

42
9m



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO**

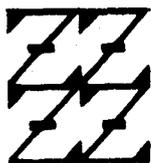
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

**OBTENCION DE UN ANTICUERPO
MONOCLONAL ANTI-LIPIDO A**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO
P R E S E N T A
MARIA DEL CARMEN MONTAÑO LECHUGA

U N A M
F E S
Z A R A G O Z A



LO HUMANO ES
DE NUESTRA REFLEXION

ASESOR DE TESIS: DR. JORGE FERNANDO PANIAGUA SOLIS

MEXICO, D. F.

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

1996

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



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.

JURADO ASIGNADO

Presidente:	Q.F.B.	MARTHA A. SANCHEZ RODRIGUEZ
Vocal:	Dr.	JORGE FERNANDO PANIAGUA SOLIS
Secretario:	Dr.	JORGE FLAVIO MENDOZA RINCON
Suplente:	Q.F.B.	JOSE OSCAR GONZALEZ MORENO
Suplente:	Q.F.B.	YOLANDA FLORES CABRERA

Este trabajo se realizó en la Unidad de Investigación Médica en Inmunoquímica del Hospital de Especialidades. Centro Médico Nacional Siglo XXI, Instituto Mexicano del Seguro Social; bajo la tutoría del Dr. Jorge Fernando Paniagua Solís y cotutoría del Dr. Armando Isibasi Araujo.

Asesor


Dr. Jorge A. Paniagua Solís

Sustentante


Maria del Carmen Montaña Lechuga

**Agradezco a la Universidad Nacional Autónoma de México el
haberme brindado la oportunidad de realizar una carrera profesional
de manera gratuita.**

AGRADECIMIENTOS

A DIOS

A MI MADRE: Porque a pesar de los obstáculos, tuvo la valentía y la decisión de salir adelante para darnos lo mejor. Te amo.

A MI PADRE MANUEL: q.e.p.d.

A MIS HERMANOS: Gaby y Julio por las alegrías vividas a su lado (y todas las que nos faltan). Los quiero mucho.

A MIS TIOS: Antonio, Concepción, Guadalupe y Roberto Angel, por su ayuda incondicional y apoyo en los momentos difíciles.

A MIS PRIMOS: Lety, Adan, Cristina e Isacc por las aventuras compartidas. Están loquísimos.

A MI GRAN AMIGO: Dr. Antonio Ramirez por su invaluable ayuda en el desarrollo del presente trabajo; pero sobretodo por sus consejos y la gran amistad que siempre me brindó y espero me siga brindando. Gracias.

A MIKE CHUMACERO: Por haber compartido sus alegrías y anécdotas con nosotras. Es único.

A MIS AMIGAS: Rosa María Salazar, Magda Rojas, Yolanda, por todas las aventuras vividas a lo largo de la profesión, pero aún más, por las que compartimos en la unidad.

A TODOS MIS AMIGOS. GRACIAS.

Quiero agradecer de manera especial al **Dr. Armando Isibasi** por darme la oportunidad de colaborar junto al gran equipo que ha creado; y también por haberme permitido contribuir con mi grano de arena a los excelentes proyectos que en la unidad llevan a cabo.

Agradezco también los valiosos consejos, amistad y paciencia de:

Dr. Jorge Paniagua S.
Dr. Vianney Ortiz N.
Dr. Manuel Carrera C.
Dr. Cesar González B.
Dr. Constantino Lopez M.
Dra. Natalia Martín O.
M en C. Sara Huerta Y.
M en C. Mario Vega P. (bar)
M en C. Jose Luis Ramirez T.
M en C. Rebeca Alvarez C.

A TODOS MIS COMPAÑEROS DE LABORATORIO

INDICE

I.	RESUMEN	1
II.	MARCO TEORICO	2
1.	Generación de anticuerpos	
1.1	Estructura de las inmunoglobulinas	
1.2	Diversidad de los anticuerpos	
1.3	Obtención de anticuerpos monoclonales	3
1.3.1	Células de mieloma	
1.3.2	Fusión celular	
1.3.3	Selección de hibridomas	
2.	Aplicaciones de los anticuerpos monoclonales	6
3.	Métodos de purificación de anticuerpos	7
3.1	Proteína G	
4.	Sistema estreptoavidina biotina	9
5.	Ensayos inmunoenzimáticos en fase sólida	10
6.	Endotoxina	11
6.1	Estructura	12
6.2	Propiedades biológicas	14
6.2.1	Respuesta celular	
6.2.2	Respuesta a nivel bioquímico	
6.3	Choque endotóxico	15
6.3.1	Mecanismo de acción	
6.3.1.1	Proteína que une LPS	
6.3.1.2	CD14, receptor para el complejo LPS-LBP	
6.3.1.3	Ceramida	
6.4	Susceptibilidad y tolerancia a la endotoxina	18
6.5	Análogos del lípido A	
7.	Fiebre tifoidea	19

III.	PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	21
IV.	HIPOTESIS	22
V.	OBJETIVOS	23
VI.	MODELO EXPERIMENTAL	24
VII.	MATERIALES Y METODOS	25
	1. Esquema de inmunización	
	2. Titulación del suero de ratón	
	3. Obtención de anticuerpos monoclonales	26
	3.1 Crecimiento de células Ag8	
	3.2 Obtención de macrófagos como células alimentadoras	
	3.3 Producción de hibridomas	
	3.4 Selección de hibridomas	27
	3.5 Clonación de hibridomas	28
	3.6 Propagación <i>in vivo</i>	
	3.7 Cultivo de agotamiento	
	3.8 Criopreservación	
	4. Determinación de la cadena pesada de los anticuerpos	29
	5. Purificación de los anticuerpos por cromatografía de afinidad	
	6. Unión química de los anticuerpos a la biotina	30
	7. ELISA de doble anticuerpo	
VIII.	RESULTADOS	32
	1. Análisis del suero de los ratones inmunes	
	2. Detección de hibridomas	34
	3. Clonación de hibridomas	36
	4. Evaluación de la respuesta del anticuerpo monoclonal con diferentes LPS	37

