del anticuerpo monoclonal por los derivados opiáceos y sus metabolitos secundarios.

8.5. Curvas de dilución de competidores y reactividad cruzada con derivados opiáceos y metabolitos secundarios.

Con los resultados obtenidos en las ELISA de competencia se realizaron curvas de dilución para mostrar la tendencia inhibitoria de los anticuerpos.

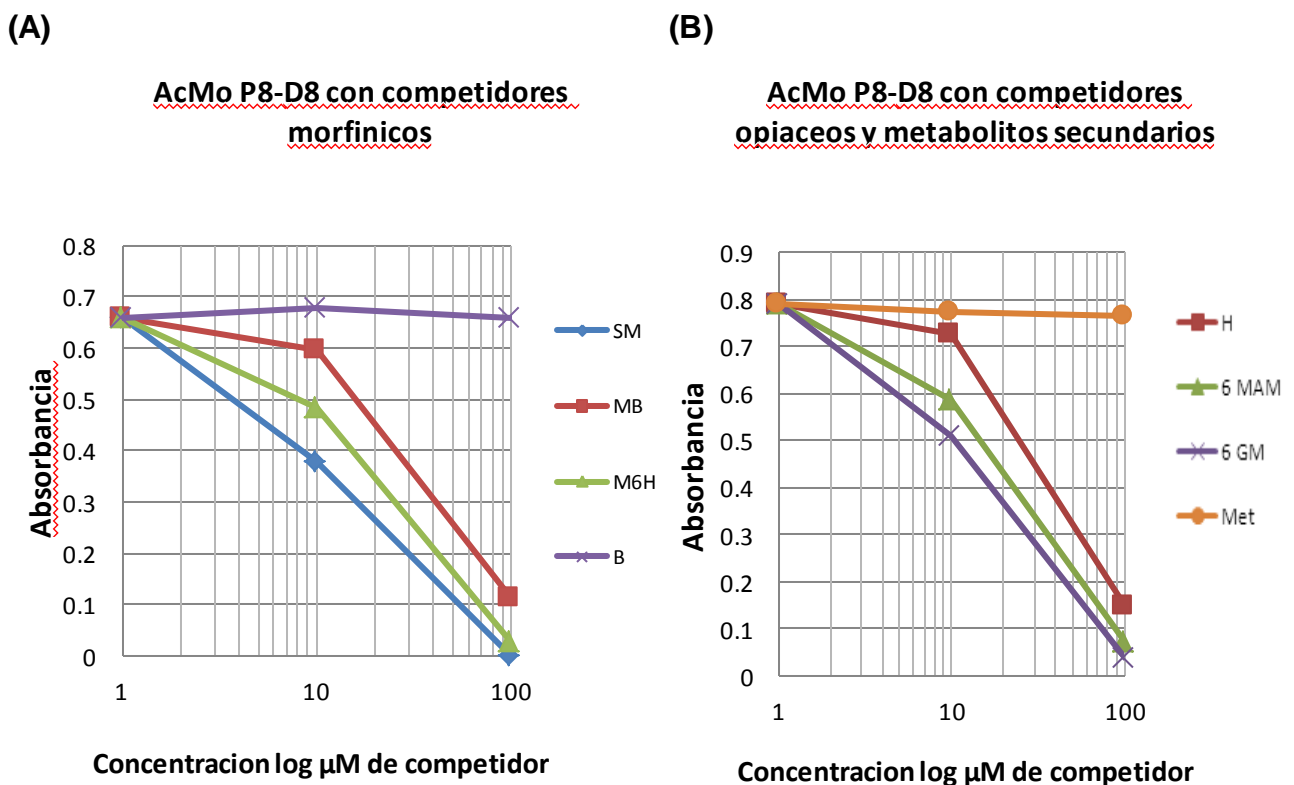


Fig.16. Curvas de dilución de competidores a concentraciones en escala logarítmica de 1, 10 y 100 μM en 100 μl de sobrenadante del hibridoma P8-D8.

