



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES

CUAUTITLÁN

**PRODUCCIÓN DE ANTICUERPOS MONOCLONALES
CONTRA EL FLAGELO z15 DE *Salmonella* Dahlem**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA

PRESENTA:

JAQUELIN RODRÍGUEZ VALADEZ

ASESORAS:

Q.F.B. OLGA MATA RUÍZ

M. en C. ANDREA ÁNGELA BECERRIL OSNAYA

Q.B.P. ALTAGRACIA VILLANUEVA ZAMUDIO



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.

ÍNDICE

ÍNDICE DE FIGURA.....	4
ÍNDICE DE TABLAS	5
ÍNDICE DE GRÁFICAS	6
ABREVIATURAS	7
1. INTRODUCCIÓN	9
1.1 Propiedades del género <i>Salmonella</i>	9
1.2 Estructura antigénica	10
1.3 Clasificación género <i>Salmonella</i>	13
1.4 Métodos de diagnóstico	17
1.5 Epidemiología.....	19
1.6 Inmunoglobulinas	20
1.7 Anticuerpos monoclonales	23
2 .OBJETIVO GENERAL	26
2.1 Objetivos específicos	26
3.HIPÓTESIS	26
4. JUSTIFICACIÓN	27
5. MATERIAL	28
5.1 Animales	28
5.2 Medios de cultivo celular	28
5.3 Cepas	28
5.4 Líneas celulares	28
5.5 Material de laboratorio	28
5.6 Equipo de laboratorio	29
5.7 Reactivos	29

6. METODOLOGÍA	30
6.1 Inmunización	31
6.2 ELISA Indirecto	32
6.3 Fusión Celular	33
6.4 Selección Bioquímica	35
6.5 Clonación.....	35
6.6 Proliferación in vitro.....	36
6.7 Determinación de subclases de anticuerpos de ratón por ELISA.....	36
6.8 Purificación de Anticuerpos	37
6.9 Cuantificación de Proteínas.....	38
6.10 Concentración por ultrafiltración.....	39
6.11 InmunoElectroTransferencia	40
7. RESULTADOS	44
7.1 Inmunización	44
7.2 Fusión celular y selección de hibridomas positivos	44
7.3 Clonación y subclonación.....	46
7.4 Determinación de clase y subclase de anticuerpo	52
7.5 Purificación de anticuerpos	53
7.6 AcMo purificado, probado en ELISA indirecto	55
7.7 Concentración por medio de un equipo de ultrafiltración MILLIPORE.....	56
7.8 InmunoElectroTransferencia	57
8. DISCUSIÓN	59

9. CONCLUSIONES	62
10. PERSPECTIVAS.....	63
11. BIBLIOGRAFÍA	64
12. ANEXO I	67
13. ANEXO II.....	72

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura No.1 Fotografía de <i>Salmonella</i> Dahlem con tinción de Gram (-), observada a 100X	9
Figura No. 2 Fórmulas antigénicas de la serología de <i>Salmonella</i> Dahlem, localizada en el recuadro amarillo.....	16
Figura No. 3 Clases de inmunoglobulinas humanas	20
Figura No. 4 Características de las Ig de ratón.....	21
Figura No. 5 Características de las Ig humanas	23
Figura No.6 Esquema de producción de anticuerpos monoclonales.....	30
Figura 7. Kit de ultrafiltración MILLIPORE PROSEP-A KIT Cat.No. LSK2ABA2	39
Figura 8. (A) Western blot en condiciones reductoras, donde se probaron en el carril 2 y 3 los AcMo obtenidos y en el carril 4 y 5 dos hibridomas negativos, el carril 6 medio de cultivo celular y en el 7 suero hiperinmune del ratón diluido 1:1000.	57
Figura 9. (B) Western blot en condiciones no reductoras, donde se probaron en el carril 2 y 3 los AcMo obtenidos y en el carril 4 y 5 dos hibridomas negativos, el carril 6 medio de cultivo celular y en el 7 suero hiperinmune del ratón diluido 1:1000.	57

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla No.1 Esquema de inmunización para la obtención de AcMO contra el flagelo z15 de <i>Salmonella</i> Dahlem.....	31
Tabla No. 2 Calendario para selección de hibridomas positivos	35
Tabla No. 3 Muestra la preparación de la curva de concentración de Albúmina Sérica	38
Tabla No. 4 Preparación del gel separador	40
Tabla No. 5 Preparación del gel concentrador.....	40
Tabla No 6. Resumen de resultados	51
Tabla No.7 Resumen de los resultados obtenidos del anticuerpo monoclonal purificado, concentrado y evaluado por ELISA Indirecto.	56

ÍNDICE DE GRÁFICAS

Gráfica No.1 Muestra la respuesta inmunológica de los ratones inmunizados con antígeno flagelar z15 así como del ratón preinmune, determinada mediante ELISA indirecto.	44
Gráfica No.2 Primera determinación de anticuerpos anti-z15 de <i>Salmonella</i> Dahlem por el método de ELISA indirecto	45
Gráfica No.3 Segunda determinación de anticuerpos anti-z15 del flagelo de <i>Salmonella</i> Dahlem, por ELISA indirecto.....	46
Gráfica No. 4 Determinación de anticuerpos anti-z15 de <i>Salmonella</i> Dahlem por ELISA indirecto en clonas	47
Gráfica No.5 Determinación de Anticuerpos anti-z15 de <i>Salmonella</i> Dahlem por ELISA indirecto en clona 2C11B6	48
Gráfica No.6 Determinación de anticuerpos anti-z15 de <i>Salmonella</i> Dahlem, por ELISA indirecto en clona 2C11B6H8	48
Gráfica No.6 Determinación de anticuerpos anti-z15 de <i>Salmonella</i> Dahlem, por ELISA indirecto en clona 2C11B6H8	49
Gráfica No.8 Determinación de anticuerpos anti-z15 de <i>Salmonella</i> Dahlem, por ELISA indirecto en clonas de 2C11C5F8.....	50
Gráfica No.9 Determinacion de anticuerpos anti-z15 de <i>Salmonella</i> Dahlem, por ELISA indirecta en clonas de 2C11C5G12	51
Gráfica No.10 Caracterización de subclases IgG (ELISA de Captura, sobrenadantes sin dilución).....	52
Gráfica No.11 Caracterización de subclases IgG (ELISA de Captura, sobrenadantes con dilución 1:2).....	53
Gráfica No.12 Muestra el patrón de separación en la obtención de anticuerpos puros.	54
Gráfica 13. Cuantificación de proteínas sin contemplar la dilución	55
Gráfico 14. Muestra el efecto que tienen las diluciones dobles seriadas con la disminución en la reactividad del AcMo contra el Ag flagelar z15 de <i>Salmonella</i> Dahlem	56

ABREVIATURAS

Ag	Antígeno
(O)	Somático
(H)	Flagelar
(Vi)	Capsular
DNA	Ácido Desoxiribo Nucleico
CDC	Centro de Control de Enfermedades
BALB/c	Bagg Albinos
(TSI)	Agar Hierro Triple Azúcar
RM- VP	Rojo de Metilo- Voges Proskauer
LIA	Agar Hierro Lisina
MIO	Motilidad, Indol, Ornitina
Ig	Inmunoglobulinas
IgG	Inmunoglobulinas clase G
IgA	Inmunoglobulinas clase A
IgE	Inmunoglobulinas clase E
IgD	Inmunoglobulinas clase D
IgM	Inmunoglobulinas clase M
UFC	Unidades Formadoras de Colonias
ACF	Adyuvante Completo de Freud
AFI	Adyuvante Incompleto de Freud
IP	Intraperitoneal
IV	Intravenosa
AcMo	Anticuerpos Monoclonales

ELISA Ensayo Inmuno Absorbente Ligado a Enzimas

D.O. Densidad Óptica

PBS Solución Buffer de Fosfatos

RPMI Roswell Park Memorial Institute Medium

PEG Polietilenglicol

HAT Hipoxantina, Aminopterina y Timidina

HT Hipoxantina Timina

T.A. Temperatura Ambiente

DEMEM Medio Mínimo Esencial de Eagle modificado por Dulbecco

PAGE Electroforesis en Geles de Poliacrilamida

SDS Dodecil Sulfato de Sodio

APS Persulfato Amónico

TEMED Tetra Metil Etilen Diamina

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Propiedades del género

La Tribu *Salmonelleae* contiene el único género *Salmonella*, Orden *Enterobacteriales* y la familia *Enterobacteriaceae*, que reciben el nombre del microbiólogo estadounidense Daniel Elmer Salmon(1850-1914). (Koneman, 2008). Está compuesto por bacilos Gram negativos, (ver Fig.1.) generalmente móviles por flagelos peritricos, anaérobios facultativos no esporulados y se definen por sus propiedades bioquímicas. Las salmonellas son las enterobacterias más complejas, con más de 2 400 serotipos descritos en el esquema actual de Kauffmann-White. (Koneman, 2008). El género *Salmonella* presenta una serie de propiedades metabólicas que permiten diferenciarlo de las restantes enterobacterias. (Koneman, 2008).

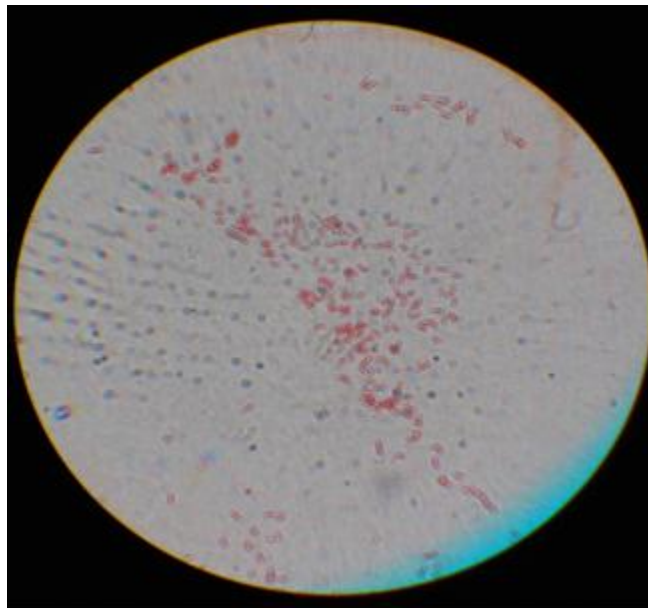


Figura No.1 Fotografía de *Salmonella* Dahlem con tinción de Gram (-), observada a 100X.

1.2 Estructura antigénica

Como todas las enterobacterias, el género *Salmonella* tiene tres tipos de antígenos: somático (O), flagelar (H) y capsular para *Salmonella* (Vi). (Katime, 2006).

- **Antígenos Somaticos (O)**

Están compuestos por complejos de fosfolípidos y polisacáridos; su composición es aproximadamente: 60% polisacáridos, 20-30% lípidos y 3,5-4% hexosamina. (Caffer M. I.Terragno R, 2001.)

El antígeno O es un lipopolisacárido termoestable, resistente a ácidos diluidos y alcohol, localizado en la pared celular. La fracción interna se encuentra asociada con la endotoxina (lípidos A) y la fracción externa o terminal es responsable de la especificidad serológica. Por tratamiento de suspensiones vivas por el calor se destruye el antígeno H y Vi, y se obtienen suspensiones puras de antígeno (O) que en presencia del anticuerpo específico producen una aglutinación lenta y granular que no se deshace por agitación (aglutinación somática). (Pumarola A. 1987)

La cadena de polisacáridos del Ag O es un polímero de unidades repetidas de oligosacáridos (de 3 a 5 azúcares) lineales o ramificados. La naturaleza de los grupos terminales y el orden en que se encuentran las unidades repetidas de la cadena determina la especificidad antigénica somática de la bacteria. Como esta estructura difiere ampliamente entre las distintas serovariedades, hay diferencias en la especificidad antigénica O.

La estructura somática se denomina con la letra O seguida de números arábigos separados por comas, que corresponden a sus factores, por ej. *S. Typhimurium* O: 1,4,5,12 ; *S. Enteritidis* O:1,9,12 Los Ag O se pueden clasificar de la siguiente manera:

- 1) Factores mayores que identifican el grupo antigénico O; por ej., el factor O: 4, el factor O:9.
- 2) Factores menores, que pueden ser:
 - a) Los que tienen poco o ningún valor discriminativo porque siempre están asociados a otro factor; por ej., O: 12 que siempre está asociado con O:2, O:4 y O:9, como se presenta en *S. Paratyphi A* O: 1,2,12; *S. Typhimurium* O: 1,4,5,12 y *S. Enteritidis* O: 1,9,12

b) Los que surgen como consecuencia de una modificación química de los Ag mayores; por ej., O:5 resulta de la acetilación de la abecucosa presente en las unidades repetidas del polisacárido responsable de la especificidad O:4,12; O:1 resulta de la inserción de un residuo de glucosa en la galactosa de la cadena de polisacárido, como es el caso de la serovariedad *S. Typhimurium* O:1,4,5,12(Caffer M. I.Terragno R, 2001.)

- **Antígeno flagelar (H)**

Es un antígeno termolábil, de naturaleza proteínica contenido en los flagelos. Se inactiva por el calor, alcohol y ácidos: por el contrario el tratamiento con formol fija los flagelos y se obtienen suspensiones de bacterias flageladas, que también contienen el antígeno O, pero por producirse la aglutinación con el antígeno H más rápidamente y al título más elevado, se comportan como suspensiones flageladas puras. La aglutinación flagelar es rápida en forma de grumos grandes, blandos y algodonosos, que rápidamente se deshacen por agitación. (Pumarola A. 1987)

El género *Salmonella* es único entre los miembros de la familia *Enterobacteriaceae*, debido a que comúnmente posee dos tipos de antígenos flagelares, los cuales son coordinadamente regulados por un mecanismo de variación de fases. Los genes responsables son *FliC* (antígenos flagelares fase 1) y *FljB* (antígenos flagelares fase 2). (Paniagua G. L. Monroy E. Vaca S. 2008)

De esta manera, sólo un antígeno flagelar es expresado en un tiempo. En el mecanismo de variación de fases se encuentra implicado el operón *fljBA*, el cual incluye al gen *hin* que codifica la Hin recombinasa; el gen *fljB* que codifica el flagelo fase 2 y el gen *fljA* que codifica un represor para el gen *fliC*.⁹ La Hin recombinasa cataliza la inversión reversible de un segmento de 993 pb del cromosoma que contiene un promotor para el operón *fljBA*. En una orientación, el promotor dirige la transcripción de los genes *fljB* y *fljA*, que inducen la represión del gen *fliC*. En la otra orientación de *hin*, *fljB* y *fljA* no son expresados, por lo que el antígeno flagelar fase 2 es apagado, y *fliC* es expresado nuevamente, seguido por la expresión del antígeno flagelar fase 1. Algunos de estos alelos son definidos por un solo factor (antígeno i, d, ó r): otros son definidos por varios subfactores (e.g., antígenos I,v,g,m y e,n,x). (Paniagua G. L. Monroy E. Vaca S. 2008).

Atendiendo al antígeno flagelar, las salmonelas pueden ser monofásicas, cuando contienen siempre el mismo antígeno flagelar, generalmente específico (*S. Typhi*, *S. Paratyphi A*), o bifásicas cuando el antígeno flagelar puede presentarse alternativamente en fase específica (fase 1) característica del serotipo, o en fase menos específica (fase 2), que puede ser común con otras *Salmonella*. Cuando se aísla una *Salmonella* en fase 2, generalmente es necesario proceder a una inversión de fase (método de Sven Gard) para reconocer el antígeno flagelar específico y llegar a la identificación del serotipo. (Pumarola A. 1987)

El flagelo es una estructura compleja que consiste en un cuerpo basal, un segmento de unión (“hook”) y un filamento. El cuerpo basal ancla el flagelo a la envoltura de la célula y el “hook” une el cuerpo basal con el filamento. En la serotipificación flagelar de *Salmonella* se usa solamente la especificidad antigénica del filamento. (Caffer M. I.Terragno R, 2001.)

El filamento está constituido por flagelina, proteína de alto peso molecular (40 000Daltones) (Ibrahim G., Fleet G., Lyonsm 1985) En *Salmonella* se han encontrado más de 60 especificidades antigénicas flagelares. Las diferencias antigénicas surgen debido a variaciones en la estructura primaria (contenido en aminoácidos y orden de ubicación) de las distintas moléculas de flagelina. (Caffer M. I.Terragno R, 2001.).