5.	Rendimiento obtenido del anticuerpo monoclonal en ascitis y sobrenadante	38
6.	Determinación de la cadena pesada de la inmunoglobulina	
7.	Titulación del anticuerpo unido a biotina	40
8.	ELISA de doble anticuerpo	41
IX.	ANALISIS DE RESULTADOS	42
X.	CONCLUSIONES	47
XI.	PERSPECTIVAS	48
XII.	REFERENCIAS	49

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Representación esquemática de la unidad básica de las inmunoglobulinas	3
Figura 2. Vías utilizadas por las células de mamíferos para la síntesis de nucleótidos	5
Figura 3. Procedimientos de purificación más importantes para anticuerpos monoclonales	8
Figura 4. Localización del lipopolisacárido en las bacterias Gram negativas	11
Figura 5. Diferentes LPS de cepas mutantes de <i>Salmonella</i> , mostrando los diversos grados de expresión molecular	12
Figura 6. Estructura molecular del lípido A de <i>Salmonella</i>	13
Figura 7. Papel central de LBP y CD14 en la estimulación celular dependiente de lipopolisacárido	17
Figura 8. Comparación estructural de la ceramida y el lipopolisacárido	19
Figura 9. Reconocimiento de la porina Omp C por el suero de los ratones inmunizados	32
Figura 10. Reconocimiento del LPS-Re por el suero de los ratones inmunizados	33
Figura 11. Hibridomas secretores de anticuerpos anti-Omp C	34
Figura 12. Hibridomas secretores de anticuerpos anti-LPS	35
Figura 13. Clonas productoras de anticuerpo monoclonal anti-Omp C y anti-LPS	36
Figura 14. Reactividad del anticuerpo monoclonal G3B7 contra el LPS de <i>Salmonella typhi</i> y el LPS de <i>Salmonella minnesota</i>	37
Figura 15. Isotipificación del anticuerpo G3B7	38

Figura 16. Isotipificación del anticuerpo obtenido en el líquido de ascitis purificado	39
Figura 17. Titulación del anticuerpo monoclonal unido a la biotina	40
Figura 18. Fenómeno de dosis altas	45

INDICE DE TABLAS

TABLA 1. Aplicaciones de los anticuerpos monoclonales	7
TABLA 2. Actividades biológicas de la endotoxina	14

PRINCIPALES ABREVIATURAS

AMP	Adenosín monofosfato
BCG	Bacilo de Calmette y Guérin
D.O.	Densidad óptica
ELISA	Ensayo inmunoenzimático en fase sólida
GM-CSF	Factor estimulador de colonias de granulocitos y monocitos
HAT	Medio de cultivo suplementado con hipoxantina, aminopterina y timidina
HAz	Medio de cultivo suplementado con azarina
HGPRT	Hipoxantina guanina fosforribosiltransferasa
KD	Kilodaltones
KDO	Acido 3-deoxi-D-mano-2-octulosónico
LBP	Proteína que une lipopolisacárido
LPS	Lipopolisacárido
OmpC	Proteína de membrana externa presente en bacterias Gram negativas
PBS	Solución reguladora de cloruro de sodio y fosfatos
RPMI	Medio de cultivo celular
SFB	Suero fetal bovino
TK	Timidina Cinasa
TNF	Factor de necrosis tumoral
Tris	Tris-(hidroximetil)-aminometano

I. RESUMEN

Es en las infecciones causadas por bacterias Gram negativas; donde el lipopolisacárido (LPS), un componente de la membrana externa, tiene el papel central en el desarrollo de los efectos tóxicos. A través de los años y al conocer su estructura química, se logró saber que la toxicidad radica específicamente en el lípido A; cuya estructura y composición es muy similar entre miembros de la familia *Enterobacteriaceae*.

Este trabajo se enfocó a la obtención de anticuerpos monoclonales específicos contra el lípido A, para poder ser utilizados en el desarrollo de metodologías capaces de detectar al antígeno en forma soluble.

Como inmunógeno se utilizó una mezcla proteína-LPS (proteínas de membrana externa de *Salmonella typhi* con aproximadamente 0.4 % de LPS) en tres inmunizaciones; en ratones BALB/c.

Las células de bazo se fusionaron con células de mieloma (Ag8) de ratón. Se obtuvieron varios hibridomas productores de anticuerpos contra: La porina Omp C de *Salmonella typhi*, LPS de *Salmonella typhi* y LPS Re de *Salmonella minnesota*.

Los hibridomas específicos para LPS Re se seleccionaron en un sistema inmunoenzimático en fase sólida (ELISA).

De la clonación de híbridos específicos anti-LPS Re, se caracterizó un hibridoma productor de anticuerpo monoclonal anti-lípido A; resultando tener una mezcla de dos clonas, ya que en la determinación del isotipo se obtuvo IgG1 e IgM. Estas células fueron inoculadas a ratones BALB/c y, posteriormente se realizó la purificación por cromatografía de afinidad. Los anticuerpos monoclonales así obtenidos, se unieron químicamente a la molécula de biotina, por el método de formación de hidrazonas. Y aunque fueron utilizados en un sistema de doble anticuerpo, no se observa un efecto de dilución.