Las curvas de dilución de competidores de la figura 16 muestran la tendencia de unión a la fase sólida antigénica del pozo, se puede ver claramente que a una concentración logarítmica de 10 μ M aún quedan anticuerpos en suspensión que se unen al antígeno, sin embargo a una concentración 10 veces mayor los anticuerpos libres están en una concentración mínima, por lo tanto la fase sólida del pozo presenta una absorbancia menor. También se observa la continuidad de unión al antígeno en fase sólida que tienen los anticuerpos al competirlos con brazo y con metadona ya que estas sustancias no son estructuralmente análogas a la morfina. Se considera el porcentaje de reactividad cruzada de 100% cuando se sigue la misma tendencia inhibitoria aunque su afinidad sea diferente. Para la metadona y el brazo espaciador se considera de cero. Los resultados de la competencia realizada con competidores morfínicos (A) y con opiáceos y metabolitos secundarios (B) muestran la misma tendencia.

8.6. Tipificación del anticuerpo monoclonal P8-D8.

Como ensayo adicional se realizó la tipificación del anticuerpo producido por el hibridoma P8-D8 mediante un kit de tipificación. La figura 17 muestra una absorbancia de 0.375 para la IgG₁ lo que revela el isotipo del anticuerpo P8-D8, también se observa respuesta para la cadena Kappa y Lamba, esto indica que el antígeno tiene afinidad para detectar la cadena ligera del anticuerpo pero no puede determinar la naturaleza de la cadena.

Para determinar el isotipo de la inmunoglobulina secretada por el hibridoma positivo se realizo un ensayo utilizando un kit de tipificación (Thermo Fisher Scientific Inc).

Anticuerpo monoclonal P8-D8

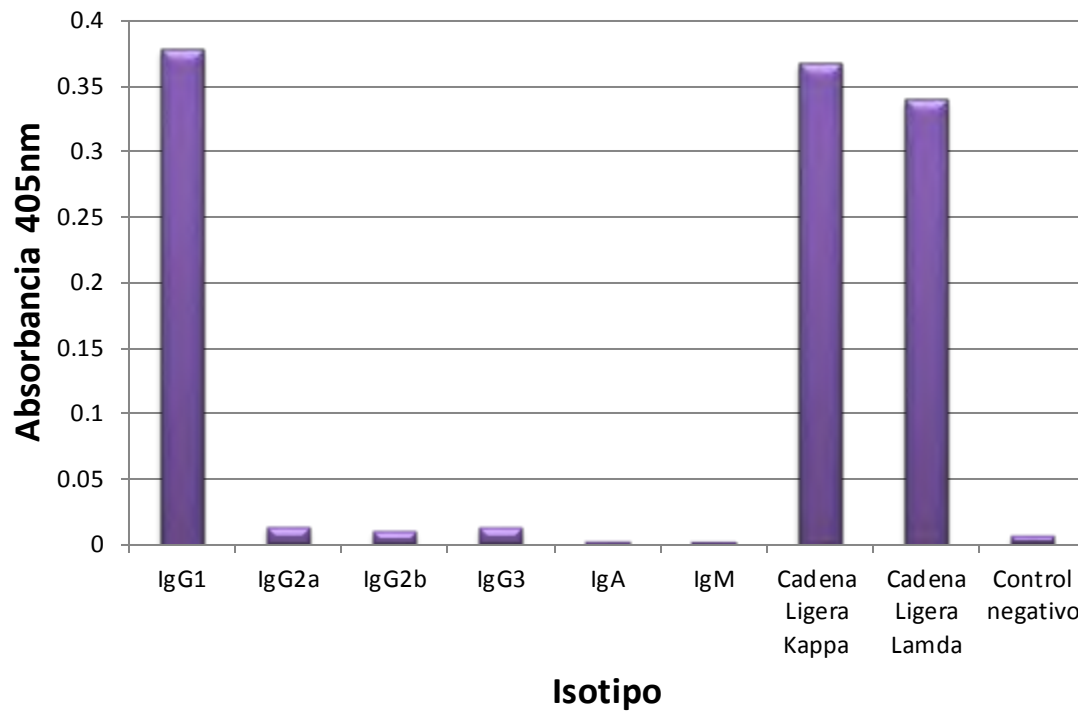


Fig.17. Gráfica de absorbancia a 405 nm de la tipificación del anticuerpo monoclonal producido por el hibridoma P8-D8 donde se puede observar que el isotipo del anticuerpo es IgG₁. También se observa la afinidad por la cadena ligera ya sea Kappa o Lamda.