- **Antígeno capsular (Vi)**

Es un antígeno capsular termolábil, que presentan algunas especies recién aisladas (*S. Typhi*, *S. Paratyphi C*, *S. dublin*) responsable de la O-inaglutinabilidad. Por la adición de un suero Vi se produce una aglutinación lenta y granular más fina que la O (aglutinación Vi). Por tratamiento con el calor se destruye el antígeno Vi y la suspensión se hace aglutinable por un suero O. El antígeno Vi junto con el O, es el responsable de la virulencia, y los anticuerpos Vi presentan poder protector. ((Pumarola A. 1987)

1.3 Clasificación del género *Salmonella*.

Desde el momento del primer aislamiento del microorganismo del grupo *Salmonella* comunicado en 1884 por Gaffky (*Bacterium thyfosum*) y en 1886 por Salmon y Smith (*Salmonella Choleraesuis*) el desarrollo de la nomenclatura de las salmonelas ha sido muy complejo y es un tema de debate (Koneman, 2008)

Antes del 1º de julio de 1983, se utilizaban 3 especies de *Salmonella* para comunicar resultados positivos en el diagnóstico de la misma: *S. Choleraesuis*, *S. Thyphi* y *S. Enteritidis*, y la mayoría de los serotipos pertenecían a esta última especie. En la actualidad, se designan dos especies de *Salmonella* según su hibridación de DNA, *S. enterica* y *S. bongori*. *S. entérica* está dividida en las siguientes subespecies:

- I. *S. enterica* subsp. *enterica*
- II. *S. entérica* subsp. *salamae*

- IIIa. *S. enterica* subsp. *arizonae*
- IIIb. *S. enterica* subsp. *diaizonae*,

- VI. *S. entérica* subsp. *houtenae*

- V *S. bongori*

- VI. *S. enterica* subsp. *indica*.

Por lo tanto existen dos especies y seis subespecies de *S. entérica* en el sistema actual utilizados por los CDC (Koneman, 2008)

En la práctica cotidiana, las cepas desconocidas de muestras clínicas que sean sugestivas desde el punto de vista bioquímico de especies de *Salmonella* se confirman utilizando antisueros policlonales que contienen anticuerpos contra todos los subgrupos principales, los subcultivos de cepas confirmadas se remiten a laboratorios de salud pública, donde las designaciones de los serotipos (p.ej., *S. serotipo Thyphimurium*) se hace sobre base a las reacciones serológicas a los determinantes O y H. (Koneman, 2008).

En todos los casos los subgéneros especies o subespecies se pueden dividir a su vez en serotipos o serovares según el esquema de Kauffmann-White. (Guibourdenche M, Roggentin P, Mikoleit, 2010). (Ver fig. No. 2)

Clasificación en serotipos (esquema serológico de Kauffmann-White) comprende:

Primera columna: indica el nombre de la serovariedad, si la misma pertenece a *S. enterica* subesp. *enterica* (I) ó las siglas *S. II*, *S. IIIa*, *S. IIIb*, *S. IV*, *S. V*, *S. VI*; indicando que la serovariedad considerada pertenece a la subespecie II ó III a, entre otras.. (Caffer M. I.Terragno R. 2001,13,14)

Segunda columna: Antígenos somáticos (O). Los números indican el ó los factores del antígeno **O** y se escriben, separados por una coma. Las serovarietades son agrupadas en grupos somáticos, cada uno de ellos caracterizado por un factor **O** mayor. Así se determinan los grupos A, B, C, entre otros. (1,4,5,12:e,h:1,2), entre otras. (Caffer M. I.Terragno R. 2001,13,14)

El Esquema de Kauffmann-White presenta 67 grupos O, desde el grupo A hasta el Z y luego continúa con números, desde el O:51 hasta el O:67(Caffer M. I.Terragno R. 2001,13,14)

Tercera y cuarta columna: Antígenos flagelares (H). Se indican los factores de las fases 1 y 2, del antígeno **H**, respectivamente. Para la fase 1 los factores se denominan con letras minúsculas, seguidas algunas veces por un número que figura como subíndice y para la fase 2 se emplean en general números arábigos, aunque también se utilizan letras minúsculas. Un signo "negativo" indica que la fase considerada está ausente y por lo tanto la serovariedad es monofásica. (Caffer M. I.Terragno R. 2001,13,14)

Los símbolos para los factores somáticos determinados por conversión fágica están subrayados (por ej. 1,2,12) (Caffer M. I.Terragno R. 2001,13,14)

Los factores **O** o **H** entre corchetes, no subrayados, pueden estar presentes o ausentes sin relación con la conversión fágica. Por ej. factor [5] del grupo **O:4** (B). Cuando los factores **H** están entre corchetes significa que ellos se encuentran excepcionalmente en cepas salvajes. (Caffer M. I.Terragno R. 2001,13,14)

Ejemplos:

Salmonella Enteritidis 1,9,12:g,m:- [Ag O 1, 9,12; Ag H (fase 1) g,m; Ag H (fase 2) es -; la fase 2 está ausente, por lo tanto la serovariedad es monofásica].

Salmonella Typhimurium 1,4,5,12:i:1,2 [Ag O 1,4,5,12 ; Ag H (fase 1) i ; Ag H (fase 2) 1,2; las dos fases flagelares están presentes, por lo tanto la serovariedad es difásica].

Salmonella Typhi 1,9,12 [Vi]:d:-

D

Type	Somatic (O) antigen	Flagellar (H) antigen		
		Phase 1	Phase 2	Other
Daarle	6,8	y	e,n,x	
Dabou	8,20	z ₄ ,z ₂₃	l,w	
Dadzie	51	l,v	a,n,x	
Dahlem	48	k	e,n,z ₁₅	
Dahomey	47	k	1,6	[z ₅₉]
Dahra	17	b	1,5	
Dakar	28	a	1,6	
Dakota	16	z ₃₅	e,n,z ₁₅	
Dallgow	1,3,19	z ₁₀	e,n,z ₁₅	
Damman	6,7,14	a	z ₆	
Dan	51	k	e,n,z ₁₅	
Dapango	47	r	1,2	
Daula	8,20	z	z ₆	
Daytona	6,7	k	1,6	
Deckstein	9,46	r	1,7	
Delan	39	y	e,n,z ₁₅	
Delmenhorst	18	z ₇₁	-	
Demba	35	d	l,w	[z ₆₀]

Figura No. 2 Fórmulas antigénicas de la serología de *Salmonella* Dahlem, localizada en el recuadro amarillo.

Fuente: (Patrick A.D. Francois X. 2007)

1.4 Métodos de diagnóstico

En el laboratorio se emplean, métodos convencionales para la recuperación de *Salmonella* como: Preenriquecimiento, enriquecimiento, crecimiento en agares selectivos, pruebas bioquímicas y serotipificación. (Parra M, Durango J, Máttar S, 2002).

- **Preenriquecimiento**

Paso de gran importancia en la recuperación de *Salmonella spp.* Medio de preenriquecimiento líquido no selectivo: Agua Peptonada Tamponada. (Biarnés M.2011)

- **Enriquecimiento**

Medio de enriquecimiento selectivo semisólido; Rappaport Vassiliadis Semisólido Modificado (MSRV). Facilita la multiplicación e inhibe el crecimiento de gérmenes competitivos. (Biarnés M.2011)

- **Siembra e Identificación**

Medios selectivos sólidos como: Xilosa Lisina Desoxicolato (XLD) éste obligatorio y un segundo medio selectivo sólido como *Salmonella-Shigella* Agar Hektoen (HE) o el verde brillante (VB), los cuales inhiben flora acompañante y permiten el crecimiento y diferenciación de *Salmonella*. (Biarnés M.2011)

- **Confirmación bioquímica y serológica**

Bioquímicamente se utiliza una batería de pruebas: Agar Hierro Triple Azúcar (TSI) donde no fermentan lactosa, fermentan glucosa, producen ácido sulfhídrico y gas, son VP e Indol negativos, rojo de metilo y citrato positivos, son urea negativos, LIA y MIO positivos, entre las principales o bien con métodos comerciales como es la tira de API de BioMérieux Hazelwood, que consta de tubos de plástico con compartimentos que contienen agar con distintos sustratos y con una aguja en su interior que posibilita la inoculación del tubo de forma rápida y sencilla a partir de una única colonia o también soportes de plásticos con pocillos de fácil inoculación que contienen sustratos cromogénicos y/o fluorogénicos en estado deshidratado que se rehidratan en contacto con la muestra (*BBL Crystal*, BD Becton, Dickinson and Company, USA. Otras pruebas comerciales utilizadas

son reacciones cromogénicas, donde los sustratos cuando están en contacto con *Salmonella* liberan moléculas fluorescentes, como por ejemplo el BBL CHROMagar. (Biarnés M.2011)

La confirmación serológica se lleva a cabo mediante: a) Aglutinación rápida en portaobjetos, b) identificación en cascada mediante sueros polivalentes somáticos, monovalentes antígenos O, polivalentes flagelares, sueros monovalentes flagelares. (Biarnés M.2011)

Antes de la serotipificación se debe comprobar que no sea cepa Autoaglutinable con solución Cloruro de sodio al 2%. (Biarnés M.2011)

- **Serotipificación**

La serotipificación constituye un importante complemento de la identificación bioquímica y desde el punto de vista epidemiológico, para controlar brotes y epidemias, que permite determinar la prevalencia de una serovariedad en distintas zonas geográficas, como así también es de utilidad para conocer la fuente de infección y las vías de transmisión. Para establecer las relaciones genéticas entre cepas y por ende definir con mayor precisión sus relaciones epidemiológicas, se utilizan técnicas como la fagotipificación y la electroforesis, entre otros métodos de subtipificación. (Caffer M. I.Terragno R, 2001.)

El uso de reacciones antígeno – anticuerpo para la serotipificación de las bacterias se basa en que los microorganismos presentan diferencias en su constitución antigénica, aún entre grupos de microorganismos relacionados. Los microorganismos expresan una gran variedad de antígenos (Ag): componentes estructurales de la célula (pared, cápsula, fimbrias); productos de excreción (exotoxinas, enzimas extracelulares). (Caffer M. I.Terragno R, 2001.)

Químicamente, los Ag pueden ser proteínas, carbohidratos y complejos de polipéptidos. Como son moléculas complejas tienen más de una subestructura que puede servir como determinante antigénico. Debido a esto en los sueros inmunes se encuentran anticuerpos que reaccionan contra distintos determinantes antigénicos de la misma molécula. La base de la serotipificación para todas las enterobacterias es similar: se pone en evidencian la presencia de antígenos somáticos(O), **flagelares(H)** y capsulares(Vi). (Caffer M. I.Terragno R, 2001.)

En el caso de *Salmonella*, las serovariedades surgen como consecuencia de una asociación particular de factores antigénicos somáticos **O** y flagelares **H**. (Caffer M. I. Terragno R, 2001.)

1.5 Epidemiología

La salmonelosis es una enfermedad de distribución mundial transmitida por alimentos que afectan tanto a los países en desarrollo como a los desarrollados y es considerada un serio problema de salud pública debido al gran impacto socioeconómico que ocasiona.

Desde la década de los ochenta en las naciones del primer mundo, la incidencia de salmonelosis aumentó considerablemente, alcanzando proporciones epidémicas en varios países, siendo los individuos más vulnerables menores de cinco años y los mayores de 60 años de edad. En México, en 1994 las notificaciones de casos por salmonelosis registraron un aumento de 100,342 casos a 215,155 en 1998 (tasa de 111.21 y 223.53 por 100,000 habitantes, respectivamente), con mayor incidencia tres grupos de edades, los de 15 a 24 años, de 25 a 44 años y de 45 a 64 años, siendo el segundo el grupo más afectado. (Paniagua G. L. Monroy E. Vaca S. 2008)

Las salmonelas son patógenos primarios de los animales (p. ej., aves de corral, vacas, cerdos, mascotas, aves, ovejas, focas, burros, lagartos y víboras) que constituyen la fuente principal de la salmonelosis no tifoidea en los seres humanos. Es interesante destacar que el hombre es el único reservorio conocido de *S. Typhi*. Cerca del 50% de las epidemias de salmonelosis son el resultado de la transmisión por aves y productos avícolas contaminados. Las salmonelas en las heces de las gallinas contaminan las superficies de los huevos o penetran internamente a través de las grietas finas. En las gallinas con infección ovárica, los microorganismos pueden contaminar las yemas. La ley de inspección de productos de huevos de 1970 requiere la pasteurización de todos los productos de los huevos y la inspección supervisada federal de los huevos con cáscara para detectar grietas. (Koneman, 2008).

Cualquier alimento susceptible de contaminación de origen fecal puede transmitir la infección, la dosis infectiva suele ser muy elevada y depende de la virulencia de la cepa.

Otro factor importante para la contaminación del alimento es la exposición a cierto tipo de vectores como la mosca doméstica. (Parra M, Durango J, Máttar S, 2002).

1.6 Inmunoglobulinas

Los anticuerpos pertenecen a un grupo de moléculas de glucoproteínas relacionadas estructuralmente, que se hallan en la sangre y en los líquidos extracelulares conocidos en conjunto como inmunoglobulinas (Ig). Estas moléculas son producidas por linfocitos B que expresan Ig de única especificidad unidas a su superficie. (Koneman E, 2008)

Las inmunoglobulinas (Ig) están formadas por dos cadenas livianas y dos cadenas pesadas y tienen 2 sitios para la unión del antígeno específico (sitios Fab). La región de la molécula que no se une al antígeno, compuesta por regiones de las dos cadenas pesadas, se denominan región Fc. (Koneman E, 2008). Las Ig pueden dividirse en cinco clases: IgG, IgM, IgA, IgD e IgE (Ver Fig. 3 y 5), basándose en su estructura según las diferencias en las regiones C de las cadenas pesadas, así como también determina la subclase de la inmunoglobulina correspondiente.






Clases de anticuerpos					
Características	IgG	IgM	IgA	IgE	IgD
Cadena pesada	γ	μ	α	ϵ	δ
Cadena ligera	κ or λ	κ or λ	κ or λ	κ or λ	κ or λ
Estructura Y					

Figura No. 3 Clases de inmunoglobulinas humanas Fuente: (Calderón R. V. 2007)

Las distintas clases de inmunoglobulinas reciben el nombre de isotipos. (Álvarez L. 2004).

Las moléculas de IgG tienen un peso molecular de alrededor de 150 kilodaltons (kDa), IgG es la inmunoglobulina más abundante en el suero de los mamíferos y representa aproximadamente el 75% del total de las inmunoglobulinas circulantes y tiene una concentración elevada en suero (10mg/mL), siendo escasa en las secreciones su vida media es de aproximadamente 20 días. Las IgG de humanos se dividen en cuatro subclases: IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4 que constituyen el 70, 20, 8 y 2% respectivamente, de la IgG total. En el ratón, animal utilizado frecuentemente para el estudio de las respuestas inmunitarias, el isotipo IgG se divide en las subclases IgG1, IgG2a, IgG2b e IgG3. (Ver Fig. 4)(Álvarez 2004)

Tabla II: CARACTERÍSTICAS DE LAS INMUNOGLOBULINAS DE RATÓN

Propiedades	IgG				IgA	IgM	IgD	IgE
Clase cadena pesada (H)	γ				α	μ	δ	ε
Subclase cadena pesada	γ1	γ2a	γ2b	γ3	No	No	No	No
Peso molecular (kDa)	160	160	160	160	160	900	180	190
Concentración en suero (mg/ml)	0,3-0,5	0,1-4,0	0,1-5	0,1-0,2	0,01-0,03	0,1-1,6	3×10^{-4} -0,01	10^{-4} - 10^{-3}
Vida media (días)	8-11	3-12	2,6-3,5	4-8	0,5-1	0,5-1	< 1	< 1
Carbohidratos (%)	2-3	2-3	2-3	2-3	7-11	9-12	12-15	12
Coefficiente de sedimentación (S)	6,6	6,6	6,6	6,6	6,7	19	6,5	8
Coefficiente de extinción 0,1% A_{280nm}	1,4	1,4	1,4	1,4	1,35	1,18		
Fijación del complemento*	-	+++	+++	+/-	-	+++	N.C.	N.C.

* N.C.: No Conocida.

Figura No. 4 Características de las Ig de ratón.