Dado lo anterior, los anticuerpos monoclonales deben ser evaluados, posteriormente, para su empleo en el diagnóstico de enfermedades causadas por bacterias Gram negativas.

II. MARCO TEORICO

1. GENERACION DE ANTICUERPOS

Una función básica del sistema inmune es el reconocimiento de sustancias que no se encuentran normalmente en el organismo. Las sustancias extrañas o antígenos, son reconocidos en sus determinantes antigénicos o epitopos por los anticuerpos secretados por células plasmáticas. Los anticuerpos secretados por cada línea de células plasmáticas son genéticamente idénticos; mientras que los anticuerpos secretados por varias líneas, no lo son; a pesar de que puedan reconocer el mismo antígeno ¹.

1.1 ESTRUCTURA DE LAS INMUNOGLOBULINAS

Desde los estudios de G. Edelman y R. Porter, se demostró que los anticuerpos estaban formados por 2 clases de cadenas polipeptídicas: las dos cadenas pesadas (H) idénticas, glicosiladas y con peso molecular en el rango de 50 a 70 KD, y dos cadenas ligeras (L) simétricas, no glicosiladas de peso molecular de 25 KD; cada cadena esta plegada por enlaces disulfuros en regiones globulares llamadas dominios. A su vez las cadenas H están unidas entre sí por enlaces disulfuro y cada una de las cadenas L se une a una cadena H también por enlaces disulfuro (figura 1). La estructura mínima que conduce a la aparición de un lugar de reconocimiento del antígeno, estructura característica de cada anticuerpo o receptor membranal, procede de la asociación de una cadena pesada y una cadena ligera ¹.

Las moléculas de anticuerpo son heterogéneas debido a que presentan gran diversidad en cuanto a su relación entre el enlace con su antígeno, y sus diferentes actividades biológicas.

De acuerdo a sus actividades biológicas, existen 5 clases de inmunoglobulinas: IgG, IgA, IgM, IgD e IgE, y cada clase se encuentra definida por la cadena pesada α , μ , δ , ϵ , respectivamente ².

1.2 DIVERSIDAD DE LOS ANTICUERPOS

Los anticuerpos a pesar de parecer casi idénticos, tienen la capacidad de distinguir a un antígeno con mucha precisión, de entre una variedad casi infinita. Esta diversidad existente entre los anticuerpos, se debe a varios mecanismos que llevan a cabo las células de los mamíferos. Estos son: 1) Múltiples genes V en la línea germinal. 2) Recombinaciones entre los genes V-J y V-D-J. 3) Mutación somática. 4) Recombinaciones inexactas y, 5) Diversos tipos de cadenas pesadas y ligeras.

Con base en esto, se ha calculado que un individuo es capaz de producir 10^9 moléculas de anticuerpos diferentes. Cada una de ellas producida por una clona de linfocito B. Es decir, presentan la misma especificidad, isotipo e idiotipo ^{1,3}.

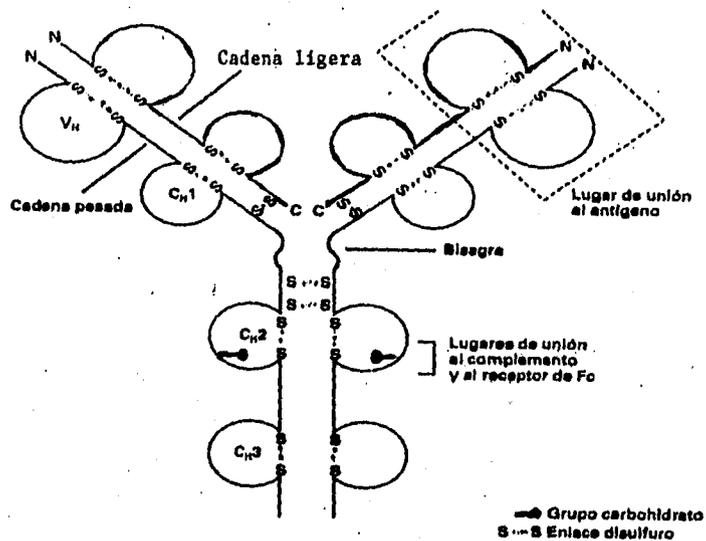


Figura 1. Representación esquemática de la unidad de las inmunoglobulinas ¹.

1.3 OBTENCION DE ANTICUERPOS MONOCLONALES

Los avances en el conocimiento de la estructura de los anticuerpos, se consiguió tras el análisis de las inmunoglobulinas monoclonales de pacientes con mieloma. El inconveniente de ellas, es que se desconoce su especificidad; ésto se subsana con la producción de mielomas híbridos ².

Desde 1975, con el trabajo de Köhler y Milstein, se obtuvieron anticuerpos monoclonales de la especificidad deseada. Al fusionar células esplénicas de animales inmunizados, con células de mieloma. Con esto, se han obtenido líneas celulares capaces de secretar anticuerpos homogéneos ⁴.

Lo anterior no sólo permite tener una fuente estable de anticuerpo mono específico *in vitro*, sino que, se obtienen apreciables cantidades del mismo, si se inyecta en la cavidad peritoneal de ratones ^{5,6,7}.