9. Análisis de resultados.

Fusión celular.

Al fusionar células de mieloma con esplenocitos extraídos de un ratón inmunizado contra la morfina se logró la generación *in vitro* del hibridoma murino P8-D8 secretor de anticuerpos monoclonales con especificidad hacia la molécula morfina, este hibridoma adquirió las características de las células con las que fue formado, por lo tanto puede subcultivarse y crecer indefinidamente en cultivo sin perder la capacidad para producir la inmunoglobulina específica. Este resultado sigue la dinámica de formación de hibridomas descrito inicialmente por Köhler y Milstein en 1975.

La eficiencia de fusión con respecto al número de pozos sembrados fue de 80 hibridomas formados lo que indica un rendimiento de 6.35 % que es menor al 16 % esperado reportado en la literatura donde indica que de aproximadamente 200 poblaciones de hibridomas formados solo 5 a 10 clonas son productoras del anticuerpo de interés (Hockfield *et al.*, 1993). Fig. 10. El bajo rendimiento puede ser debido a que se sembraron las células a una alta densidad, aproximadamente 2×10^5 cel/pozo lo que pudo provocar poca disponibilidad de nutrientes y por lo tanto la muerte de algunas poblaciones celulares con poca capacidad proliferativa. Sin embargo, la adición del medio condicionado de timocitos al medio de cultivo para hibridomas aumentó la probabilidad del crecimiento de hibridomas con alta capacidad adaptativa y proliferativa ya que este medio contiene factores tróficos que inducen la activación del ciclo celular y la replicación.

Aunque la eficiencia de fusión fue del 6.35 % se logró la detección de 12 poblaciones de hibridomas productoras de anticuerpos inmunopositivos al compuesto constituido por morfina-brazo. Fig. 11.

La obtención de un gran número de clonas positivas indica la alta capacidad inmunogénica de la molécula MTT descrita por Antón y colaboradores en el 2009 y la correcta inmunización del ratón utilizado en el experimento.

Identificación de hibridomas productores de anticuerpos específicos hacia morfina.

En la fig. 12 se observa que 3 de los 12 hibridomas positivos mostraron una baja absorbancia en el ensayo de ELISA, estos fueron P2-G8, P5-B12 y P13-H8. Sin embargo se consideraron positivos al mostrar una débil respuesta ya que la baja absorbancia se puede deber diferentes factores: las células recién fusionadas aun no habían regulado su metabolismo y por esa razón no secretaban anticuerpos a la misma velocidad que las demás poblaciones celulares, también era posible que el deterioro de las células provocara la interrupción en la producción de anticuerpos y eventualmente las pruebas de ELISA mostrarían un resultado negativo, otra explicación para este fenómeno es que los esplenocitos no fusionados durante el experimento siguieran secretando anticuerpos al medio antes de su muerte natural y después de diluir las células en una mayor cantidad de medio de cultivo los vestigios de anticuerpos mostrarían una disminución de su respuesta en cada inmunoensayo hasta ser negativa.

La estructura y conformación espacial del inmunógeno MTT está diseñada con la idea de generar una mayor respuesta inmune en el organismo (Antón *et al.*, 2009). Para esto se considera el tamaño del brazo espaciador ya que una mayor distancia entre la morfina y el Toxoide Tetánico permite un mayor estímulo inmunológico, sin embargo al estar acoplado el brazo es posible los anticuerpos se dirijan hacia cualquier sitio del inmunógeno y especialmente hacia cualquier región de la molécula de la morfina o el brazo espaciador debido a la movilidad de la estructura.

Para aclarar los puntos anteriores y para asegurar la especificidad de los anticuerpos hacia la molécula de la morfina se realizó un segundo ensayo pero esta vez se utilizó el antígeno adsorbido al pozo BSA-M6H sin brazo espaciador. Una distancia menor entre BSA Y M6H permite que la morfina tenga una disposición espacial

presentando solamente la región del núcleo fenantrénico y la zona nitrogenada, esta característica estructural aumenta la probabilidad de que los anticuerpos se unan solo a esa región de la morfina.