Fuente: tomada de Álvarez L. 2004:23

Los anticuerpos IgM se hallan en la sangre y líquidos extracelulares, son extremadamente eficaces a la hora de fijar complemento, de un 5 a 10 por ciento de los anticuerpos está constituido por los anticuerpos IgM. Las moléculas de IgM constan de cinco monómeros que se unen entre sí mediante cadena J para formar un pentámero, son la primera clase de anticuerpos que se producen mediante la respuesta inmunitaria primaria.(Igraham J. Igraham C. 1998)

Los anticuerpos IgA son los segundos en cuanto a abundancia, representando del 15 al 20 por ciento de los anticuerpos del organismo. Los anticuerpos IgA se presentan en forma de monómeros o dímeros. El monómero se encuentra en la sangre y el líquido extracelular, mientras que el dímero se presenta en secreciones como la saliva, la leche y el moco. La cadena J o péptido de unión, producida por la células plasmáticas, mantiene los dos monómeros unidos entre sí para formar el dímero. (Igraham J. Igraham C. 1998)

Los anticuerpos IgE son monómeros, se encuentran en el organismo en pequeñas proporciones, constituyendo menos del 0.01 por ciento del total de los anticuerpos. La IgE se fija en la superficie de los basófilos, mastocitos e eosinófilos. Cuando las moléculas de IgE se unen a un antígeno estimulan la desgranulación del microorganismo, liberándose potentes mediadoras de inflamación como la histamina. La desgranulación contribuye a la defensa del organismo frente a las enfermedades producidas por parásitos. (Igraham J. Igraham C. 1998)

Desgraciadamente un incremento en la desgranulación de las IgE también contribuye a la reacción de alergia, y se considera un mal funcionamiento del sistema inmunitario. (Igraham J. Igraham C. 1998)

Los anticuerpos IgD son monómeros que representan menos del 1 por ciento del total de los anticuerpos. Es la clase principal de anticuerpos que se encuentran sobre las membranas celulares de las células B productoras de anticuerpos, su función es poco conocida. (Igraham J. Igraham C. 1998)

Inmunoglobulina	Cadena pesada	Cadena ligera	Coefficiente de Sedimentación	PM Wt (M _r)	M _r Cadena pesada	Contenido carbohidratos (%)	A _{280nm}	pI
IgG ₁	λ ₁	κ, λ	7S	146 000	50 000	2-3	13.8	5.0-9.5
IgG ₂	λ ₁	κ, λ	7S	146 000	50 000	2-3		5.0-8.5
IgG ₃	λ ₁	κ, λ	7S	170 000	60 000	2-3		8.2-9.0
IgG ₄	λ ₁	κ, λ	7S	146 000	50 000	2-3		5.0-6.0
IgM	μ	κ, λ	19S	900 000	68 000	12	12.5	5.1-7.8
IgA ₁	α ₁	κ, λ	7S	160 000	56 000	7-11	13.4	5.2-6.6
IgA ₂	α ₂	κ, λ	7S	160 000	52 000	7-11		5.2-6.6
IgA ₃	α ₁ , α ₂	κ, λ	11S	370 000	52-56 000	11		4.7-6.2
IgD	δ	κ, λ	7S	184 000	68 000	12	17.0	-
IgE	ε	κ, λ	8S	190 000	72 000	12	15.3	-

Figura No. 5 Características de las Ig humanas

Fuente: (Calderón R. V. 2007)

1.7 Anticuerpos monoclonales

Un antígeno es una sustancia que induce la formación de anticuerpos en un animal que se inmuniza contra ella en particular. Casi siempre el antígeno es inmunogénico, es decir, puede estimular la formación de anticuerpos y unirse de manera específica con los anticuerpos que se formaron contra él. (Koneman E, 2008)

No todas las estructuras moleculares que componen un antígeno son igualmente inmunogénicas; las que son reconocidas por los anticuerpos se denominan determinantes antígenicos inmunodominantes o epítomos. Las características únicas de cada antígeno dependen de los tipos y las secuencias de los aminoácidos de una proteína, de la composición química y estructural de los polisacáridos, glucoproteínas y ácidos nucleicos y de sus estructuras secundarias, terciarias y cuaternarias. (Koneman E, 2008)

Los anticuerpos pertenecen a un grupo de moléculas de glucoproteínas relacionadas estructuralmente que se hallan en la sangre y en los líquidos extracelulares conocidas en conjunto como inmunoglobulinas (Ig). Estas moléculas son producidas por los linfocitos B

que expresan una Ig de única especificidad unidas a una superficie. Cuando los receptores de antígenos de estas células encuentran el ligando apropiado, los linfocitos B proliferan y comienzan a secretar anticuerpos solubles contra el antígeno diana. Las células plasmáticas producen, en forma individual, grandes cantidades de moléculas únicas de anticuerpos que tienen la misma especificidad de unión al antígeno. (Koneman E, 2008)

Rara vez se encuentran moléculas de antígeno con un único epítipo; por el contrario pueden existir cientos o incluso miles de posibles determinantes antigénicos sobre la superficie de una célula o dentro de una, mezcla de otras sustancias. Cuando estas mezclas de antígenos se inyectan en un animal se estimula un número equivalente de clones de linfocitos. A pesar de que cada clon produce un anticuerpo específico, el resultado es una mezcla muy heterogénea de moléculas de anticuerpos, cuya afinidad y especificidad a menudo se desconocen y es difícil de controlar entre los diferentes lotes. (Koneman E, 2008)

Cuando estos antisueros policlonales se utilizan en los sistemas de ensayos inmunológicos concernientes a agentes infecciosos se puede observar reactividad cruzada porque los determinantes antigénicos son compartidos por diferentes especies o las mutaciones pueden haber llevado a la evolución de epítopos lo suficientemente relacionados con la especificidad para producir reacciones cruzadas detectables. (Koneman E, 2008)

Los anticuerpos monoclonales son el producto del único clon de linfocitos, surgieron gradualmente como un subproducto de las investigaciones sobre fusión celular y de las técnicas de producción de hibridomas desarrollados por Kohler y Milstein, gracias a su descubrimiento, hoy es posible aislar líneas clonadas de linfocitos individuales que producen moléculas de anticuerpos únicas y monoespecíficas. (Koneman E, 2008)

Los anticuerpos monoclonales hacen referencia a especies moleculares de inmunoglobulinas uniformes y homogéneas. (Koneman E, 2008) La característica principal de esta técnica no se basa en que se puede realizar el aislamiento de una línea única de células que producen anticuerpos monoclonales, si no que estos linfocitos de ratón pueden “fusionarse” con células de mieloma de ratón para producir células híbridas con dos propiedades inherentes: 1) capacidad de producir anticuerpos monoespecíficos (adquirida

de los linfocitos parentales) y 2) la capacidad de crecer en forma permanente en cultivo (la característica de “inmortalidad” adquirida de las células de mieloma). (Koneman E, 2008)

2. OBJETIVO GENERAL

Producir anticuerpos monoclonales contra el flagelo z15 de *Salmonella* Dahlem inmunizando ratones BALB/c con el antígeno flagelar z15, para contribuir al diagnóstico serológico específico de salmonelosis.

2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Producir anticuerpos monoclonales contra el flagelo z15 de *Salmonella* Dahlem inmunizando ratones BALB/c con el antígeno flagelar.
2. Caracterizar el o los anticuerpos monoclonales obtenidos determinando clase y subclase de anticuerpos por ELISA Indirecto.
3. Evaluar la reactividad específica de los AcMo contra el antígeno flagelar z15 de *Salmonella* Dahlem, mediante ELISA Indirecto e Inmuno Electro Transferencia.

3. HIPÓTESIS

Si se inmuniza ratones Balb/c con el flagelo z15 de *Salmonella* Dahlem, y se le obtienen las células del bazo, y al fusionarse con el mieloma X63Ag8.553, seleccionaremos hibridomas productores de anticuerpos haciendo clonación por dilución limitante, y entonces obtendremos anticuerpos monoclonales específicos contra *Salmonella* Dahlem.

4. JUSTIFICACIÓN

La clasificación del género *Salmonella* se basa en sus propiedades bioquímicas y antigénicas, existiendo una gran cantidad de serotipos, por lo tanto la confirmación serológica se complica, en los laboratorios a nivel nacional como en el de referencia del InDRE (Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos) existe la serotipificación con anticuerpos policlonales, donde se demuestra la presencia de anticuerpos aglutinantes (aglutininas), contra los antígenos H (flagelos) o antígenos O (somático). La desventaja de este diagnóstico es que pueden existir reacciones cruzadas ya que hay serotipos de *Salmonella* que poseen antígenos flagelares (H) muy similares, estos son antígenos constituidos por una proteína, la flagelina cuya composición en aminoácidos es constante y que solo se diferencian por un solo aminoácido y depende de dos genes estructurales, que corresponden a la fase 1 y a la fase 2. (Parra M, Durango J, Máttar S, 2002). La mayoría de las cepas del género *Salmonella* pueden expresar las dos especificidades de su antígeno H (difásicos), sin embargo, existen algunas que pueden expresar solamente una, ya sea la uno ó la dos (monofásicas) (Parra M, Durango J, Máttar S, 2002) y en el caso de *Salmonella* serotipo Dahlem, el antígeno somático es 48, el antígeno flagelar es fase 1: k,y fase 2: e,n,z₁₅, (Patrick A. Weill F, 2007) según la nomenclatura de Kauffmann-White. Por tal motivo se pretende producir un anticuerpo monoclonal contra *Salmonella* Dahlem antígeno flagelar fase 2 “z₁₅”, para utilizarlos como referencia en la confirmación serológica de *Salmonella*, cuando se presente alguna reacción cruzada con otro antígeno flagelar, un ejemplo es con el antígeno flagelar “e,n,x”, de *Salmonella* Johannesburg.

5. MATERIAL

5.1 Animales

- 4 ratones hembra BALB/c de 6 semanas de edad

5.2 Medios de cultivo celular

- RPMI-1640
- DMEM

5.3 Cepas

- Antígeno de *Salmonella* Dahlem concentración de 3UFC/mL, calibrado al Nefelómetro 0.5, cepa previamente serotipificada correctamente por el CDC, crecida con el antígeno flagelar en fase 2 z15.

5.4 Líneas celulares

- Células de mieloma X63Ag8.553
- Linfocitos B extraídos de bazo de ratón

5.5 Material de Laboratorio

- Pinzas, tijeras de disección y bisturí con navaja
- Cama de disección
- Placas de poliestireno de alta adherencia de 96 pozos
- Tela organza
- Caja Petri estéril
- Jeringas estériles
- Tubos cónicos de 25, 50mL estériles
- Placas de cultivo de 96 pozos
- Botellas de cultivo de 25cm²
- Filtros de 0.45µm
- Pipetas estériles de 1, 2,5,10,25mL
- Guantes
- Cubrebocas

5.6 Equipo de laboratorio

- Campana de flujo laminar
- Lector de ELISA
- Microscópio invertido de fases
- Incubadora
- Estufa incubadora de CO₂
- Centrífuga clínica
- Espectrofotómetro UV/vis
- Microcentrífuga refrigerada
- Vortex
- Fuente de poder
- Cámara de electroforesis
- Cámara de electrotransferencia
- Parrilla agitador magnético
- Columnas de purificación
- Kit para concentra anticuerpos

5.7 Reactivos

- Todos los reactivos requeridos se describen en el anexo I

6. METODOLOGÍA

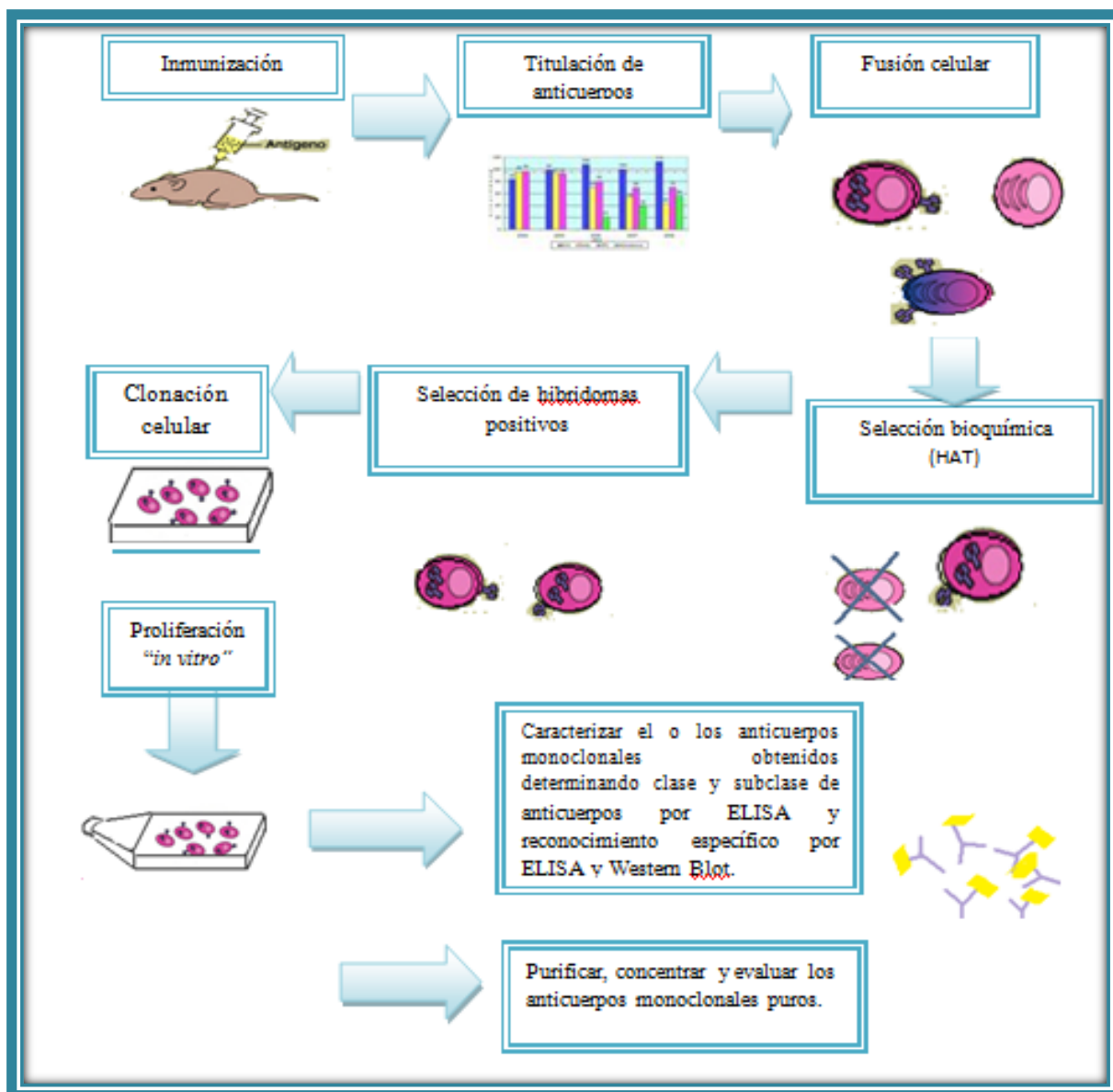


Figura No.6 Esquema de producción de anticuerpos monoclonales

Para las metodologías llevadas a cabo, los reactivos y soluciones utilizados, se describen en el Anexo I.

Para producir anticuerpos monoclonales contra el flagelo z15 de *Salmonella* Dahlem, lo primero que se realizó fue la inmunización.

6.1 Inmunización

Se utilizaron 4 ratones hembra BALB/c de 6 semanas de edad, uno se dejó como blanco, los tres restantes se inmunizaron una vez por semana durante 6 semanas, una suspensión bacteriana inactivada, fijados los flagelos en formaldehído, como antígeno, proveniente de la cepa *Salmonella* Dahlem concentración de 3UFC/mL, calibrado al Nefelometro 0.5 de una cepa previamente serotificada correctamente por el CDC, crecida en la fase 2 que se requiere en este caso z15. Ver tabla No. 1

Número de inmunización	Día	Vía	Vol. x Dosis
1	1	IP	150µL de Ag + 150µL de ACF
2	8	IP	150µL de Ag + 150µL de ACF
3	15	IP	150µL de Ag + 150µL de AIF
4	22	IP	150µL de Ag + 150µL de AIF
5	29	IP	150µL de Ag formalinizado
6	33	IV	150µL de Ag formalinizado

Tabla No.1 Esquema de inmunización para la obtención de AcMO contra el flagelo z15 de *Salmonella* Dahlem

La evaluación producción de anticuerpos en los ratones y en sobrenadante de cultivo se realizó mediante ELISA indirecto.

6.2 ELISA Indirecto.

Para la titulación de anticuerpos producidos por los ratones inmunizados se extrajo un volumen aproximado de 200 μ L de sangre venosa, mediante un pequeño corte de la cola del ratón, separando el suero suficiente para evaluar la respuesta inmunitaria de los mismos mediante un ELISA indirecto. El antígeno se utilizó sin diluir. Se sensibilizaron los pozos de poliestireno con un volumen de 100 μ L de la solución del antígeno, se incubó la placa de ELISA a 4°C durante la noche. Se eliminó la solución vertiendo el contenido de los pozos y se secó el exceso sobre una gasa. La placa se lavó 3 veces con 200 μ L/pozo con la solución salina de fosfatos y Tween 20 al 0.05%, pH 7.2 (Solución 2), durante 5 min cada lavado; entre cada uno se eliminó la solución vertiendo el contenido de los pozos y se secó el exceso sobre una gasa. Se agregó a la placa 200 μ L/pozo de leche descremada al 5% (Solución 7) en PBS-tween, se incubó durante 30 min. a 37°C, se repitieron los pasos de lavado. Para evaluar sobrenadantes de cultivo se colocaron 100 μ L/pozo de sobrenadante sin diluir ó para evaluar sueros de ratones se colocan diluciones dobles seriadas partiendo de 1:500 y se incubó toda la noche a 4°C. Se repitieron los pasos de lavado. Posteriormente se colocaron 100 μ L de conjugado anti-gamaglobulina total de ratón-peroxidasa por pozo (a una dilución previamente titulada 1:4000 y establecida), se incubó a 37°C durante 2 horas y se procedió a los lavados nuevamente. En cada pozo se colocaron 100 μ L de la solución cromógeno/ sustrato correspondiente. La placa se incubó en la oscuridad durante 15 min. La reacción enzimática se paró añadiendo 100 μ L/pozo de ácido sulfúrico 2N (Solución 3) y finalmente se leyó la absorbancia en un lector de ELISA a 490nm.