1.3.1 CELULAS DE MIELOMA

Existen tres líneas principales de mielomas murinos, utilizados para fusión celular, estas son: *

- P3x63Ag8.653 su nombre abreviado es Ag8, y su sinónimo es X63Ag8.653. Tiene también una variante conocida como P3x63Ag8UI.
- SP2/0-Ag14, cuyo nombre abreviado es SP2/0.
- P3-NS1-Ag4-1, comunmente llamada NS-1

Las líneas Ag8 y SP2/0 no sintetizan cadenas de inmunoglobulinas, mientras que la línea NS-1, sintetiza cadenas kappa pero no las secreta. Para hacerlo, necesita ser fusionada con una célula que secreta cadenas pesadas.

Por lo tanto, las características que deben tener las células de mieloma para su uso en la fusión son las siguientes ^{8,6,7}:

1) Ser deficientes en la enzima TK, por crecimiento en bromodeoxiuridina; TK es una enzima que fosforila nucleótidos de timidina, sustrato necesario para la síntesis de nucleótidos.

2) O bien, ser deficientes en la enzima HGPRT. El aislamiento de células HGPRT es muy sencillo, ya que la enzima es codificada por un solo cromosoma X activo presente en cada célula, de modo que sólo se requiere una mutación para que se pierda la capacidad de producir la enzima. La selección posterior de las células mielómicas se lleva a cabo en un medio de cultivo en presencia de una base análoga sumamente tóxica: 8-azoguanidina o bien 6-tioguanina, la cual es incorporada al DNA de la célula vía HGPRT, este compuesto se adiciona a la célula en concentraciones que varían de 1 a 100 µg/ml por un período de 6 a 8 semanas.

3) Presentar sensibilidad a aminopterina o azarina, contenidas en el medio de cultivo HAT o HAZ.

1.3.2 FUSION CELULAR

Para la obtención de anticuerpos monoclonales se empleaban algunos agentes que promovían la immortalización del linfocito B, como el virus Sendai y el virus Epstein Barr ⁸. Y aunque el procedimiento era tedioso, se utilizaron hasta el descubrimiento del polietilenglicol; un agente que promueve la fusión de las membranas celulares. Esta técnica es más sencilla y altamente efectiva, aunque no se conoce claramente su mecanismo de acción ⁷.

Desde hace algunos años se han desarrollado técnicas más sofisticadas que permiten la obtención de anticuerpos monoclonales, como lo son: Electrofusión y Transformación de DNA ⁹.

Con el polietilenglicol se promueve la fusión de la membrana celular, dando origen a células multinucleadas (Heterocariontes). Cuando las células recién fusionadas realizan la primera división, dan lugar a células híbridas que contienen igual carga genética que las células fusionadas.

Los híbridos son poco estables genéticamente, lo que en muchos casos origina segregación del material cromosómico. La segregación no es azarosa y depende de las características de las células ⁶.

Los híbridos de dos líneas celulares mielólicas, productoras de cadenas de inmunoglobulinas, no obedecen las reglas de isotipo, alotipo y exclusión alotípica. En éstos se da una expresión codominante de las cadenas ligeras y pesadas lo que da lugar a la formación de inmunoglobulinas híbridas asociadas al azar ⁶.

1.3.3 SELECCION DE HIBRIDOMAS

La selección de los híbridos ^{1,8,7}, se realiza enseguida o poco después de la fusión aprovechando el defecto en la enzima HGPRT de las células Ag8. El proceso de selección (figura 2) se basa, en que la vía principal para guanósina está bloqueada por un antagonista de la enzima folato reductasa (aminopterina). Es por ello que los híbridos siguen la vía de salvamento; ya que los nucleótidos hipoxantina y guanina son convertidos a guanósina monofosfato por acción de la enzima HGPRT, cuyo gene fue proporcionado a los hibridomas durante la fusión.

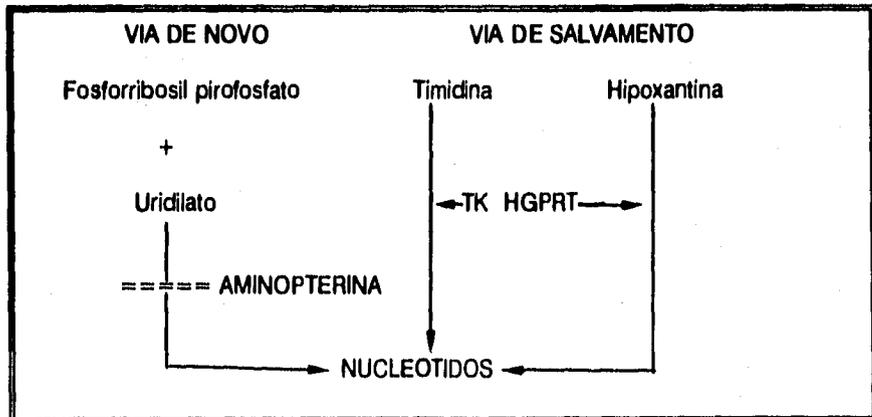


Figura 2. Vías utilizadas por las células de mamíferos para la síntesis de nucleótidos ¹.

Las células HGPRT⁻ son incapaces de sobrevivir en medio HAT, dado que se bloquea la vía principal de síntesis de purinas y pirimidinas.

La capacidad de las células HGPRT⁻ en medio HAT sólo está dada por la fusión de éstas con las células de bazo que son HGPRT⁺ que aportan la información genética para la expresión de la enzima HGPRT funcional.

Después de la fusión, las células viables que son obtenidas se pueden dividir en 4 grupos:

- Células de mieloma-mieloma.
- Células de bazo-bazo.
- Células de mieloma-bazo de diversas especificidades.
- Células de mieloma-bazo de la especificidad deseada.