Se observa que solo P2-F1, P8-B3 y P8-D8 son los hibridomas productores de anticuerpos monoclonales que expresan absorbancia. Las lecturas son altas lo que indica que los hibridomas produjeron una gran concentración de anticuerpos en cultivo celular al haber sembrado 1×10^6 cel/ml en frascos para cultivo de 50 ml.

Es posible que los hibridomas que resultaron negativos tengan afinidad por el brazo espaciador del inmunogeno o por una parte del brazo y una parte de la morfina, también existe la posibilidad de que vestigios de anticuerpo hayan quedado suspendidos en los pozos de fusión y los esplenocitos productores no fusionados murieran de manera natural, cualquiera de estas posibilidades retira estas clonas del experimento ya que no son específicos hacia la morfina. La clona P2-G8 se seleccionó como control negativo para las pruebas siguientes, la razón para seleccionar esta clona fue que eventualmente dejó de mostrar respuesta en los inmunoensayos, lo que indica que no produce anticuerpos dirigidos hacia ningún componente del inmunogeno y al haber sido clonada y expandida en las mismas condiciones que los demás hibridomas se considera un buen parámetro de comparación.

ELISA de competencia a hibridomas positivos anti-morfina: P2-F1, P8-B3 y P8-D8.

Para comparar correctamente las poblaciones celulares se realizaron cultivos en las mismas condiciones de tiempo, temperatura y número de células sembradas. En la fig. 13 se muestran los resultados de esta prueba.

Se determinó que la clona P8-D8 es la que secreta mayor cantidad de anticuerpos ya que aparentemente estos se unieron completamente a la fase de competidores en suspensión y los anticuerpos “libres” se unieron a gran parte de la fase sólida antigénica del pozo, sin embargo es posible que los anticuerpos no se hayan unido a los

competidores y por eso presenten una mayor respuesta en la fase solida, para descartar esta posibilidad se realizó un ensayo adicional a esta clona pero con una concentración mas alta de competidores en suspensión.

Los resultados de esta prueba están mostrados en la fig.14 donde se demuestra que a una dilución más alta de competidor quedan menos anticuerpos “libres” capaces de unirse a la fase solida y por lo tanto se presenta una menor absorbancia.

Anticuerpo monoclonal P8-D8.

Al haber cumplido el objetivo general de este proyecto que es la generación de un hibridoma productor de anticuerpos monoclonales con especificidad hacia la morfina, se procedió al estudio del hibridoma y del anticuerpo producido.

En esta fase del experimento fue posible comenzar a deducir la región de la morfina a la que se unen los anticuerpos monoclonales. Principalmente por la composición del hapteno ya que se ha comprobado en estudios de vacunación activa que la morfina es mas antigénica cuando esta acoplada al carbono 6 de manera que queda expuesta la zona del núcleo fenantrénico y el nitrógeno heterocíclico (Antón et al., 2009), además la región de la morfina donde se encuentra el sustituyente hidroxilo es poco antigénica y la respuesta inmunológica se genera en mayor proporción hacia compuestos aromáticos y compuestos no básicos (Fiorentino *et al.*, 1994). Por lo tanto la probabilidad de que se genere una respuesta inmune hacia esa zona es más alta.

Como se observa en la grafica de la fig.15, los competidores morfínicos a 10 μ M generan una absorbancia de entre el 60 y el 90 % comparado con la absorbancia de la muestra sin competidor y a una concentración de antígeno competidor 10 veces más alta se observa que los anticuerpos “libres” ocupan solo una pequeña parte de la fase solida. El control positivo que es una dilución 1:3 de sobrenadante sin competidor genera una absorbancia de 0.739 lo que representa la ocupación total del pozo. De la misma manera, cuando se utilizó el brazo espaciador como competidor se observa la ocupación total del

pozo ya que al tener respuesta específica hacia morfina, el anticuerpo se unió solamente a la fase sólida y no al competidor. En el control negativo P2-G8 no se observa respuesta en ninguna de las etapas del ensayo ya que estos hibridomas no producen anticuerpos específicos hacia morfina y por lo tanto se puede descartar la actividad cruzada en las pruebas.