Cabe mencionar que para cada ELISA realizado se agregaron controles: el positivo que correspondía al suero hiperinmune del ratón a una dilución 1:1000, el control negativo a PBS y el control de conjugado.

6.3 Fusión celular

- a) Se eligió al ratón con mayor título de anticuerpos
- b) Se le dio el último reto, llamado así a la inmunización al ratón por VI, con 150 μ l del antígeno, tres días antes de realizar la fusión, de tal manera que aumente aún más su respuesta inmunológica contra éste.
- c) Preparación de las células de mieloma

Las células de mieloma empleadas como pareja de fusión se descongelan una semana antes de la fusión y se mantienen en crecimiento exponencial en medio de RPMI.1640 (Solución 15) y con SFB al 10% (Solución 16) incubadas a 37°C en atmósfera de 95% de aire y 5% de CO₂.

d) Fusión

El ratón elegido para la fusión se sangró a blanco por vía retrorbital (Ver Anexo II) (control positivo en las pruebas de ELISA), y se sacrificó por dislocación cervical (Ver Anexo II). Asépticamente se extrajo el bazo. Se colocó el bazo en una caja Pétri estéril, que contenía aproximadamente 5 mL de medio RPMI-1640 sin suero fetal bovino y un cuadro de tela de organza estéril, la cual sirvió para disgregar el bazo. El bazo se envolvió totalmente con la tela organza y con ayuda del émbolo de una jeringa estéril se presionó lo más suavemente posible para disgregar el tejido y por último se resuspendió con una pipeta estéril, la suspensión celular resultante se colocó en un tubo de 50 mL y se lavó una vez con medio RPMI-1640 sin suero, mediante centrifugación. Las células del mieloma fueron centrifugadas a 1200 rpm durante 10 min a T.A, se desechó el sobrenadante y se resuspendió el botón celular en 25mL de medio RPMI-1640 sin suero fetal.

Se mezclaron las células de bazo y las de mieloma en una relación 5:1 (5 células de bazo por 1 célula de mieloma) en un tubo de 50mL, y se centrifugaron a 1200rpm durante 5 min, se eliminó el sobrenadante y se disgregaron suavemente las células, por cada 60 millones de células, se agregaron 0.5mL de polietilenglicol (Solución 21), en un tiempo aproximado de 60 segundos agitando suavemente. Se agregaron 5mL de medio RPMI-1640 sin suero fetal Bovino, por goteo y agitando suavemente en un lapso de 3 min; de la

misma forma se le adicionaron 15mL más en un lapso de 1 min y se centrifuga a 1200 rpm durante 10 min a 37°C, se resuspendieron las células en medio RPMI-1640 con SFB al 20% adicionando con HAT (Solución 19). Se colocaron 200µL /pozo en 4 placas de cultivo de 96 pozos y se cultivaron a 37°C en atmósfera húmeda con 95% de aire y 5% CO₂. Las células se revisaban diariamente para identificar si existe algún tipo de contaminación, por ejemplo turbidez, mal olor, cambio de color del medio (ácido o básico teniendo como indicador de pH al rojo de fenol) y checar en el microscopio de inversión de fases los pozos con células viables, confluencia mayor a 50% o si se requerían de cambiar medio, diez días después de la fusión se realizaron los cambios a medio de cultivo con HT (Solución 20) por 5 días, al finalizar estos solo se cultivaron las células con medio RPMI-1640 suplementado con SFB al 15%.

6.4 Selección bioquímica de hibridomas.

Los cambios de medio a las células de la fusión se realizaban conforme al calendario que se muestra a continuación.

Tabla No. 2 Calendario para selección de hibridomas positivos.

Día	Tipo de medio y concentración	Actividad
1	RPMI-HAT con 15% de SFB	Fusión celular
3	RPMI-HAT con 15% de SFB	Revisión y cambio de medio
6	RPMI-HAT con 15% de SFB	Revisión y cambio de medio
9	RPMI-HAT con 15% de SFB	Revisión y cambio de medio
12	RPMI-HAT con 15% de SFB	Revisión y cambio de medio
15	RPMI-HAT con 15% de SFB	Revisión y cambio de medio
18	RPMI-HT con 15% de SFB	Revisión y cambio de medio a HT
20	RPMI-HT con 15% de SFB	Revisión y cambio de medio
23	RPMI-HT con 15% de SFB	1ra. Evaluación por ELISA indirecto
25	RPMI-HT con 15% de SFB	2da. Evaluación por ELISA indirecto
28	DMEM con 12% de SFB	Revisión y cambio de medio a DEMEM
31	DMEM con 12% de SFB	Selección de hibridomas positivos

6.5 Clonación celular por dilución limitante.

La presencia de híbridos productores de anticuerpos se detectó tomando el sobrenadante de los cultivos y evaluándolos por ELISA indirecto. De los pozos en cultivo solo fueron seleccionados para clonar aquellos con resultado de ELISA positivos al reconocimiento de su antígeno específico z15.

Se colocaron 100µL de medio de cultivo DMEM (Solución 15) con SFB (Solución 16) al 12% en toda la fila A de una placa de cultivo de 96 pozos, se tomaron 100µL de

suspensión celular de uno de los híbridos positivos seleccionados, y se colocaron en la posición A1 de la placa y a partir de esta se realizaron diluciones dobles seriadas hasta el final de la fila y se dejaron reposar 10 minutos. Se contaron al microscopio invertido las células presentes en cada pozo y se señaló aquel que contenía entre 30 y 40 células. Se tomó todo el volumen del pozo marcado y se diluyó en 18mL de medio DMEM con SFB al 12%, mezclando lentamente y de esta suspensión celular se sembraron con 200µL en cada pozo de las 7 filas restantes de la placa.

Las placas de las clonaciones realizadas se incubaron a 37° C con 95% de aire, 5% de CO₂ durante una semana. Posteriormente se revisaban los pozos de las placas para observar la proliferación celular a partir de una sola célula, y los pozos donde se localizaban fueron seleccionados para probar el sobrenadante por ELISA indirecto y detectar si estas clonas secretaban anticuerpos específicos al antígeno utilizado; y si estas resultaban positivas se procedía a repetir la clonación 2 veces más.

6.6 Proliferación *in vitro*.

Se realizó la proliferación *in vitro*, manteniendo las clonas celulares en botellas de cultivo de 25cm², se checaban cada tercer día que la confluencia fuera del 90%, las células se congelaban (Ver Anexo II) y a las que se mantenían en las botellas se les cambiaba medio de cultivo DMEM con SFB al 10% según lo requerían y se incubaban a 37°C con 95% de aire y 5% de CO₂. De esta manera se obtenía gran cantidad de células como de sobrenadante.

6.7 Determinación de subclase de anticuerpo de ratón por ELISA.

Se determinó la subclase de los anticuerpos producidos por las clonas, utilizando sobrenadante de cultivo celular, mediante un ELISA de captura.

Se sensibilizó una placa de ELISA de 96 pozos con 100µL de cada subclase anti-IgG de ratón, dos columnas de la placa por duplicado de cada subclase: IgG1, IgG2a, IgG2b e IgG3, previamente tituladas 1:10,000 en buffer de boratos (Solución 8). Se dejó incubar toda la noche a 4°C. Se realizaron tres lavados con PBS-Tween 20, (Solución 2)

durante 5 minutos cada uno, se colocaron 200 μ L de solución de bloqueo (Solución 7) en cada pozo y se incubó a 37°C 30 minutos. Se repitieron los mismos pasos de lavado. Se colocó 100 μ L de sobrenadante de cultivo de los AcMO, se incubó a 37°C por 2 horas. Se repitieron los pasos de lavado. Se colocó 100 μ L a cada pozo del conjugado anti-IgG de ratón en cabra, incubando a 37°C por 2 horas. Se repite el paso 2. Se colocó 100 μ L a cada pozo de solución cromógeno sustrato para peroxidasa (Solución 6), se cubrió de la luz durante 15 minutos y se paró la reacción con ácido sulfúrico 2N (Solución2) se leyó la absorbancia en el lector de ELISA a una λ de 490 nm.

6.8 Purificación de AcMO mediante cromatografía de afinidad

Se utilizó una columna de sepharosa-proteína A la cual se lavó con 10 veces su volumen de PBS (Solución1) filtrado, posteriormente el medio de cultivo se incorporó a la columna mediante goteo con una velocidad de 0.5mL/min, dejándola fluir, se recirculo 3 veces. Ya integrada la muestra en la columna se paró el flujo de la columna y se guardó a 4°C. La columna se lavo con PBS (Solución1) filtrado, colectando fracciones de 1.5 mL en tubos numerados que correspondía a la fracción inespecífica. Se leyó la absorbancia a 280 nm del líquido recuperado en cada tubo en un espectrofotómetro y cuando se obtuvo una lectura menor a 0.05 se empezó a lavar con solución de glicina 0.1M, pH 2.5 (Solución18) para eluir los anticuerpos puros obteniéndolos en fracciones de 1.5 mL en tubos numerados (10 aproximadamente) y se leyó en el espectrofotómetro a 280 nm. Se tomaron todas las fracciones cuya absorbancia resultó mayor a 0.2 y el volumen total se dializó contra PBS (Solución1) filtrado, durante toda la noche a 4°C. Se determinó la concentración de proteínas por método Bradford. El anticuerpo puro fue fraccionado y conservado a -20°C hasta su uso.

Nota: como control positivo se utilizó suero de ratón hiperinmune a una dilución de 1:1000 para cada una de las subclases.

6.9 Cuantificación de proteínas por método de Bradford

A partir de una solución concentrada de Albumina Sérica Bovina a una concentración de 1mg/mL, se hicieron soluciones de concentración conocida de albúmina de 10 a 100µg/mL en PBS (Solución 1).

Tabla No. 3 Muestra la preparación de la curva de concentración de Albúmina Sérica Bovina

Tubo	Proteína [1mg/mL]	PBS	Concentración
0	0 µL	1000µL	0µg/mL
1	10 µL	990 µL	10 µg/mL
2	20 µL	980 µL	20 µg/mL
3	30 µL	970 µL	30 µg/mL
4	40 µL	960 µL	40 µg/mL
5	50 µL	950 µL	50 µg/mL
6	60 µL	940 µL	60 µg/mL
7	70 µL	930 µL	70 µg/mL
8	80 µL	920 µL	80 µg/mL
9	90 µL	910 µL	90 µg/mL
10	100 µL	900 µL	100 µg/mL

Se utilizó la fila A de una microplaca donde se colocaron 40µL de proteína de cada uno de los tubos en orden ascendente, en la fila B se realizó lo mismo, para que se realizara por duplicado, se agregaron 160µL solución de Bradford marca Bio-rad (diluido 1:5 en agua destilada) para completar los 200µL de en todos los pozos de la curva, Se seleccionan los pozos en los cuales se colocarán las muestras problema por duplicando considerando un volumen de 40µL por pozo, en el que se puede colocar 10 µL de muestra + 30 µL de PBS (Solución1) ó 20 µL de muestra y 20 µL de PBS, etc., incluso los 40µL de muestra. Finalmente se completó con 160µL de solución Bradford(1:5) teniendo un total de 200µL por pozo. Ya montada la curva con la muestra en la microplaca, se leyó la absorbancia en el

lector de ELISA a 595nm. De los valores obtenidos se graficó, se hizo un análisis de regresión lineal considerando un valor de $r=0.99999$, se interpolaron los valores de absorbancia de las muestras problema y se calculó la concentración de proteínas.

6.10 Concentración de AcMO por Ultrafiltración.

Se realizó la concentración de los AcMO purificados mediante Amicon-Ultrafiltración, kit de filtros centrifugos, y para iniciar con la concentración primero se hicieron 3 lavados a los filtros por 20 minutos cada uno con solución de PBS (Solución1), después se vertió todo el volumen obtenido del AcMO purificado al filtro, se calibró en peso el filtro centrifugo con balanza granataria y se insertó a la ultracentrífuga refrigerada. Las condiciones de ultracentrifugación fueron 4000rpm/20min/4°C. Se recuperó la solución concentrada en un vial, que es la que se mantuvo en el filtro y se guardó a 4°C para posteriormente determinarle concentración de proteínas y probar reactividad contra el antígeno z15 por ELISA indirecto.



Figura 7.Kit de ultrafiltración MILLIPORE PROSEP-A KIT Cat.No. LSK2ABA2

NOTA: Terminada la concentración, el filtro se lavó tres veces con Solución Salina al 5%(Solución9), durante 20 min cada uno y finalmente se realizaron 3 lavados de 20 min cada uno con agua bidestilada, se dejaron secar y se guardaron a 4°C.

6.11 Identificación de los AcMo mediante Inmuno Electro Trnasferencia

a) Preparación de geles

Primero se lavaron las placas de vidrio con agua y alcohol al 70%(Solución 10), se colocó el juego de placas de vidrio y separadores en la base para preparar el gel. Se conecto al sistema de gel para electroforesis por gradiente y se probó el sistema con agua para prevenir fugas, se retiró el agua y en base a la cantidad de geles y el volumen de los mismos se prepararon las siguientes cantidades:

GEL SEPARADOR		
	5%(mL)	22.5%(mL)
H ₂ O bidestilada	7.14	0
Acrilamida	2.07	9.37.5
Tris Base	3.125	3.125
SDS 10%	0.125	0.125
*APS 10%	0.072	0.072
*TEMED	0.038	0.038

Tabla No. 4 Preparación del gel separador

GEL CONCENTRADOR	
H ₂ O bidestilada	4mL
Acrilamida	1.0Ml
Tris Base	0.76Ml
SDS 10%	0.06mL
*APS 10%	0.06Ml
*TEMED	0.006Ml

Tabla No. 5 Preparación del gel concentrador.

Una vez que se preparó la mezcla para el gel separador, se vertió la mezcla en el sistema de separación por gradiente de concentración, se encendió la bomba peristáltica y comenzó el flujo de llenado de la mezcla entre las dos placas de vidrio dejando un marco de 3cm de borde superior y se dejó polimerizar. Se toma el juego de cristales con el gel separador y se colocó en la base de montaje para agregar el gel concentrador. Se colocó el peine apropiado de acuerdo al número de muestras, se preparó la mezcla de soluciones del gel concentrador, se agregó la mezcla sobre el gel separador tratando de no formar burbujas y se dejó polimerizar, después se retiró el peine y se lavaron los carriles con agua destilada, se colocaron las placas en el electrodo y se colocaron dentro de la cámara de electroforesis, llenando la cámara inferior con amortiguador de electroforesis (Solución 15).

b) Preparación de la muestra y electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS-PAGE.

En un tubo Ependorf se agregó 150 μ L de muestra de antígeno z15 concentrado con 50 μ L de pironina en condiciones reductoras con 2- β - mercaptoetanol (Solución 22) y en otro tubo la misma cantidad de antígeno y de buffer de muestra pero sin β - mercaptoetanol (Solución 22), se mezclaron, taparon y se hirvieron en Baño María por 5 min, se colocaron

NOTA: Las soluciones utilizadas para cada gel, se describen en el anexo I.*Estos reactivos se agregan hasta el final.

las muestras en el carril correspondiente incluyendo en cada gel un carril con estándar de pesos moleculares, se llenó la cámara superior con amortiguador de electroforesis recién preparado, se conectó la cámara a la fuente de poder y se ajustó la corriente a 120 volts constantes y cuando alcanzó la entrada al gel separador se aumento hasta 200 Volts constantes, se mantuvo la electroforesis hasta que el frente de corrimiento quedó a medio cm del final de la placa.

c) Electrotransferencia

Se colocaron las fibras Scotch y papeles filtro Whatman (grosor de 0.16mm) en un recipiente con suficiente amortiguador de transferencia (Solución 14) 30 min antes de transferir. Se cortaron las membranas de nitrocelulosa (NC) de acuerdo al tamaño del gel

(utilizando guantes) y se colocaron en recipiente que contenía amortiguador de transferencia, se colocaron dos fibras Scotch en un “cassette” para electrotransferencia, sobre las cuales se colocaron dos porciones de papel filtro teniendo cuidado que no quedaran burbujas atrapadas entre los papeles, después se colocó el gel y sobre éste la membrana de NC, se eliminaron las burbujas. Se colocaron otros dos papeles filtros sobre la NC con otras dos fibras, se cerró el cassette y se insertó en el electrodo de transferencia, se llenó con amortiguador de transferencia, se tapó y se conectaron los electrodos de tal manera que el ánodo (-) quedé del lado del gel y el cátodo (+) de la NC, se conectó a la fuente de poder y se transfirió durante una hora a 100 volts, cuidando que la temperatura del líquido no se elevara a más de 60°C.

Al terminar la transferencia se tomó toda la membrana de NC con guantes y se colocó en un recipiente con rojo de Ponceau (Solución22), para verificar que las proteínas fueron transferidas a la NC, se lavó el exceso de colorante con agua destilada.

d) Reacción inmunoenzimática.