Todas las células esplénicas que no se fusionaron mueren durante la primera semana de cultivo, a excepción de los macrófagos y fibroblastos. Sin embargo, estos últimos se dividen lentamente y pueden actuar como células alimentadoras, ya que proporcionan diversos factores de crecimiento⁹.

2. APLICACIONES DE LOS ANTICUERPOS MONOCLONALES

La producción de anticuerpos monoclonales ha revolucionado el diagnóstico, no sólo en el laboratorio clínico sino también en otras áreas como: Histología, Anatomía patológica y diagnóstico radiológico del cáncer. Mientras que *in vitro* se han utilizado en áreas como la Inmunología, Inmunohematología, Química Clínica, Hematología y Microbiología^{2,4,10,11,12}.

Algunas de sus aplicaciones se encuentran resumidas en la tabla 1.

Tabla 1. Aplicaciones de los anticuerpos monoclonales ¹⁰.

ANTICUERPOS MONOCLONALES EN:
ONCOLOGIA - Diagnóstico patológico de leucemias, linfomas. (Identificación de marcadores fenotípicos de una población celular)
ENFERMEDADES INFECCIOSAS (Imunodiagnóstico) - Infecciones respiratorias por virus o bacterias - Gastroenteritis - Hepatitis - Meningitis - Encefalitis - Enfermedades sexualmente transmisibles
ENFERMEDADES INFECCIOSAS (Profilaxis y terapia) - Infecciones bacterianas, virales y por clamidias
TRANSPLANTES (Inmunohistología) - Antígenos del Complejo Principal de Histocompatibilidad - Moléculas de adhesión - Citocinas

3. METODOS DE PURIFICACION DE ANTICUERPOS

Dado que los anticuerpos monoclonales no se obtienen con un 100 % de pureza, es necesario separarlos de proteínas extrañas, aportadas del líquido de ascitis o del Suero Fetal Bovino (Reactivo para complementar el medio de cultivo). Así, dependiendo de la fuente del anticuerpo, se podrá determinar el método que puede ser utilizado.

En la figura 3 se muestran las técnicas más importantes de purificación de anticuerpos monoclonales ⁸.

Uno de los métodos más utilizados, para purificar anticuerpo de isotipo IgG, es la cromatografía de afinidad con proteína A o G.

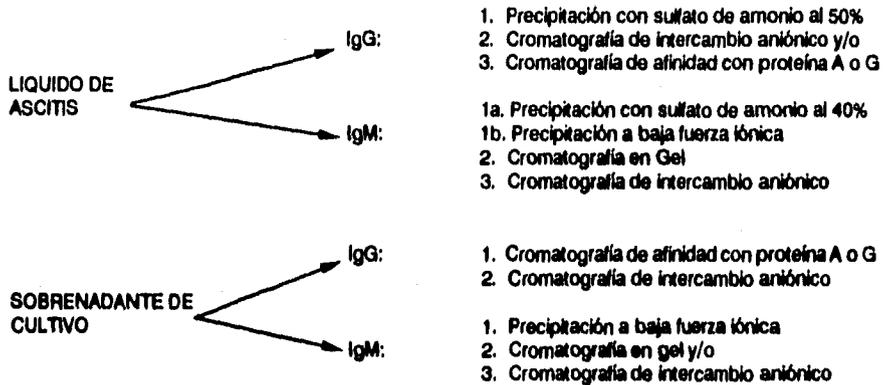


Figura 3. Procedimientos de purificación más importantes para anticuerpos monoclonales ⁸.

3.1 PROTEINA G

Durante la purificación de las estructuras de la pared de *Staphylococcus aureus*, se descubrió que una fracción contenía una proteína que podía unirse a inmunoglobulinas de humanos y de conejos; y se le llamó proteína A. En la búsqueda de otras proteínas iguales, se encontró similitud en estreptococos de las cepas A, C, y G. El más estudiado de todos ellos, es el polipéptido G o proteína G ¹².

La proteína G tiene un peso molecular de 35-40 KD, se obtiene por el aislamiento de la pared celular de estreptococos β -hemolíticos de las cepas C o G. Tiene dos sitios de unión para la inmunoglobulina, y una estabilidad de pH de 2 a 10. Parecida a la proteína A, es capaz de unirse a las inmunoglobulinas mediante la región Fc. No se une a fragmentos que carezcan de éste, ni a la fracción F(ab')₂ ¹⁴.

Se une con gran afinidad a todas las inmunoglobulinas del ratón (IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3, IgA, IgM), y a todas las subclases de IgG de humanos, excepto IgA e IgM.

Por la gran afinidad que presenta, especialmente para los isotipos de IgG de ratón, se le ha utilizado ampliamente como un sistema de purificación de anticuerpos. Ya sea provenientes de líquido de ascitis, suero o sobrenadante de cultivo. La forma más sencilla de emplear esta proteína es por medio de columnas de perlas de sepharosa a las que previamente se les unió proteína G ⁸.

Aunque no es tan conocida como la proteína A, (ya que se aisló en 1984), se sabe que posee dos dominios de unión a la región Fc de la inmunoglobulina, y se conoce también que puede utilizarse el mismo protocolo de purificación que se emplea en la proteína A. Es decir, cuando la proteína A es desnaturalizada con agentes como urea 4 M, tiocianato 4 M, o pH 2.5, puede ser renaturalizada sin afectarse su poder de unión; con ésto, se libera la Inmunoglobulina unida que es útil para posteriores ensayos ¹⁴.