Afinidad del anticuerpo monoclonal P8-D8 hacia derivados opiáceos y metabolitos secundarios.

Se puede observar en la gráfica de la fig. 16 la absorbancia en cada una de las diluciones de competidores a 10 y 100 μM lo que indica la afinidad de los anticuerpos monoclonales hacia la región estructural de la morfina que tiene en común los competidores opiáceos heroína y sulfato de morfina que son las principales sustancias de consumo humano. También se observa que los anticuerpos tienen afinidad por los metabolitos secundarios 6MAM y 6GM que son los que provocan los principales efectos en el organismo y son los generadores de la adicción ya que se unen con más facilidad a los receptores opioides.

Las reacciones cruzadas de los anticuerpos con las sustancias estructuralmente relacionadas a morfina pueden ser explicadas comparando el sitio del receptor opioide μ explicado por Brunton (Goodman *et al.*, 2011) donde se detalla que la selectividad de este receptor está directamente relacionada con la estructura fenantrena. Entonces existe la posibilidad de que los anticuerpos producidos por el hibridoma P8-D8 tengan selectividad por las estructuras que comparten el núcleo fenantrénico. Este resultado se sustenta al indicar que los competidores opiáceos y los metabolitos secundarios tienen sustituyentes únicamente en las posiciones 3 y 6 de la estructura, por lo tanto, al presentar una reacción positiva con los anticuerpos se deduce que independientemente de la conformación estructural de los antígenos en esas regiones, los anticuerpos pueden detectar la estructura directamente en la región fenantrénica y posiblemente en la región nitrogenada.

Aunque el derivado opiáceo metadona es un compuesto nitrogenado con propiedades similares a la morfina no genera respuesta de unión con los anticuerpos monoclonales, esto es debido a que su estructura no es similar a la morfina ya que no tiene núcleo fenantrénico, además el hecho de que la metadona tenga afinidad por los tres receptores opioides μ , δ y κ representa otra diferencia de la morfina que solo tiene afinidad por el receptor μ (Goodman *et al.*, 2011). Por lo tanto se aumenta la posibilidad de que los anticuerpos producidos por el hibridoma P8-D8 tengan la misma selectividad que el receptor μ .

La afinidad de los anticuerpos por cada una de estas sustancias es diferente como puede observarse en las graficas de absorbancia, esto se debe a que cada molécula tiene diferente composición en las posiciones 3 y 6 lo cual genera una nube electrónica que puede afectar la interacción antígeno-anticuerpo. Sin embargo existe la posibilidad de que si se cambia algún sustituyente entre las posiciones de la morfina 2, 7, 13 y 17 los anticuerpos sean incapaces de unirse a esas moléculas ya que en general los anticuerpos reconocen cambios mínimos en las posiciones *orto*, *meta* y *para* en los anillos aromáticos de cualquier antígeno, principalmente cambios que tienen que ver con radicales ácidos (Fiorentino *et al.*, 1994). Esta afirmación favorece la idea de que los anticuerpos monoclonales producidos por el hibridoma P8-D8 son específicos a la región de la morfina que tiene en común con los demás opiáceos fenantrenos y con los metabolitos secundarios que conservan su núcleo fenantrénico y su nitrógeno heterocíclico intacto.

En base a estos resultados se calculó el porcentaje de reactividad cruzada que tiene el anticuerpo P8-D8 hacia los metabolitos secundarios y los derivados opiáceos el cual fue considerado del 100 % ya que los competidores presentan la misma tendencia de inhibición que la morfina a pesar de que lo hacen en concentraciones diferentes.

La metadona no reacciona con los anticuerpos por lo tanto su porcentaje de reactividad cruzada es cero. Al conocer este resultado es posible comenzar a predecir una de las funciones terapéuticas antiadictivas del anticuerpo monoclonal, ya que uno de los tratamientos mas utilizados es la sustitución de la adicción con metadona, es posible

alternar este tratamiento con la inmunización pasiva con el fin de desintoxicar el organismo y prevenir una recaída en la enfermedad al tener anticuerpos circulantes en plasma sanguíneo.