Se colocó la membrana de NC en un recipiente que contenía 30 mL de solución de bloqueo y se incubó 30 min a temperatura ambiente en agitación constante, se eliminó el exceso de solución de bloqueo (Solución7) por decantación y se realizaron 3 lavados con PBS-Tween (Solución2) de 5 min cada uno en agitación constante, la membrana de NC podían probarse inmediatamente o guardarse a 4°C por una noche, entre dos papeles filtro humedecidos con PBS (Solución1) o congelarse a -20°C hasta su posterior uso.

Las membranas de NC se descongelaron a temperatura ambiente, se cortaron en tiras de 3mm de ancho, procurando manipularlas del extremo inferior, se colocaron en las placas acanaladas de plástico, según el orden propuesto se colocó 1mL de sobrenadante de AcMo, así como controles correspondiente, se incubaron a 4°C toda la noche. Se realizaron 3 lavados con PBS-tween (Solución2), y 2 con PBS (Solución1), por 5 min cada uno, se agregó el conjugado anti-IgG de ratón peroxidado a una dilución 1:2000 previamente titulada, durante 2 hrs a temperatura ambiente con agitación constante, se realizaron los mismos lavados tres con PBS-tween y dos con PBS, y a cada tira de NC se le agregó 500 µl la solución cromógeno-sustrato (3,3'-diaminobenzidina (DAB), (Solución11)). Después

de 10 min. se eliminó la solución de revelado por decantación y se lavo 3 veces con agua destilada.

Se identifican bandas de reconocimiento de péptidos del antígeno, se dejan secar y se ordenan.

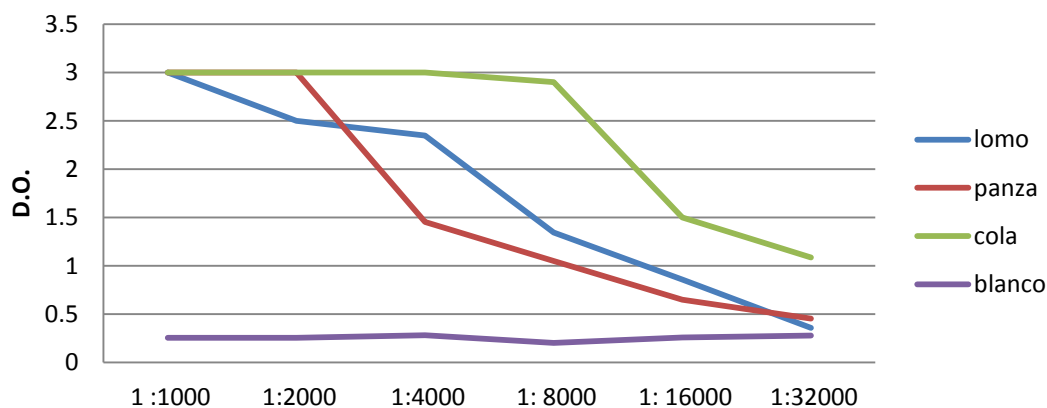
7. RESULTADOS

7.1 Inmunización

Después de la inmunización de los ratones BALB/c inmunizados con antígeno flagelar z15, (Ver gráfica No.1), se determinó el título de anticuerpos en los sueros de los ratones mediante el ELISA.

Comparando la respuesta inmunológica de todos los ratones, se notó la diferencia de la inducción de la respuesta inmune al antígeno inmunizado, de tal manera que se eligió para la fusión al ratón marcado como cola, debido a que fue el que mantuvo los títulos de anticuerpos más elevados y constantes a las diluciones probadas.

Titulación de anticuerpos en suero de los ratones



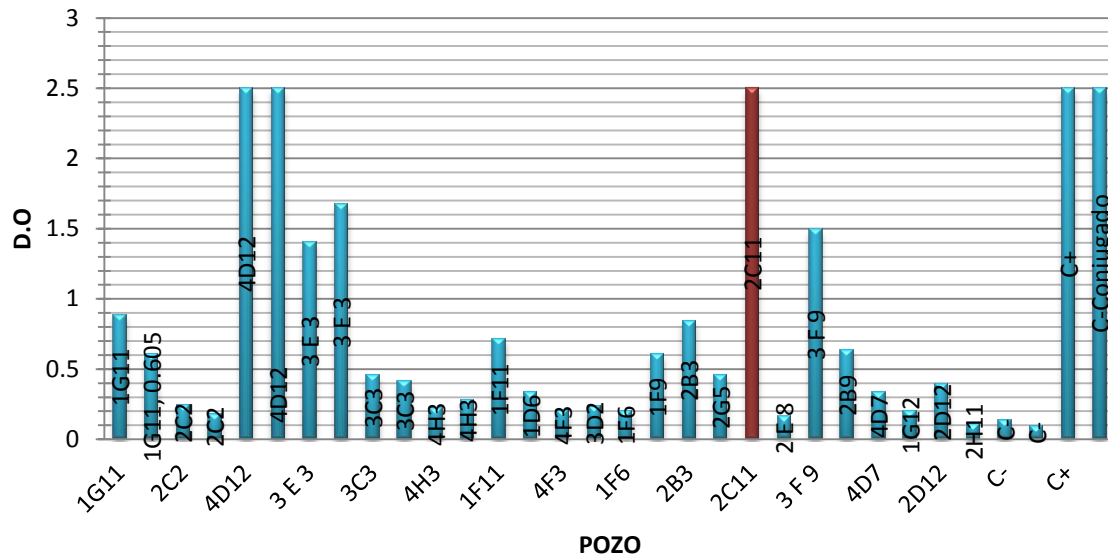
Gráfica No.1 Muestra la respuesta inmunitaria de los ratones inmunizados con antígeno flagelar z15 comparada con la del ratón blanco, determinada mediante ELISA indirecto.

7.2 Fusión celular y selección de hibridomas positivos.

Después de la etapa de selección bioquímica de las 4 placas de 96 pozos preparadas, se realizaron varias evaluaciones por ELISA Indirecto de los sobrenadantes de los hibridomas obtenidos, (Ver Gráfica No.2) y considerando como positivos o productores de anticuerpos a aquellos pozos con valores mayor de 0.2 de D.O., hay 15 hibridomas con valores

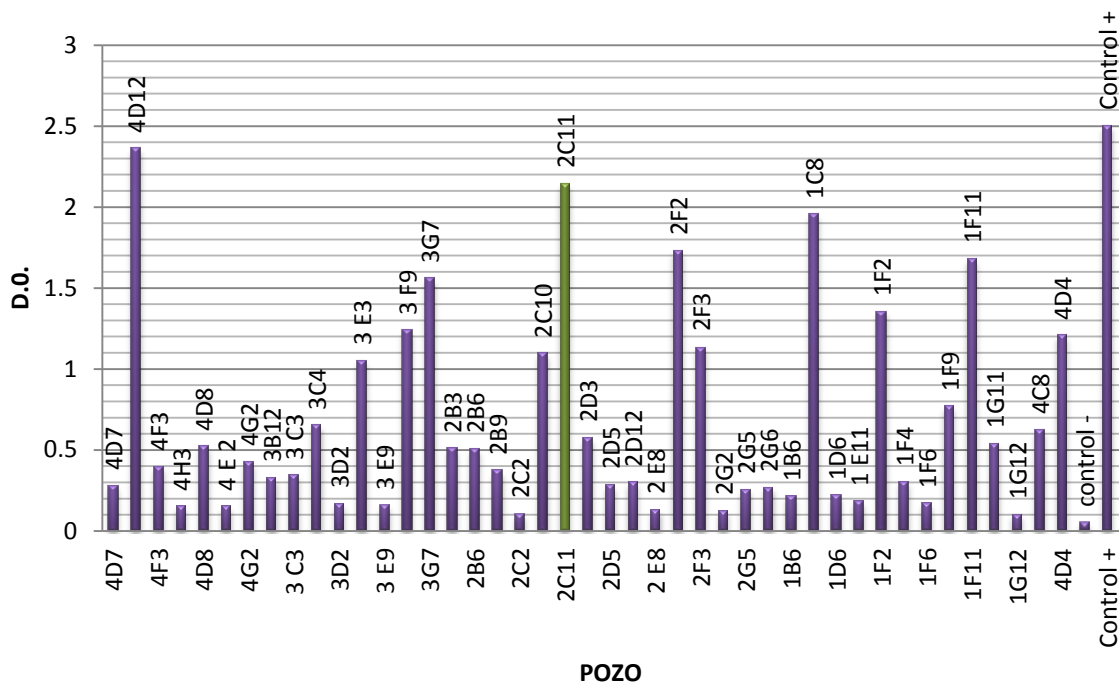
diferentes de D.O. considerados como productores de anticuerpos en la primera evaluación.

Gráfica No.2 Primera determinación de anticuerpos anti-z15 de *Salmonella* Dahlem por el método de ELISA indirecto



En una segunda determinación de anticuerpos anti-z15 en los sobrenadantes, se encontraron otros pozos con hibridomas en crecimiento, los cuales fueron probados en ELISA Indirecto y se determinaron 31 hibridomas positivos productores de anticuerpos. (Ver gráfica No.3)

Gráfica No.3 Segunda determinación de anticuerpos anti-z15 del flagelo de *Salmonella* Dahlem, por ELISA indirecto

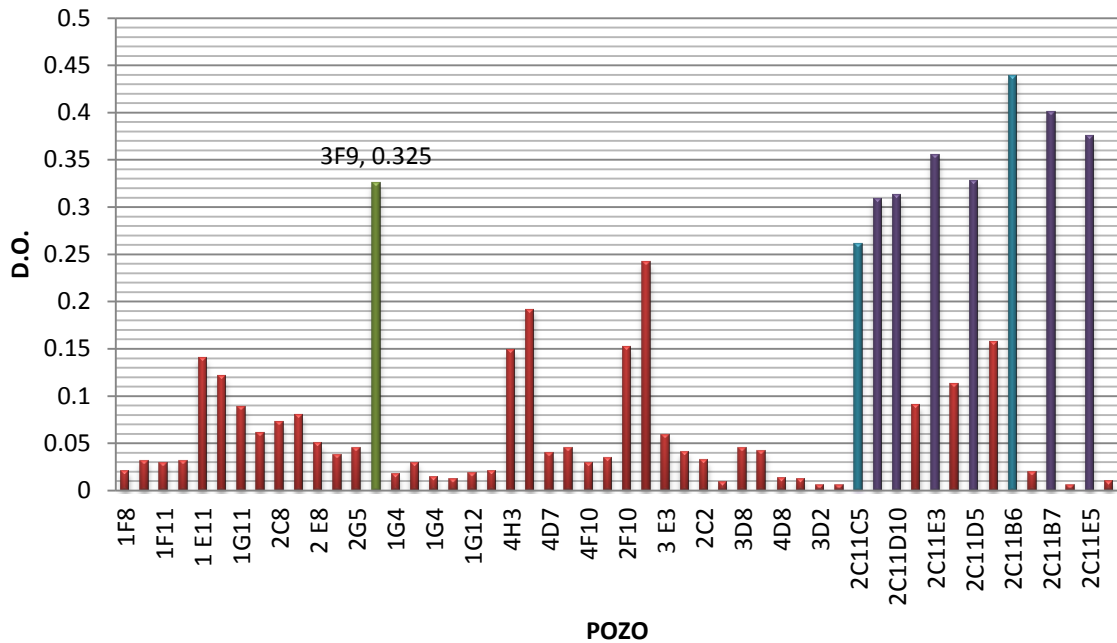


Como se observa en ambas gráficas se obtuvieron un total de 46 hibridomas positivos.

7.3 Clonación y subclonación.

De los 46 hibridomas se clonaron los de D.O más alta 4D12, 3E3, 3C3, 2C11, 2B3, 2B9, 3F9, 4D12, 3C4, 3G7, 2F2, 2F3, 1C8, 1F2, 1F11, 4D4, en su mayoría no proliferaron, es decir, que perdieron la capacidad de seguirse replicando y por lo tanto de producir anticuerpos, y solo hubo una que proliferó y se mantuvo positiva 2C11 y sus clonas como se observa en la Gráfica No.4.

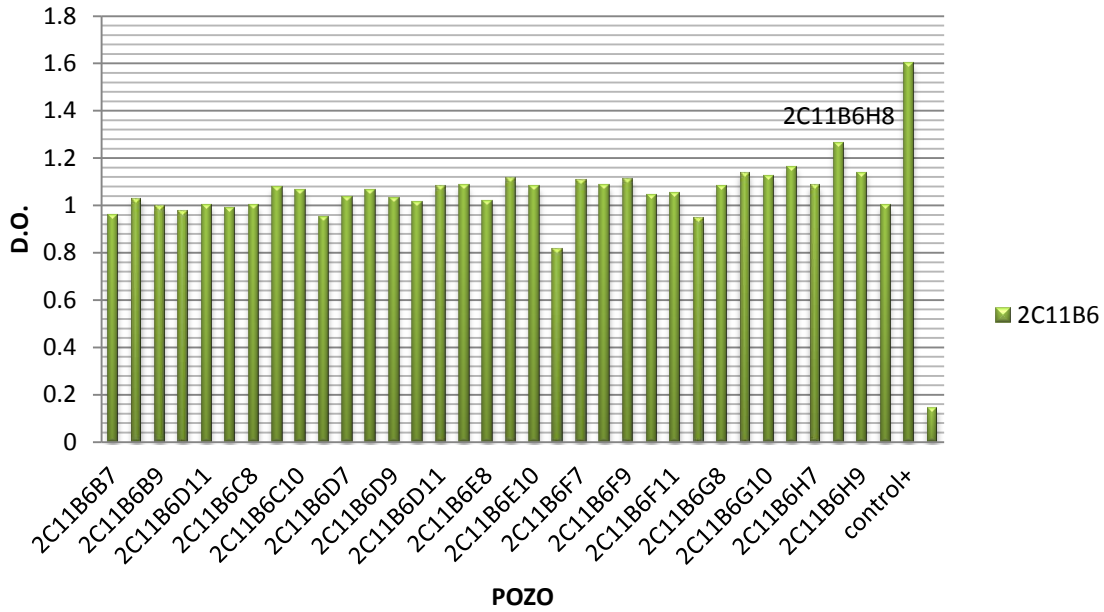
Gráfica No. 4 Determinación de anticuerpos anti-z15 de *Salmonella* Dahlem por ELISA indirecto en clonas



En el gráfico No.4 se observan algunos hibridomas que se probaron y que resultaron negativos, aunque se observa que 3F9 fue el único positivo pero la replicación de las células era muy lento, entonces se descartó y solo se eligió a 2C11 y sus clonas. Los valores de D.O. 2C11 se notan ligeramente bajos y esto se debió a que cuando se realizó la determinación por ELISA a los sobrenadantes, los pozos contenían poca cantidad de células.

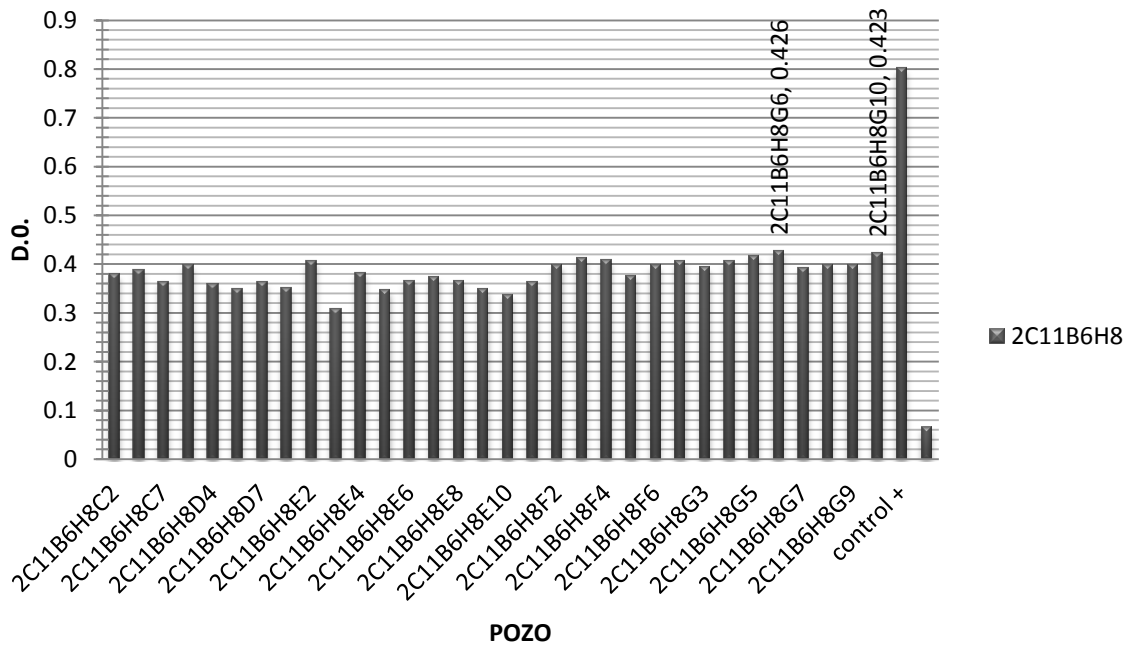
De 2C11 se eligió a 2C11C5 para subclonar, ya que éste pozo era el que contenía más células viables, y a 2C11B6 por su D.O. mayor a todos los demás, la técnica es la misma de clonación en este caso las clonas que se eligieron se vuelven a clonar por dilución limitada y el resultado se muestra en la gráfica No. 5.