4. SISTEMA ESTREPTOVIDINA-BIOTINA

Uno de los mejores sistemas de amplificación estudiados, es el que se encuentra formado por el complejo estreptoavidina-biotina; complejo que puede ser detectado en ELISA, por la unión a enzimas como la peroxidasa de rábano.

La estreptoavidina es una proteína aislada de *Streptomyces avidinii*, con un peso molecular de 60 KD; de forma tetramérica. Cada subunidad puede enlazar una molécula de biotina ¹⁵.

La biotina es una vitamina de 244 daltons, encontrada en tejidos y en sangre, presenta gran afinidad para la estreptoavidina, puede unirse mediante grupos hidracida, a varias proteínas sin alterar su actividad biológica ¹⁶.

Una proteína puede reaccionar con varias moléculas de biotina, y a su vez, la molécula de biotina es capaz de unirse a una subunidad de la estreptoavidina, uniones que incrementan marcadamente la sensibilidad del ensayo.

La interacción no covalente dada en este sistema es de $10^{15} M^{-1}$, este dato nos indica, que una vez formada la unión, no puede ser alterada ni por pH extremos, solventes orgánicos, ni otros agentes desnaturalizantes ¹⁷.

Por otra parte, se han reportado uniones no específicas a membranas biológicas, estudios recientes indican que esto se debe a una secuencia tripéptida presente en la molécula de estreptoavidina, que actúa como una secuencia universal de reconocimiento. Este dominio contiene la secuencia Arg-Tyr-Asp (RYD) y es la responsable de la unión no específica de la estreptoavidina a algunas superficies celulares. Este dominio es, aparentemente, similar a la secuencia de reconocimiento universal Arg-Gly-Asp (RGD), para fibrinógeno, vitronectina, fibronectina y factor de Von Willebrand ¹⁸.

La molécula de biotina, unida al grupo químico hidracida, puede unirse a anticuerpos monoclonales mediante la oxidación de sus carbohidratos con metaperiodato de sodio. Reacción que los transforma a grupos aldehído, listos para reaccionar con la hidracida y formar hidrazonas. De ésta manera, la biotina se une a los anticuerpos y a su vez queda lista para unirse a la estreptoavidina.

La reacción que se lleva a cabo es la siguiente:



Lo interesante en esta unión, es que el anticuerpo no pierde sus propiedades inmunológicas, ya que la reacción se lleva a cabo en los carbohidratos de la región Fc, y de esta manera, la región Fab queda libre para unirse a su antígeno ⁸.

5. ENSAYOS INMUNOENZIMATICOS EN FASE SOLIDA

Estas técnicas se basan en que la combinación no covalente del anticuerpo con su antígeno, es similar a la que ocurre en las uniones enzima-sustrato ¹⁷.

Son inmunoensayos que permite determinar la concentración de un antígeno o un anticuerpo mediante el uso de uno de ellos en fase sólida y el otro en solución, detectándose la formación del complejo antígeno-anticuerpo mediante un trazador enzimático ⁸. Esta reacción debe hacerse en un medio de fuerza iónica, pH, tensión superficial y concentración proteica apropiadas para que todas las moléculas de anticuerpo se unan al antígeno en fase sólida, y el mínimo posible de estas moléculas u otras se unan inespecíficamente al soporte sólido al que esta unido el antígeno ¹¹.

La utilización de las reacciones enzima-sustrato ofrece la ventaja inherente de que las enzimas son magnificadores biológicos. De este modo un pequeño número de moléculas de enzima puede convertir un gran número de moléculas de sustrato a un producto medible.

Un protocolo práctico de ELISA es el inmunoanálisis directo donde el antígeno unido al soporte, es detectado por un anticuerpo conjugado a una enzima.

En el Inmunoanálisis indirecto la reacción se completa mediante la adición de anti-inmunoglobulina, conjugada a una enzima, dirigida contra la especie del anticuerpo utilizado para fijar al antígeno.

Cuando lo que se requiere es cuantificar o detectar antígeno, el inmunoanálisis ampliamente utilizado es el doble anticuerpo. En este ensayo, se requieren dos anticuerpos (uno de tipo monoclonal) que sean capaces de reconocer al antígeno, pero que también reconozcan diferentes epitopos del mismo ^{18,19}.

6. ENDOTOXINA

En el año de 1892 durante el transcurso de investigaciones sobre la toxina del cólera, Pfeiffer observó que *Vibrio cholerae* además de excretar una toxina al medio de cultivo (a la cual le llamó exotoxina), existía otra que se encontraba fuertemente unida a la bacteria y que salía al exterior sólo cuando la bacteria era destruida, por lo que la llamó endotoxina. Con el descubrimiento de la tinción de Gram, descrito por Hans Christian Joachim Gram, permitió indicar que la endotoxina de Pfeiffer era producida sólo por las bacterias que no tomaban el color (bacterias Gram negativas). Mucho tiempo ha pasado desde que se hizo esta diferencia y en el transcurso del mismo se han ido conociendo poco a poco las características fisicoquímicas, bioquímicas y biológicas de esta molécula. Actualmente se conoce su localización en la bacteria, (figura 4), su estructura química, su síntesis y los mediadores celulares que participan en la activación celular ^{7,12,20,21,22}.