Tipificación del anticuerpo monoclonal P8-D8.

Conocer el isotipo del anticuerpo permite interpretar muchas de sus propiedades y funciones, ahora que se sabe que el anticuerpo P8-D8 es una IgG₁ podemos decir que es un anticuerpo que se transporta principalmente en plasma y líquido intersticial, y ya que las drogas opiáceas se transportan en sangre unidas a albumina, sería más rápida su interacción con el anticuerpo. Cuando la IgG₁ forma el complejo antígeno-anticuerpo permite efectuar funciones de eliminación por opsonización y excreción por vía urinaria o biliar a las cuales estaría sometida la droga opiácea al estar en contacto con los anticuerpos dentro del organismo (Goodman *et al.*, 2011).

Al formar el complejo antígeno-anticuerpo entre la morfina, los derivados opiáceos o los metabolitos secundarios y el anticuerpo monoclonal P8-D8 tipo IgG₁, comenzaría el proceso de opsonización mediante el cual la fracción Fab del anticuerpo se une al antígeno mientras que la fracción Fc se une al receptor Fc de un macrófago, de esta manera los antígenos son atraídos hacia el macrófago provocando su fagocitosis (Abbas *et al.*, 2011). Al disminuir la concentración de los fármacos en el organismo se facilita la eliminación de los metabolitos activos e inactivos mediante las vías renal y biliar. Evitando así las complicaciones de salud que conlleva la adicción.

10. Conclusiones

Se generó el hibridoma P8-D8 secretor de anticuerpos monoclonales con especificidad hacia algún fragmento estructural de la morfina que tiene en común con otros opiáceos y con metabolitos secundarios producidos en el organismo, posiblemente hacia la región del núcleo fenantrénico y el nitrógeno heterocíclico

Se identificaron y seleccionaron 12 hibridomas productores de anticuerpos contra morfina- brazo espaciador.

Mediante inmunoensayos se identificaron los hibridomas P2-F1, P8-B3 y P8-D8 que tienen especificidad hacia la molécula de la morfina.

Se seleccionó y proliferó la línea celular de hibridomas P8-D8 por su alta capacidad secretora de anticuerpos monoclonales.

Se comprobó que el anticuerpo monoclonal producido por el hibridoma P8-D8 tiene afinidad por los opiáceos: sulfato de morfina y heroína y por los metabolitos secundarios: 6-mono-acetil-morfina y 6-glucurónido-morfina.

Se descartó la posibilidad de que los anticuerpos tengan reactividad cruzada con derivados opiáceos que no comparten similitudes en la estructura fenantrénica de la morfina, en este caso la metadona.

La inmunoglobulina secretada por el hibridoma P8-D8 pertenece al isotipo IgG₁.

La línea celular de hibridoma P8-D8 fue criopreservada para dar seguimiento a su investigación y procesamiento.

11. Perspectivas

Se demostró que los anticuerpos producidos por el hibridoma P8-D8 tienen afinidad por el epítipo estructural de la morfina que tiene en común con otros productos derivados del opio como son la heroína y el sulfato de morfina que son las principales drogas de consumo humano. Además los anticuerpos también tienen afinidad por los metabolitos secundarios 6-monoacetil-morfina y 6-glucuronido-morfina que son los agentes causantes de la mayoría de efectos negativos en el organismo, entre ellos la farmacodependencia.

La inmunoglobulina secretada por el hibridoma P8-D8 pertenece al isotipo IgG₁ este dato permite establecer que los anticuerpos producidos son principalmente transportados en el torrente sanguíneo y en presencia del antígeno son capaces de facilitar la eliminación del fármaco principalmente por opsonización seguida de la excreción por vía renal o biliar.

La generación del hibridoma P8-D8 secretor de anticuerpos monoclonales contra la estructura de la morfina es de gran importancia en el ámbito de la investigación al posibilitar la producción de anticuerpos quiméricos o humanizados a partir de estos anticuerpos murinos para posteriormente contribuir en el desarrollo de un tratamiento biotecnológico contra la farmacodependencia, principalmente en el tratamiento de inmunización pasiva en caso de intoxicación por opiáceos.