Gráfica No.5 Determinación de Anticuerpos anti-z15 de *Salmonella* Dahlem por ELISA indirecto en clona 2C11B6



De la clonación de 2C11B6 se eligió a 2C11B6H8 para subclonar nuevamente.

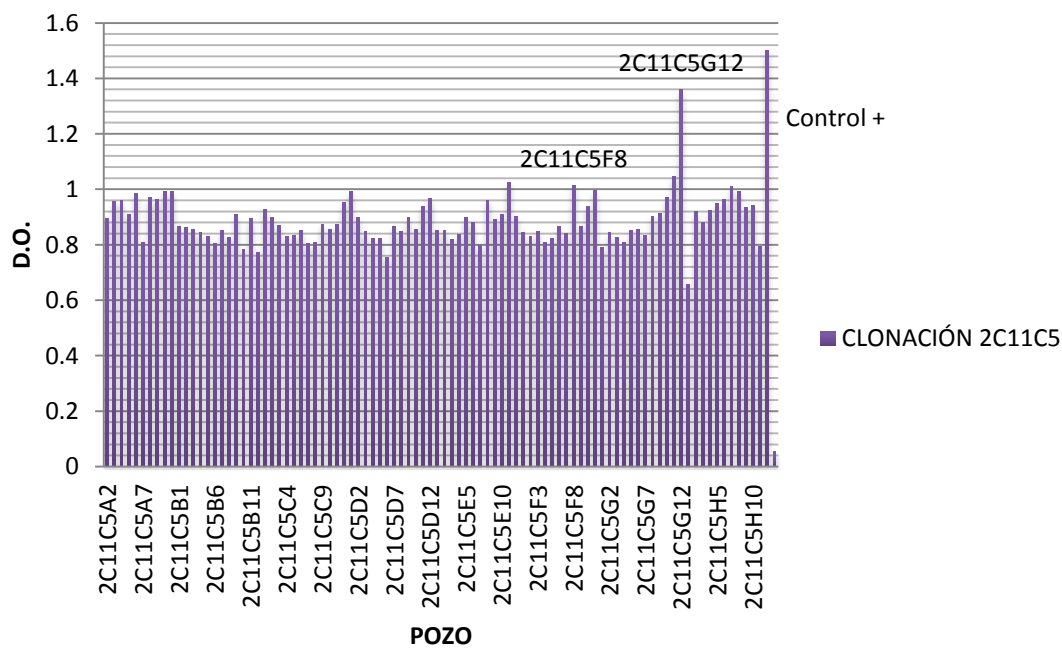
Gráfica No.6 Determinación de anticuerpos anti-z15 de *Salmonella* Dahlem, por ELISA indirecto en clona 2C11B6H8



De la subclonación de 2C11B6H8 se eligió a 2C11B8H8G6 y 2C11B6H8G10 siendo los valores más altos (Ver Gráfica No.6).

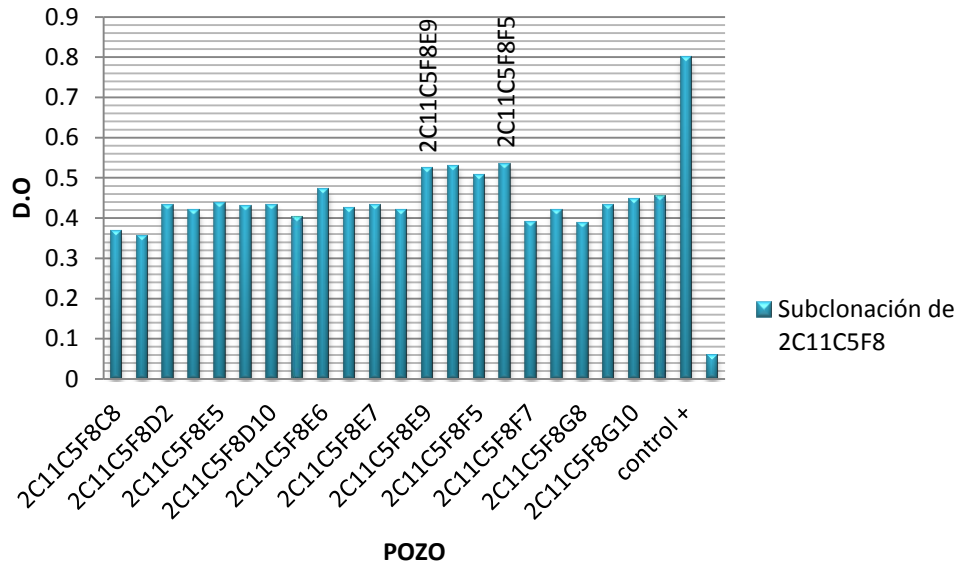
De todas las subclonaciones los valores de las D.O se notan disminuidos, pero en promedio es de 0.5 la D.O la cual se considera positiva con respecto al control negativo que se observa en cada gráfico.

Gráfica No.7 Determinación de anticuerpos anti-z15 de *Salmonella* Dahlem, por ELISA indirecto en clona 2C11C5



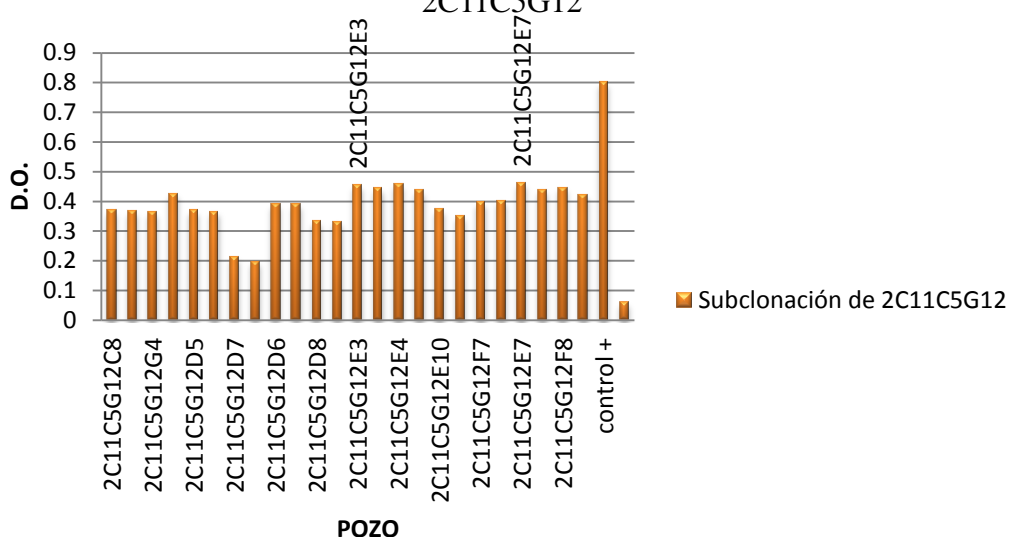
De la clonación de 2C11C5 se eligió a 2C11C5F8 y 2C11C5G12 para subclonar. (Ver gráfica No.7)

Gráfica No.8 Determinación de anticuerpos anti-z15 de *Salmonella* Dahlem, por ELISA indirecto en clonas de 2C11C5F8.



De la subclonación de 2C11C5F8 se eligió a 2C11C5F8E9 y 2C11C5F8F5 siendo los valores más elevados (Ver Gráfica No.8).

Gráfica No.9 Determinación de anticuerpos anti-z15 de *Salmonella* Dahlem, por ELISA indirecta en clonas de 2C11C5G12



De la subclonación de 2C11C5G12 se eligió a 2C11C5G12E3 y 2C11C5G12E7 siendo los valores más altos (Ver gráfica No.9).

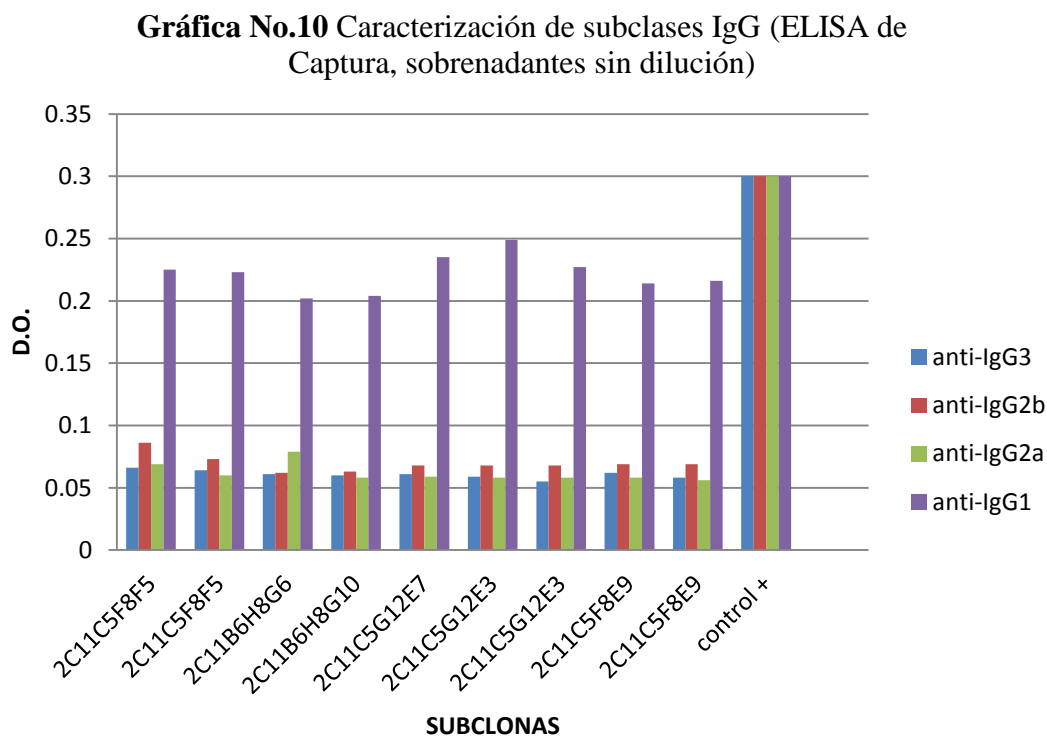
En la tabla No.6 Se muestran el resumen de resultados desde la selección de hibridomas positivos hasta las subclonaciones.

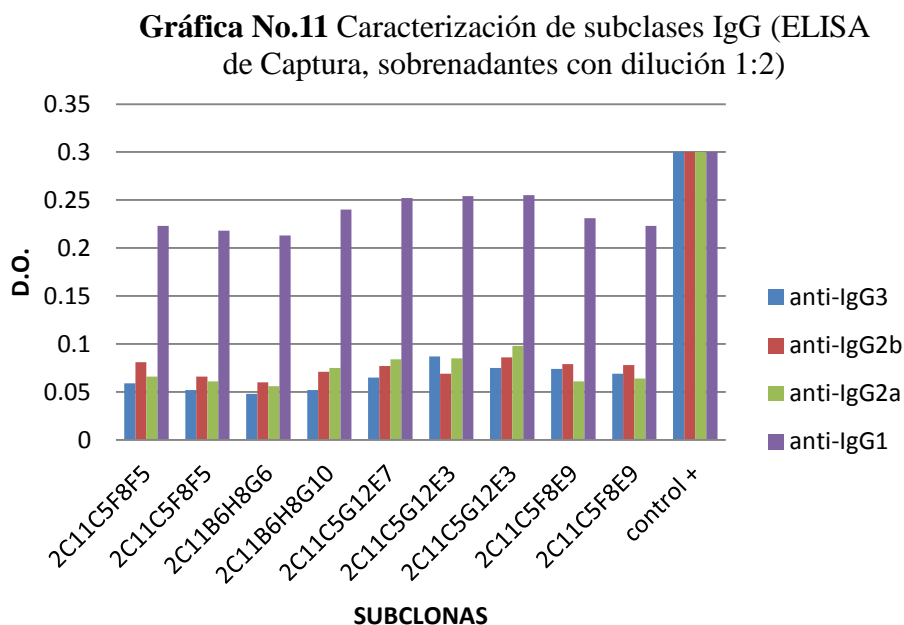
Tabla No 6. Resumen de resultados

Hibridoma	Clonas obtenidas	Subclonas obtenidas	AcMO
2C11	2C11C5	2C11C5F8	2C11C5F8F5
			2C11C5F8E9
		2C11C5G12	2C11C5G12E7
			2C11C5G12E3
	2C11B6	2C11B6H8	2C11B6H8G6
			2C11B6H8G10

7.4 Determinación de clase y subclase de anticuerpo.

Se realizó un ELISA de captura donde se probaron las subclases IgG1, IgG2a, IgG2b y la IgG3 de ratón del sobrenadante de cultivo de las clonas y el resultado se muestra en la gráfica No.10 y 11.

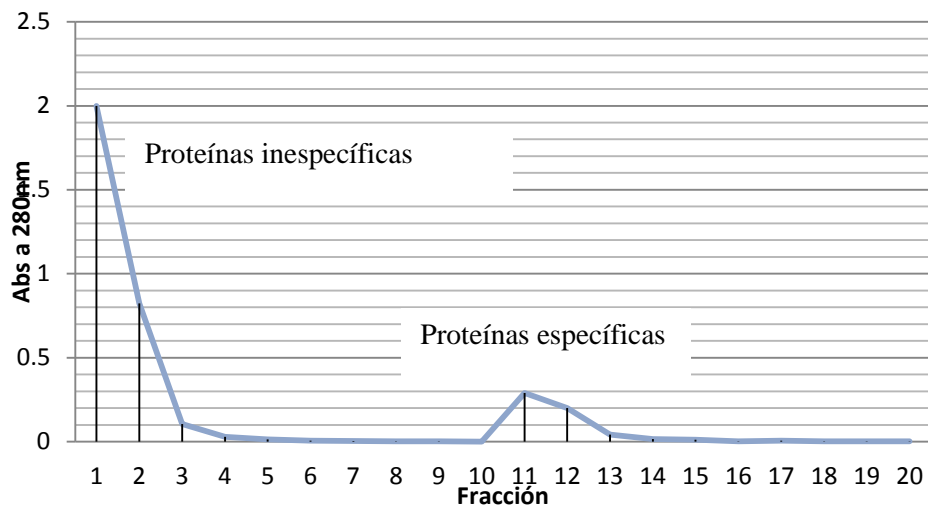




En esta determinación se encontró que los anticuerpos producidos son de subclases IgG1 de ratón, ya sea en sobrenadante sin diluir (gráfica 10) y corroborado al diluir 1:2 (gráfica11)

7.5 Purificación de anticuerpos

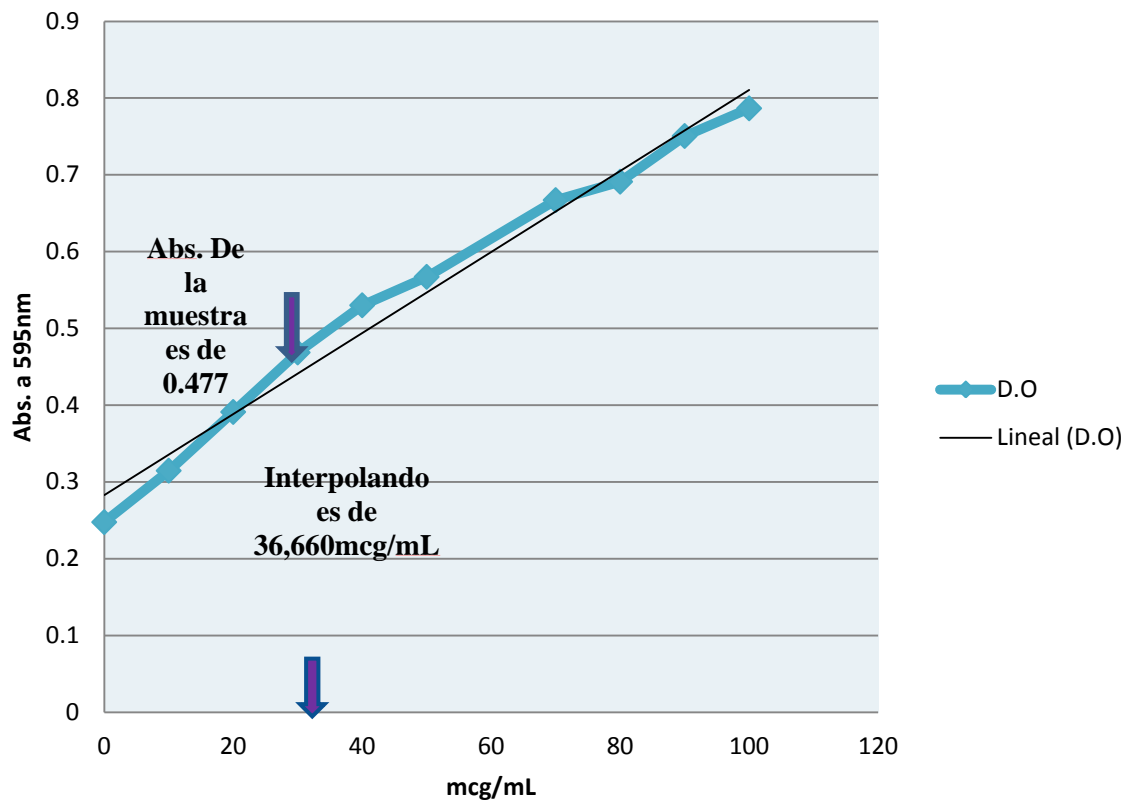
Se realizó la purificación de anticuerpos Monoclonales a partir de 50mL de sobrenadante recolectado, por cromatografía de afinidad con proteína A-Sepharosa CL4B con la finalidad de obtener un reactivo puro y el resultado de dicha purificación se muestra en la gráfica 12.