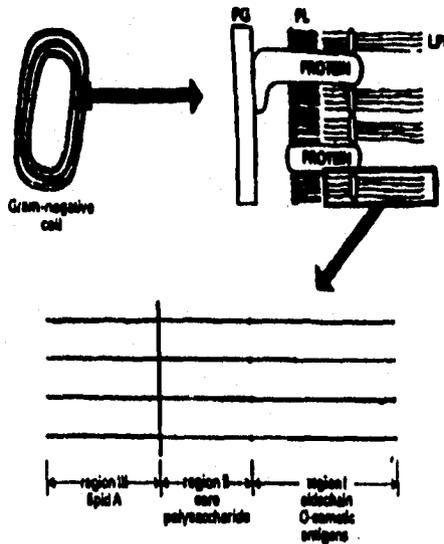


Figura 4. Localización del lipopolisacárido en las bacterias Gram negativas ⁷.
(PG: peptidoglicano, PL: fosfolípido)

6.1 ESTRUCTURA

Químicamente, las endotoxinas son LPS. Son macromoléculas que presentan 3 fracciones: El antígeno O, el núcleo y el lípido A. Siendo este último el encargado de desarrollar todos los efectos tóxicos atribuibles al LPS⁷.

Mientras que el antígeno O presenta gran diversidad entre los diferentes serotipo; el núcleo es un poco más conservado, de hecho, sólo se conoce una estructura nuclear, para los serotipos de *Salmonella*; y 6 para más de 100 serotipos de *Escherichia coli*²¹. En cambio, es el lípido A la parte más conservada de la molécula de LPS; teniendo su estructura y composición, gran similitud entre miembros de la familia *Enterobacteriaceae*.

El conocimiento de su estructura, así como de su síntesis, se debió en gran parte a la presencia de cepas bacterianas que por algún defecto genético no sintetizan por completo la endotoxina, variando este defecto, desde las formas llamadas S-R (lisas-rugosas), hasta toda la gama de rugosas, las cuales carecen por completo de la porción polisacáridica y el núcleo presenta diferente número de monosacáridos^{7,22}.

Las cepas mutantes se han caracterizado como Ra, Rb, Rc, Rd y Re, dependiendo del número de monosacáridos presentes en el núcleo (figura 5).

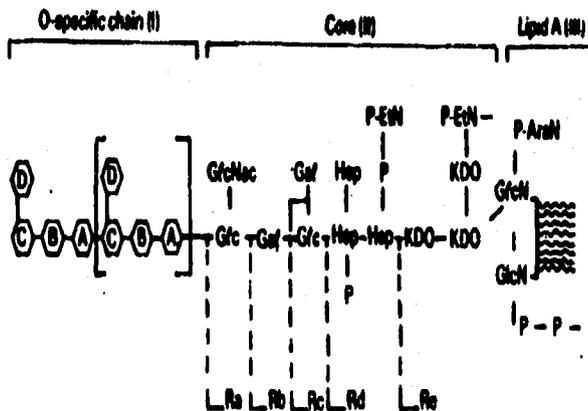


Figura 5. Diferentes LPS de cepas mutantes de *Salmonella*, mostrando los diversos grados de expresión molecular⁷.

(A-D: Monosacáridos de repetición, Glc: D-glucosa, Gal: D-galactosa, P: fosfato, GlcN: D-glucosamina, Hep: L-glicerol-D-mano-heptosa, EtN: etanolamina, AraN: 4-amino-L-arabina, KDO: ácido 2-keto-3-deoxi-D-manooctanato)

Una de las bacterias rugosas que más se han estudiado es *Salmonella minnesota*, la variedad mejor conocida es la Re 595, se sabe que su molécula de LPS está constituida por tres moléculas de KDO y una de lípido A.

En el género *Salmonella* ⁷, el núcleo se presenta como un oligosacárido que contiene: D-glucosa, D-galactosa, N-acetil-D-glucosamina, L-glicero-D-mano-heptosa y KDO, mientras que el lípido A se presenta como un disacárido bifosforilado de D-glucosamina unidos por un enlace β -1,6 este disacárido es capaz de unir, mediante enlaces ester o amido, diversos ácidos grasos como ácido laúrico, ácido mirístico y ácido palmítico (figura 6)

Otros constituyentes del lípido A son fosforiletanolamina y 4-amino-4-deoxi-L-arabinosa.

A pesar que la molécula de LPS es característica de todas las enterobacterias, no es exclusiva de ellas, ya que también se han reportado LPS en bacterias fotosintéticas y en Cianobacterias, e incluso en algunas especies de *Bordetella* ^{24,25}.

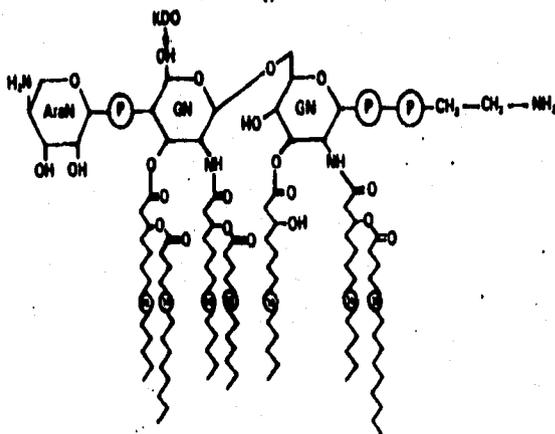


Figura 6. Estructura molecular del lípido A de *Salmonella* ⁷.
(GN: Glucosamina, Ara N: arabinosa, P: fosfato)

6.2 PROPIEDADES BIOLÓGICAS

La actividad endotóxica se divide en: Reacción a nivel corporal y reacción a nivel bioquímico, representado por la gelificación del amebocito de *Limulus*.