De esta manera se aporta una herramienta para frenar el desarrollo de adicciones y las consecuencias individuales y sociales que conlleva este problema de salud.

12. Bibliografía.

- ABBAS A.K., Litchman A.H., Pillai S., 2011, Cellular and Molecular Immunology, 7^a Edición, *Elsevier*, U.S.A.
- ALMEIDA O.F.X., 1991, Neurobiology of opioids, 1^a edición, Ed. Springer, Berlin, Alemania.
- ANTÓN P.B., Salazar A., Flores A., Matus M., Marin R., Hernandez J.A., Leff P., 2009, Vaccines against morphine/heroin and its use as effective medication for preventing relapse to opiate addictive behaviors, *Human vaccines*, 5.4:214-229.
- BERG J.M., Tymoczko J.L., Stryer L., 2007, Bioquímica, 6^a edición, Ed. Reverte, México.
- BERGER M., Shankar V., Bafai A., 2002, Therapeutic applications of monoclonal antibodies, *American Journal of the Medical Sciences*, 324:14-30.
- BONESE K.F., Wainer B.H., Fitch F.W., Rothberg R.M., Schuster C.R., 1974, Changes in heroin self-administration by a rhesus monkey after morphine immunization, *Nature*, 252:708-710.
- BRADBURY M.W., Lightman L., 1990, The blood-brain interface, *Eye*, 4:249–254.
- BRUGGEMANN M., Caskey H.M., Teale C., Waldmann H., 1989, A repertoire of monoclonal antibodies with human heavy chains from transgenic mice, *Proceedings of the National Academy of Sciences, U.S.A.*, 86:6709-6713.
- COLIGAN J.E., Margulies H., 2005, Short Protocols in Immunology: A Compendium of Methods from Current Protocols in Immunology, 1^a edición, Ed. John Wiley & Sons, U.S.A.
- FAZECAS S., Scheidegger D., 1980, Production of monoclonal antibodies strategies and tactics, *Journal of Immunology Methods, Elsevier*, 35:1-21.
- FIORENTINO G.S., Rueda A. N., 1994, La inmunología en el diagnóstico clínico, 1^a edición, Ed. Universidad Javeriana, Colombia.

- GARCÍA A.M., 2010, Anticuerpos monoclonales. Aspectos básicos, Universidad Autónoma de Madrid, *Elsevier*, España, Pp. 301-306.
- GARCÍA R.O., Secades V.O., Álvarez R.H., Río R.A., 2007, Efecto de los incentivos sobre la retención en un tratamiento ambulatorio para adictos a la cocaína, *Psicothema*, 19:134-139.
- GARCÍA T. F., 1997, Fundamentos de inmunología, 1ª edición, Facultad de Química colección: textos universitarios, UNAM, México.
- GIL P.E., 2011, Cultivo de Células Animales y Humanas, Aplicaciones en medicina regenerativa, Ed. Visión Libros, Madrid, España.
- GOODMAN G.A., Rall W.T., Nies S.A, Taylor P., 2011, Goodman and Gilman's, The Pharmacological Basis of Therapeutics, 12ª edición, Ed. The McGraw-Hill, U.S.A.
- HARLOW E., Lane D., 1988, Antibodies A laboratory manual, 2ª edición, Ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, U.S.A.
- HEYWORTH C.M., Testa N.G., Buckle A.M., Whetton A.D., 1997, Growth factors and the regulation of hemopoietic stem cells, Ed. CS Potten, New York, Academic Press.
- INSTITUTO DE ESTADÍSTICA DE LA COMISIÓN EUROPEA, 2008, Eurobarómetro, Flash Eurobarometer, No. 233.
- HOCKFIELD S., Carlson S., Evans C., Levitt P., Pintar J., Silberstein L., 1993, Molecular Probes of the Nervous System: Selected Methods for Antibody and Nucleic acid Probes. Vol. 1 New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- KAHAN B.D., Rajagopalan P. R., Hall M., 1999, Reduction of the Occurrence of Acute Cellular Rejection Among Renal Allograft Recipients Treated With Basiliximab, A Chimeric Anti-Interleukin-2-Receptor Monoclonal Antibody, *Official journal of the transplantation society*, 67:276-284.
- KINDT J.T., Goldsby A.R., Osborne, A.B., 2007, Kuby Immunology, 6a edición, Ed. Mcgraw-Hill Interamericana.