Gráfica No.12 Muestra el patrón de separación en la obtención de anticuerpos puros.

Esta gráfica muestra las absorbancias medidas en el espectro UV de la elución del sobrenadante que contiene los anticuerpos anti-z15, donde el primer pico corresponde a las proteínas inespecíficas del cultivo celular, que son del SFB utilizado como complemento del medio y el segundo pico indica la detección de los anticuerpos monoclonales puros.

Después de purificar el anticuerpo se le determinó concentración por el método de Bradford, como se puede ver en la gráfica 13.

Gráfica 13. Cuantificación de proteínas sin contemplar la dilución

El valor de absorbancia obtenido de la muestra de anticuerpo puro, se interpoló en la curva patrón y el resultado de concentración fue de 73.32 $\mu\text{g/ml}$, ya considerando linealidad de la recta y el factor de dilución de la muestra.

7.6 AcMo purificado, probado en ELISA indirecto

Para verificar que después del proceso de purificación el anticuerpo seguía conservando su actividad se evaluó por ELISA indirecto a una concentración de 20 $\mu\text{g/}$ y de ahí en diluciones dobles seriadas.

Gráfica No. 14 Determinación de Anticuerpos puros anti-z15 de Salmonella Dahlem por ELISA Indirecto

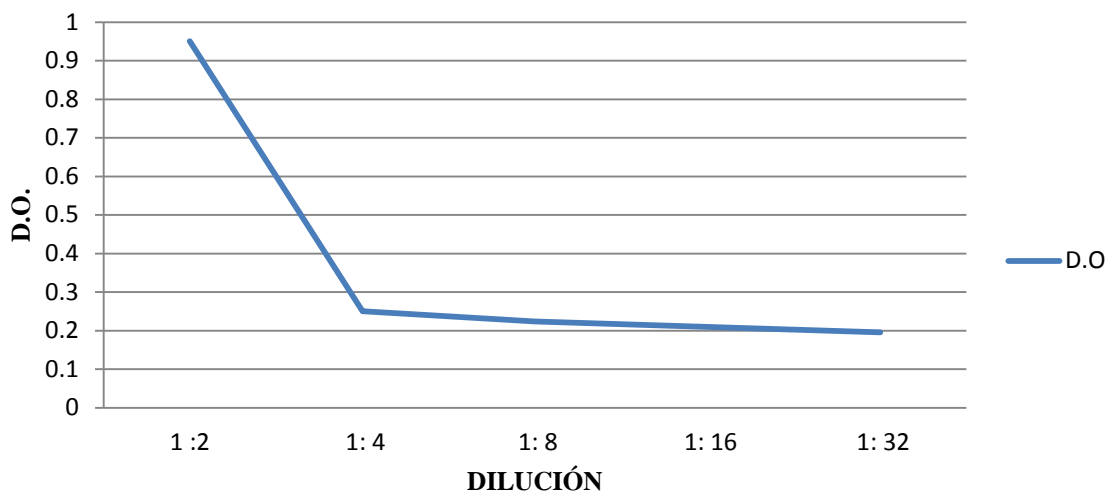


Gráfico 14. Muestra el efecto que tienen las diluciones dobles seriadas con la disminución en la reactividad del AcMo contra el Ag flagelar z15 de *Salmonella* Dahlem

7.7 Concentración por medio de kit de ultrafiltración MILLIPORE

Debido a la baja concentración del anticuerpo puro se procedió a concentrarlo por ultracentrifugación mediante un kit de ultrafiltración MILLIPORE PROSEP-A KIT Cat.No. LSK2ABA2, al cual se le determinó nuevamente la concentración de proteínas por el método de Bradford, y se probó en un ELISA indirecto para ver su actividad nuevamente. (Ver tabla No.7)

Tabla No.7 Resumen de los resultados obtenidos del anticuerpo monoclonal purificado, concentrado y evaluado por ELISA Indirecto.

AcMO	Concentración del AcMo puro	Concentración del AcMo concentrado	D.O. por ELISA
2C11C5G12E7	73.32 µg/ml	287.754 µg/ml	0.674

7.8 Inmuno ElectroTransferencia

Se realizó un ensayo de Inmuno Electro Transferencia para evidenciar el reconocimiento del AcMo hacia la proteína de interés la flagelina en condiciones reductoras (A) y no reductoras (B).

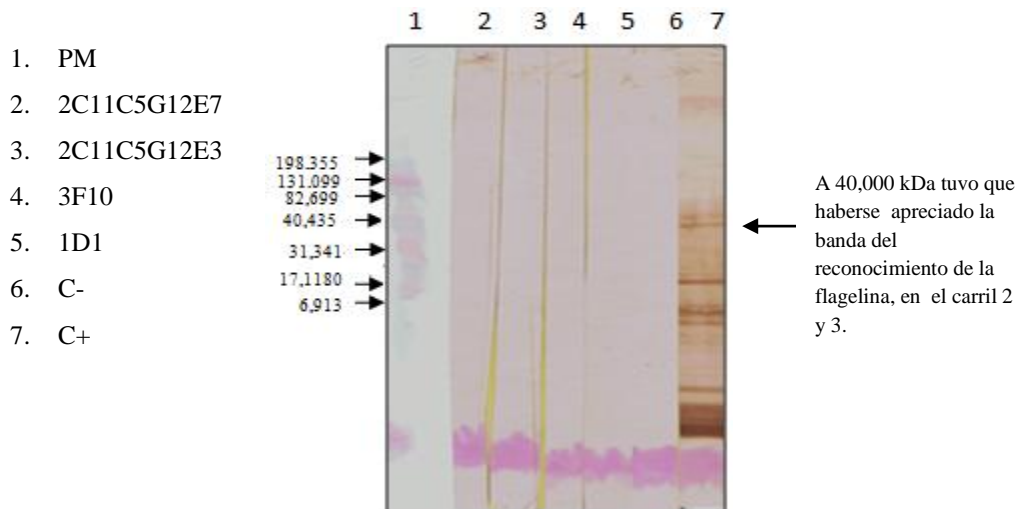


Figura 8. (A) Inmuno Electro Transferencia en condiciones reductoras, donde se probaron en el carril 2 y 3 los AcMo obtenidos y en el carril 4 y 5 dos hibridomas negativos, el carril 6 medio de cultivo celular y en el 7 suero hiperinmune del ratón diluido 1:1000.

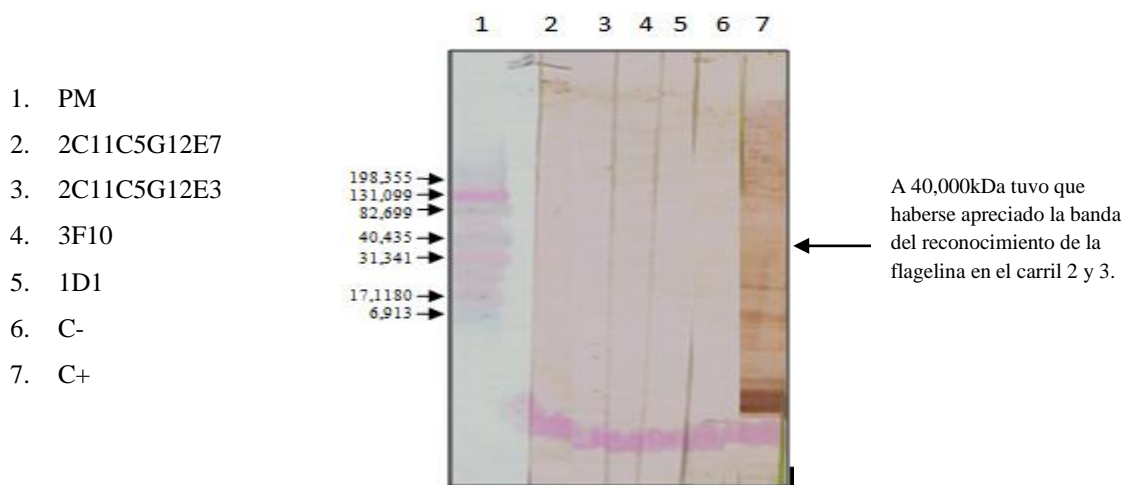


Figura 9. (B) Inmuno Electro Transferencia en condiciones no reductoras, donde se probaron en el carril 2 y 3 los AcMo obtenidos y en el carril 4 y 5 dos hibridomas negativos, el carril 6 medio de cultivo celular y en el 7 suero hiperinmune del ratón diluido 1:1000.

El ensayo de Inmuno Electro Transferencia donde se notó que el control positivo presenta bandeo, sin embargo los carriles que corresponden a los anticuerpos a pesar de que por ELISA presentan reconocimiento a su antígeno específico, no lo hacen por este ensayo, esto probablemente a que los anticuerpos están reconociendo un antígeno de tipo conformacional presente en ELISA y al linealizarlo o desnaturalizarlo en el proceso de Inmuno Electro Trnsferencia ya no hay reconocimiento.

8. DISCUSIÓN

La inmunización de los ratones BALB/c se realizó con solución formalinizada de *Salmonella* Dahlem crecida en fase 2: e, n, z15, cepa previamente caracterizada por el CDC, donde el formol fija a los flagelos y se obtienen soluciones flageladas, de tal modo que estos flagelos están constituidos por la proteína flagelina, con la cual se logró la inducción de la respuesta inmunitaria humoral en los ratones, ya que esta proteína es altamente antigénica, esto basado con otros estudios realizados, (Nalbantsoy Karaboz Deliloglu, 2010) debido a que se observaron elevados títulos de anticuerpos de acuerdo con la evaluación realizada por ELISA Indirecto.

La fusión se realizó con éxito, obteniendo hibridomas productores de anticuerpos contra la *Salmonella* Dahlem, esto también identificado en las evaluaciones de los sobrenadantes de cultivo de los hibridomas en crecimiento después de la fase de selección bioquímica en los ensayos de ELISA Indirecto.

En total de 46 híbridos se clonaron 16 y al final se seleccionaron 6 que son: 2C11C5F8F5, 2C11C5F8E9, 2C11C5F8F5, 2C11C5G1E7, 2C11B6H8G6, 2C11B6H8G10, por sus características de crecimiento *in vitro* después de los procesos de clonación y subclonación, por sus valores más altos de absorbancia por ELISA, y por su facilidad de crecimiento en pozos de placa y en botella.

La clonación permitió obtener clonas productoras de anticuerpos específicos a la cepa de *Salmonella* Dahlem y donde sólo prevaleció una línea de AcMo de origen 2C11 dado la evaluación por ELISA Indirecto.

Los procesos de subclonación nos permitió obtener clonas más estables y con mayor afinidad, además de garantizar la monoclonalidad de los anticuerpos.

No se probaron reacciones cruzadas con cepas distintas de *Salmonella*, debido a la carga de trabajo en el laboratorio de Producción de sueros del InDRE, que es el laboratorio que proporcionaba las soluciones formalinizadas de *Salmonella*, pero el resultado que tal vez se podía esperar, es que podría mostrar reacciones cruzadas con otras cepas de *Salmonella*, debido a que la estructura antigénica entre ellas es muy similar, un ejemplo es un ensayo que se realizó en el laboratorio de producción de AcMo, donde se probó un AcMo

producido contra el antígeno flagelar de *Salmonella* Johannesburg mediante un ELISA indirecto y en el cual se probaron diferentes cepas de *Salmonella* y resultó reacción cruzada con algunas de las cepas. Existen documentos en la bibliografía (De Vries N. y cols., *Applied and Environmental Microbiology* 64: 5033-5038 (1998); Sojka M. y cols., *Veterinary Microbiology* 78: 61-77 (2001)) en los que se describe la producción de anticuerpos monoclonales frente a antígenos flagelares de primera fase H: i y de segunda fase H:1,2 que presentan reacciones cruzadas debido a que dentro del grupo de cepas de *Salmonella* que se utilizan para demostrar la especificidad de los mismos anticuerpos, no aparecen representantes para todos los antígenos flagelares pertenecientes al complejo de segunda fase en este caso de H1 (H:1,2; H:1,5; H:1,6 y H:1,7), los cuales presentan una elevada similitud entre sí, así como el bajo número de cepas examinadas, tal es el caso de *Salmonella* Dahlem donde revisando en la literatura no se han reportado ensayos con ésta.

Debido a ello se desconoce si estos anticuerpos monoclonales presentan reactividad cruzada al ser enfrentados a los antígenos similares o no.

Con respecto a la caracterización de los anticuerpos monoclonales obtenidos resultaron ser de clase IgG, subclase IgG1 de ratón, que reconocen específicamente a su antígeno que les dio origen. La determinación de clase y subclase de AcMo en este ensayo resultó la inmunoglobulina más abundante en suero IgG, aunque existen ensayos de producción de AcMo reportados en la literatura en los cuales han determinado otras clases de inmunoglobulinas tal es el caso de IgA e IgM.

Fue importante conocer la clase y subclase del anticuerpo, para elegir el método de purificación de los mismos, en este caso la subclase IgG1 fué purificada por cromatografía de afinidad mediante columna de afinidad con proteína A sepharosa (*Staphylococcus aureus*), con la finalidad de eliminar contaminantes ya que los AcMo están contenidos en una mezcla sobrenadante de cultivo celular, donde sus contaminantes son agua, proteínas del suero utilizado como suplemento del medio de cultivo.

Después de purificar el anticuerpo y realizar la evaluación de su reactividad como anticuerpo monoclonal frente al Ag de *Salmonella* Dahlem en el ELISA Indirecto, se obtuvieron valores de absorbancia bajos de tal forma que se hizo necesario concentrarlos

mediante la técnica de ultrafiltración, y ya concentrados se volvieron a probar en ELISA Indirecto, corroborando de esta forma la reactividad de los AcMo contra el Ag flagelar de *Salmonella* Dahlem.

También se realizó un ensayo confirmatorio, una Inmuno ElectroTransferencia, donde se probaron los AcMo contra el Ag flagelar de *Salmonella* Dahlem y no se pudo observar ninguna reactividad de dichos AcMo, podemos justificar que con base a la literatura y comparando ensayos de Inmuno ElectroTransferencia probando AcMo contra Ag flagelar de *Salmonella* tal es el caso de la flagelina, las condiciones y concentraciones que utilizan en dichos estudios si varían respecto a las que se utilizaron en este trabajo, así como la pureza del mismo antígeno. Claramente no se puede explicar la falta de reconocimiento de los anticuerpos monoclonales en Inmuno Electro Transferencia pero se plantean dos probables aspectos: una es la concentración del AcMo en el sistema de detección y el otro es el tipo de antígeno que reconocen que puede ser de tipo conformacional y en este ensayo solo hay antígenos lineales dado que se trabajo con geles desnaturalizantes.

9. CONCLUSIONES

1. Se logró la inducción de la respuesta inmunitaria en ratones Balb/c con el antígeno de suspensión bacteriana serotipo de *Salmonella* Dahlem, cepa crecida con antígeno flagelar en fase 2: e, n, z15 y referida con el CDC.
2. Se obtuvieron hibridomas productores de anticuerpos contra el Ag flagelar en fase 2 z15 de *Salmonella* Dahlem evaluados mediante ELISA Indirecto.
3. Después de la clonación realizada tres veces, del hibridoma 2C11, se obtuvieron 6 clonas 2C11C5F8F5, 2C11C5F8E9, 2C11C5F8F5, 2C11C5G1E7, 2C11B6H8G6, 2C11B6H8G10 productoras de anticuerpos monoclonales contra el serotipo de *Salmonella* Dahlem, cepa crecida con antígeno flagelar en fase 2: e, n, z15.
4. Se determinó la clase de AcMo de ratón producido el cual resultó IgG y subclase IgG1.
5. Se obtuvo un anticuerpo monoclonal puro y concentrado, el cual se evaluó su reactividad contra el Ag flagelar en fase 2 z15 de *Salmonella* Dahlem mediante ELISA Indirecto y en la cual sí se evidenció dicha reactividad.
6. No se corroboró la reactividad del AcMo obtenido, frente al antígeno flagelar en fase 2 de *Salmonella* Dahlem, mediante el ensayo de Inmuno Electro Transferencia.