- KÖHLER G., Milstein C., 1975, Continuous cultures of fused cell secreting antibody of predefined specificity, *Nature*, 256:495-497
- LATORRE R., Barneo L.J., 1996, *Biología y Fisiología celular*, Ed. Universidad de Sevilla. Numero 9, Serie Ciencias. España.
- LÓPEZ M.F., Álamo G.C., 2007, *Historia de la Psicofarmacología*, Volumen 1, Ed. Médica Panamericana, Madrid, España.
- MANSOUR A., Fox C.A., Burke S., Meng F., Thompson R.C., Akil H., 1994, Mu, delta and kappa opioid receptor mRNA expression in the rat CNS: an in situ hybridization study, *Comp. The Journal of comparative Neurology*, 350:412-438
- MARTELL A.B., 2009, Cocaine vaccine for the treatment of cocaine dependence in methadone-maintained patients, *Archives of General Psychiatry*, U.S.A. 66:1116-1123.
- MCLAUGHLIN P., Grillo L.A.J., 1998, Rituximab chimeric anti-CD20 monoclonal antibody therapy for relapsed indolent lymphoma: half of patients respond to a four-dose treatment program, American Society of Clinical Oncology, *Journal of Clinical Oncology*, U.S.A., 16:2825-2833.
- Milstein C., 1980, Monoclonal antibodies, *Scientific American*, 243:66-74.
- MONTOYA D.I., 2008, Immunotherapies for drug addictions, *Adicciones*, U.S.A. 20:111-116.
- MURIEL V., 2007, *Dolor Crónico. Diagnostico, clínica, tratamiento*, 1ª edición. Ed. Aran SL, España.
- OMS, 1969, World Health Organization, Technical Report Series (Sixteenth report of the WHO Expert Committee on Drug Dependence). Geneva: World Health Organization, 407:5-14.
- PEAKMAN M., Vergani D., 2011, *Inmunología: básica y clínica*, 2ª edición, Elsevier, España.

- RABINOVICH G.A., 2004, Inmunopatología molecular: nuevas fronteras de la medicina, un nexo entre la investigación biomédica y la práctica clínica. 1ª edición, Ed. Médica panamericana, Buenos Aires, Argentina.
- ROMOND H.E., Perez A. E., Bryant Ph.J., 2005, Trastuzumab plus Adjuvant Chemotherapy for Operable HER2-Positive Breast Cancer, *The New England Journal of Medicine*, 353:16.
- SECRETARIA DE SALUD, 2011, Comisión Nacional Contra las Adicciones, Programa Contra la Farmacodependencia, Actualización 2011-2012, 1ª edición, México.
- SEIDENBERG A., 2000, Metadona, heroína y otros opioides, Ed. Díaz de Santos, Madrid, España.
- TROY B. D., 2006, Remington: The Science and Practice of Pharmacy, Ed. Lippincott Williams and Wilkins, U.S.A.
- UNODC, 2009, Oficina de las Naciones Unidas contra la Droga y el Delito Informe mundial sobre las drogas, Publicación de las Naciones Unidas, Nueva York, U.S.A.
- UNODCCP, 2002, Global illicit drug trends 2002, Oficina de las Naciones Unidas para el Control de las Drogas y la Prevención del Delito, Nueva York, U.S.A.
- VEGA R., 2005, Opioides: Neurobiología, usos médicos y adicción, Elementos: Ciencia y cultura, Vol. 12, No. 60, México.
- WAYNE M.Y., 1999, Current Protocols in Cell Biology, John Wiley & Sons Inc.
- ZOLA H., Thomson P.R., 2001, Monoclonal Antibodies: Diagnostic Uses, Encyclopedia of life sciences, McMillan Publishers Ltd. Nature Publishing.