10. PERSPECTIVAS:

- Se plantea, probar este AcMo con otras cepas de *Salmonella* de distinta antígeno flagelar y somático, para garantizar su especificidad de serovariedad.
- Se plantea como alternativa en la obtención de anticuerpos monoclonales contra el flagelo del serotipo de *Salmonella* Dahlem, cepa crecida con antígeno flagelar en fase 2: e, n, z15; inmunizar y realizar las evaluaciones por ELISA con un antígeno flagelar (flagelina) puro, teniendo como alternativa las recomendaciones citadas en el artículo de Nalbantsoy Ayse, Karaboz Ismail, and Deliloglu Ismet Gurhan, 2010 Vol 29:5, 419-423.
- Se plantea realizar varios ensayos de Inmuno Electro Transferencia, donde se prueben distintas concentraciones de AcMo, tiempos de incubaciones para analizar comparar resultados con los obtenidos en este trabajo..
- Se plantea que a los AcMo obtenidos, sean aplicados en evaluaciones en otros ensayos inmunológicos, para que con ello se pueda corroborar que éstos AcMo son aptos para ser utilizados como reactivos altamente específicos en el diagnóstico serológico de *Salmonella*, principalmente de *Salmonella* Dahlem.
- Se sugiere al Laboratorio de Producción de Sueros del InDRE, tomar en cuenta que los AcMo obtenidos, sean utilizados en ensayos de ELISA Indirecto, como ensayo ampliamente recomendado.
- Como sólo se eligió a un AcMo de los seis obtenidos, para purificar, concentrar y evaluar en ELISA Indirecto, ya que experimentar con todos a la vez es muy trabajoso por cuestiones de tiempo, material, reactivos, entre otros, se propone volver a seleccionar otro AcMo, y así comparar con los utilizados en este trabajo para encontrar en su caso el o los de mejor reconocimiento a su antígeno que pueda ser aplicados en el diagnóstico serológico.

11. BIBLIOGRAFÍA

- Álvarez L. Vallina Anticuerpos Monoclonales Realidades y Perspectivas, Editorial Complutense S. A. España 2004:
- Biarnés M. Técnica de Referencia Europea para la Detección de *Salmonella spp.* Centro de Sanidad Avícola de Cataluña. CESAC 2011,3-61.
- Caffer M. I.Terragno R. Manual de procedimientos para la caracterización de *Salmonella* Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas Departamento Bacteriología Servicio Enterobacterias “Dr. Carlos G. Malbrán”, Argentina. 2001, 2-37.
- Calderón R. V. Curso de Inmunología, Instituto de Biotecnología Universidad Nacional Autónoma de México, México, 2007,4-52.
- Carpio J, Medina Y. XIV Taller de producción de anticuerpos monoclonales contra agentes infecciosos y otras moléculas, Secretaría de Salud. México. 2007.
- Carpio J. Medina Y., Mata O., Medina E., Gutiérrez A., Manal XV Taller Internacional de Producción de Anticuerpos Monoclonales contra Agentes Infecciosos y otras Moléculas, Secretaria de Salud México. 2011.
- Estrada L., Flores J. Perspectivas en la Biología y en la Física, segunda parte, Universidad Nacional Autónoma de México, 1990:179-180.
- Figueroa O. Verdugo A. Mecanismos moleculares de patogenicidad de *Salmonella* sp. Revista Latinoamericana de Microbiología; 2005, 47: (1-2), 25-42.
- Floess E, Adridge C. Continuous control of flagellar gene expression by the σ_{28} -FlgM regulatory circuit in *Salmonella enteric*. Molecular Microbiology; 2010, 10:(1111/j) 1365-2958.
- Guibourdenche M, Roggentin P, Mikoleit M. Supplement 2003-2007 (No. 47) to the White-Kauffmann-Le Minor schem. Research in Microbiology. Intitut Pasteur; 2010, 161, 26-29.
- Ibrahim G., Fleet G., Lyonsm, Method for the Isolation of Highly Purified Salmonella Flagellins, Journal of Clinical Microbiology, 1985:22:1040-1044.
- Igraham J. Igraham C. Introducción a la microbiología, Editorial Reverté, España, 1998, vol. II, 411-414.

- Katime Z.A. Reacción de Widal-interpretación clínica. Rev. Infectología Panamericana; 2006 8:(2)40-42.
- Koolman J. Bioquímica Texto y Atlas, 3ª Edición, Editorial Médica Panamericana, Alemania; 2004, 304-306.
- Koneman E. Diagnóstico Microbiológico Texto y Atlas a color 6ª. Edición, Ed. Médica Panamericana, Argentina.2008, 110-112, 242.
- Llu R, Ochman H. Stepwise formation of the bacterial flagellar system. PNAS The National Academy of Sciences of the USA; 2007, 104: (7).
- Maher A. Monoclonal Antibodies Methods and Protocols Ed. Humana Press, USA, 2007, 227.
- Marcjanna G. Sojka, Michael Dibb-Fuller, Christopher J. Thorns, Characterisation of monoclonal antibodies specific to SEF 21 fimbriae of *Salmonella enteritidis* and their reactivity with other Salmonellae and Enterobacteria, Veterinary Microbiology 48 (1996) 207-22 I
- Mark J. Pallen N. From the Origen of species to the origin of bacterial flagella. Science and Society, Nature Reviews Microbiology; 2006,4, 784-788.
- Mitov I, Georgev G, Ivanova R. Monoclonal antibody against O: 5 *Salmonella* antigen cross-reacts with unidentified lipopolysaccharide epitope of *Salmonella* serogrupo O : 8 (C₂-C₃). FEMS Microbiology letters; 2003., 225, 299-304.
- Nalbantsoy Ayse, Karaboz Ismail, and Deliloglu Ismet Gurhan, Production of Monoclonal Antibody Against *Salmonella* H:g,m Flagellar Antigen and Potential Diagnostic Application, Hybridoma, 2010 Vol 29:5, 419-423.
- Paniagua G. L. Monroy E. Vaca S. Prevalencia de *Salmonella spp* en diarrea de niños de zona urbana del Estado de México. Revista médica del Hospital General de México; 2008, vol.71(4) 192-198.
- Parra M, Durango J, Máttar S. Microbiología, Patogénesis, Epidemiología Clínica y Diagnóstico de las Infecciones producidas por *Salmonella*. MVZ-Córdova; 2002, 7:(2), 187-200
- Patrick A. Weill F. Antigenic formulae of the *Salmonella* serovars. 9ª. edición. Institut Pasteur, Francia.2007, 166.

- Pereira C., Mimica I., Takeda A., Reacciones de aglutinación automatizadas para la detección de antígeno Australia, anticuerpos antipolisacáridos de *t. cruzi* y anticuerpos contra antígenos flagelares de *Salmonella*, Bulletin of the Pan American Health Organization, 1980: 12,(4)119-126.
- Pumarola A. Microbiología y Parasitología 2a edición, MASSON, España.1987:422-427.
- Romero R. Herrera B.Síndrome diarreico infeccioso, editorial Médica Panamericana, México, 2002, 443-450
- Sikora K, Smedley H.M. Anticuerpos monoclonales, editorial Reverté, España, 1986:

11. ANEXO I. SOLUCIONES Y REACTIVOS.**1. Solución amortiguadora de fosfatos PBS:**

- A 100 ml de PB 10X y 8.75g de NaCl, agregar 800 ml de agua bidestilada, medir el pH ajustando a 7.2 aforando a un volumen final de 1000 ml.
- Guardar a 4°C.

2. Solución de lavado, PBS-tween:

- A 1000 ml de PBS agregar 500 µL de tween 20, aforar a un volumen final de 1000 mL.
- Guardar a 4°C.

3. Acido sulfúrico concentración 2N:

- A 850 mL de agua bidestilada agregar cuidadosamente 56.06mL de ácido sulfúrico, aforar a un volumen final de 1000 ML

4. Solución de citrato de sodio 0.1M:

- Pesar 29.41g de citrato de sodio, y se disuelven en 800mL de agua bidestilada, y aforar a un volumen final de 1000mL.

5. Solución de ácido cítrico 0.1M

- 21.44g de ácido cítrico se disuelven en 500mL de agua bidestilada.

6. Solución cromógeno sustrato para peroxidasa (Solución reveladora).

- Pesar 4mg de orto-fenilendiamina(OPD)
- Añadir 5mL de ác. Cítrico 0.1M y 5mL de citrato de sodio 0.1M
- Adicionar 4µL de H₂O₂. AL 30%.

7. Solución de bloqueo I (leche descremada al 5%)

- Pesar 5g de leche descremada en polvo.
- Disolver en 100mL de PBS-tween 20

- Mantener a -20°C

8. Amortiguador de boratos/NaCl,pH 8.0

- Disolver 6.18g de ácido bórico, 9.54g de tatraborato de sodio y 4.38g de cloruro de sodio en 800mL de agua bidestilada.
- Ajustar el pH a 8
- Aforar a 1000mL
- Conservar a 4°C

9. Solución Salina 5%

- Pesar 5g de cloruro de sodio
- Disolver en 50mL de de agua bidestilada
- Aforar a 100mL con agua bidestilada
- Guardar a 4°C

10. Alcohol 70%

- Medir 70mL de de alcohol absoluto
- Mezclar con 30mL de agua bidestilada
- Guardar a temperatura ambiente

11. Solución cromógeno sustrato (inmunoelectrotransferencia)

- Pesar 30mg de 3,3'-Diaminobenzidina
- Añadir 60mL de PBS
- Agregar $6\mu\text{L}$ de peróxido de Hidrógeno al 30%

NOTA: Esta solución se prepara inmediatamente antes de usarla

12. Acrilamida 30%-bis-Acrilamida 0.8%

- Pesar 29.2g de acrilamida (99.9% pureza) más 0.8%g de bisacrilamida.
- Disolver en agua bidestilada y aforar a 100mL
- Filtrar con papel Whatman 1

- Guardar en frasco color ámbar a 4° C

NOTA: manejar con guantes y cubrebocas este reactivo es neurotóxico.

13. Amortiguador del gel separador: Tris –Base 1.5M, pH 8.8

- Disolver 18.17g de Tris- Base, en 85mL de agua bidestilada
- Disolver el pH poco a poco con HCl concentrado hasta que se alcance un pH de 8.8
- Aforar a 10mL con agua bidestilada
- Guardar a 4°C

14. Amortiguador de gel concentrador: Tris-HCl 0.5M pH6.8

- Pesar 6.05g de Tris en 85mL de agua bidestilada
- Ajustar el pH con HCl 1N, hasta que el pH sea de 6.8
- Aforar a 10mL con agua bidestilada
- Guardar a 4°C

15. Amortiguador para electroforesis (Tris-glicina-SDS)

- Medir 200mL de Tris- Glicina SDS 5X
- Aforar a 1000mL con agua bidestilada.
- Guardar a 4°C

16. Tris –glicina-SDS 5X:

- 15g de tris-base + 72g de glicina + 5g de SDS en 1000mL de agua bidestilada

14. Amortiguador de transferencia (Tris 0.025M, glicina 0.192M, metanol 20% v/v, pH 8.3)

- Medir 12.5mL de Trizma-base, agregar 14.49g de glicina y añadir 200mL de metanol
- Aforar a 1000mL con agua bidestilada.
- Guardar a 4°C

15. Medio RPMI ó DMEM

- Disolver un sobre de medio RPMI ó DMEM, en 800ml de agua tridestilada y desionizada.
- 2g de bicarbonato de sodio grado cultivo celular.
- 2g de HEPES ó 16.78ml para 2 L.
- 10ml de antibiótico antimicótico 100X
- 16ml de L-Glutamina 200mM
- 1ml mercaptoetanol 50mM estéril
- 10ml de aminoácidos esenciales 100X
- 0.2g de piruvato de sodio, ó piruvato de sodio 100mM 18.2ml
- 1ml de tilosina 1000X
- Ajustar el pH a 6.8
- Aforar a 1000ml
- Esterilizar por filtración en membrana de 0.22 μ m
- Almacenar en frascos estériles de 100ml y guardar a 4°C.

16. Suero Fetal Bovino descomplementado

- Suero de ternera fetal grado cultivo celular (Hyclone No. Cat. SH30070-03)
- Mantener durante 30 min a 56°C en baño María para descomplementarlo
- Fraccionar en tubos estériles de 50mL y almacenarlos a -20°C.

17. Solución de criopreservación

- Mezclar 9 partes de suero fetal descomplementado con 1 parte de dimetil-sulfóxido estéril, v/v.

18. Glicina 0.1 M pH 2.5

- Pesar 9.2g de glicina
- Disolver en 800mL de agua bidestilada
- Ajustar pH a 2.5
- Aforar a 1000mL

19. Medio selectivo con hipoxantina, aminopterina y timidina (HAT)

- Agregar 2mL de HAT 50X a 100ml de RPMI complementado.
- Conservar a 4°C

20. Medio selectivo con hipoxantina timina (HT)

- Agregar 2ml de HT 50X a 100mL de RPMI complementado con SFB

21. Solución de polietilenglicol (PEG 1300-1600)

- Derretir el reactivo en baño María a 50-60°C
- Diluir al 42-43% con medio de cultivo DEMEM, sin suero a 45°C
- Ajustar pH a 7.5-8, hasta que el reactivo, después de 10 min adquiera una coloración rojizo-violeta.
- Fraccionar en volúmenes de 0.5ml
- Almacenar a 4°C

22. Amortiguador de muestra

- 1.0mL de 0.5M Tris-HCl, pH 6.8
- 4.0ml de agua destilada
- 0.8mL de glicerol
- 1.6mL SDS 10%
- 0.4ml 2-mercaptoetanol
- Pironina

22. Rojo de Ponceau 0.2% en ácido tricloroacético 3%

- Pesar 200mg de rojo de Ponceau y añadir 3g de ácido tricloroacético.
- Aforar a 100mL con agua bidestilada
- Mantener a 4°C en frascos de color ámbar

12. ANEXO II

Procedimientos utilizados en algunas de las metodologías.

INMUNIZACIÓN

***Vía intraperitoneal**

1. Sostener al ratón con el tórax hacia arriba, sujetando con el dedo índice y pulgar la piel del cuello del animal, cercano a la nuca y la cola entre el dedo anular y meñique, colocar el animal en forma inclinada, con la cabeza hacia abajo.
2. Limpiar la zona abdominal con alcohol e introducir la aguja calibre 27 a través del peritoneo en posición inclinado a inyectar el antígeno.

***Vía intravenosa (para ratones)**

1. Colocar el animal sobre la jaula
2. Fijar la cola del animal en forma horizontal, procurando que la vena caudal quede a la vista.
3. Limpiar la cola con alcohol al 70%
4. Inocular el antígeno directo a la vena con una jeringa para insulina calibre 25x16mm.

OBTENCIÓN DE SANGRE

***Retroorbital.**

1. Sujetar al animal y colocarlo con el tórax hacia arriba.
2. Introducir un tubo capilar en el ángulo externo del ojo hasta encontrar el seno venoso. La sangre fluirá inmediatamente por capilaridad hacia el interior del tubo.
3. Limpiar el ojo con un algodón humedecido con agua estéril.

***Venosa (Para animales pequeños)**

1. Colocar el animal sobre la jaula
2. Fijar la cola del animal en forma horizontal, procurando que la vena caudal quede a la vista
3. Limpiar la cola con alcohol al 70%, así como las tijeras para disección.
4. Realizar un pequeño corte de cola, procurando que sea la última parte del extremo final de la misma.
5. Recolectar la sangre en tubos Eppendorf. (Tratar de sostener la cola y jalar con los dedos pulgar e índice hacia el extremo que gotea la sangre, cuantas veces sea necesario para obtenerla con mayor facilidad y rapidez.)

SACRIFICIO DE ANIMALES (ratón y rata)***Dislocación cervical**

1. Colocar el animal sobre la jaula tratando que el animal se sujete de la reja, y con ayuda de un lápiz hacer presión sobre el cuello del animal, y deteniendo la cola bien sujetada con los dedos pulgar, índice y medio, jalarla en un solo movimiento.

ALGUNOS MÉTODOS DE CULTIVO CELULAR**Congelación de células**

1. Se obtiene el sobrenadante del cultivo celular mediante centrifugación 2500rpm por 10 min., el cual será evaluado para verificar la producción de anticuerpos, y las células que se encuentran en el sedimento se resuspenden en 1 mL de solución crioprotectora(Solución17), en un vial de congelación y se envuelven en una capa de algodón de 1cm de espesor y conservarlo a -70°C dentro de una caja de poliuretano durante un día para transferirlo al siguiente día al nitrógeno líquido.

Descongelación de células.

1. Cuando se requieran usar células mantenidas en congelación, el vial se descongelará rápidamente en baño María a 37°C y las células se transfieren a un tubo cónico con 8mL de medio RPMI-1640, enriquecido con 10% de SFB y precalentado a 37°C.
2. Se centrifuga a 1 200rpm durante 10min a 37°C.
3. Resuspender el paquete celular en 7mL de RPMI-1640 enriquecido con SFB al 20%.
4. Cultivar en pozos de 200, 1000 ó 2000µL, dependiendo de la cantidad de células recuperadas.