6.2.1 RESPUESTA CELULAR

Las endotoxinas presentan un amplio espectro de actividades biológicas, que pueden demostrarse tanto *in vitro* como *in vivo*. De todas éstas, la pirogenicidad, leucopenia, leucocitosis, y la inducción de la reacción de Shwartzman, son ejemplos clásicos de actividad endotóxica ²⁶.

En la tabla 2 se resumen las actividades biológicas.

Tabla 2: Actividades biológicas de la endotoxina ⁷.

<ul style="list-style-type: none">• Pirogenicidad• Toxicidad en ratón• Hipotermia en ratón• Leucopenia• Leucocitosis• Reacción de Shwartzman• Activación de complemento• Agregación plaquetaria• Activación del factor de Hageman• Inducción del factor de plasminogéno• Gelificación de <i>Limulus</i>• Toxicidad incrementada por D-galactosamina	<ul style="list-style-type: none">• Actividad adyuvante• Mitógeno• Actividad necrótica tumoral• Activación de macrófagos • Inducción de:<ul style="list-style-type: none">- Síntesis de IgG en recién nacido- Síntesis de proatangiandinas- Producción de interferon • Inhibición de fosfoenolpiruvato carboxilcinasa
--	--

Aunque la mayoría de los efectos biológicos causados por la endotoxina, son tóxicos; también presenta un espectro de actividades benéficas, por que induce resistencia no específica a diferentes agentes infecciosos, así como a sus propios efectos ²⁶. Presenta también, actividad mitogénica, estimulando la síntesis y secreción de anticuerpos en linfocitos B murinos ²⁷.

Estos efectos benéficos, pueden ser obtenidos por la estructura incompleta de la molécula de lípido A, ya sea lograda por degradación o por síntesis química ^{28,29}.

6.2.2 RESPUESTA A NIVEL BIOQUIMICO

En diversos estudios, una manera de cuantificar la cantidad de endotoxina presente, es por medio de la reacción de gelificación del amebocito de *Limulus*³⁰, la cual, a través de una cascada de eventos, culmina en la transformación del coagulígeno (soluble) a coagulina (insoluble). Un mecanismo parecido a la cascada de coagulación en los mamíferos; sólo que en éste organismo, se utiliza como un método de defensa contra organismos patógenos.

La reacción es específica para la endotoxina, es reproducible, sensible y ampliamente utilizada como un método cuantitativo para la medición de la misma, ya que puede detectar niveles de la endotoxina desde unos cuantos picogramos.

Aunque también se ha observado que el mecanismo por el cual se lleva a cabo la gelificación se desencadena por β 1-3-D-glucano, un constituyente de la pared celular de hongos y levaduras³⁰.

La respuesta al LPS, a nivel de la circulación sanguínea, puede ser fatal, siendo la respuesta más exagerada, la que lleva al choque endotóxico³¹.

6.3 CHOQUE ENDOTOXICO

En los humanos la respuesta aguda inflamatoria al LPS (específicamente el lípido A) culmina en la liberación de citocinas y otros mediadores celulares como el TNF α , Interleucina 1, Interleucina 6, leucotrienos y tromboxano A2 por los monocitos y macrófagos³².

En niveles extremos, estas citocinas y mediadores llevan a cabo algunos eventos fisiopatológicos que incluyen fiebre, coagulación intravascular diseminada, hipotensión y falla en múltiples órganos, síndrome conocido como choque endotóxico^{33,34}.

Aunque las bacterias Gram positivas carecen de LPS, están involucradas en la inducción de choque séptico, ya que se han observado disfunciones metabólicas y cardiovasculares muy similares a las que se presentan en las infecciones causadas por bacterias Gram negativas³³.

6.3.1 MECANISMO DE ACCION

Algunos efectos de las endotoxinas en los animales, son secundarios a la sobreproducción de citocinas como el TNF α e Interleucina 1. Su extrema potencia, la existencia de cepas murinas insensibles a sus efectos³⁴ y la identificación de un antagonista de la bioactividad, sugieren la presencia de un receptor o receptores para ella³¹.

6.3.1.1 PROTEINA UNIDORA DE LPS

Se ha reconocido desde hace más de dos décadas que las proteínas del suero se unen al LPS y modifican sus propiedades físicas, químicas y biológicas, por ello se piensa que las lipoproteínas se unen a éste, sin embargo es también conocido que la adición de pequeñas cantidades de suero incrementa marcadamente la unión al LPS y la activación de las células. Un conocimiento más completo de estos efectos, aparentemente opuestos, emerge después del descubrimiento de la LBP.

La LBP es una glicoproteína de 60 KD, aislada del suero de humanos y de conejos. Se sintetiza en el hígado y, es una proteína de fase aguda en el hombre y en animales de experimentación. Normalmente se encuentra presente en concentraciones menores de 0.5 $\mu\text{g/ml}$, pero en personas con choque, la concentración se eleva a más de 50 $\mu\text{g/ml}$ ³¹.

La unión específica de la LBP al LPS es a través del lípido A; sirve como una opsonina por la unión estable a bacterias Gram negativas o a eritrocitos cubiertos con LPS. Su actividad opsonizante sugiere que puede funcionar de manera parecida, a las clásicas opsoninas (IgG, C3) en la lisis bacteriana, pero la demostración *in vivo* no se ha reportado ³¹.

La LBP es importante para movilizar la respuesta del huésped para combatir la infección causada por organismos Gram negativos ^{31,32}.

6.3.1.2 CD14, RECEPTOR PARA EL COMPLEJO LPS-LBP

Es necesario el reconocimiento del LPS en la superficie de la célula, para que se inicie la señalización transmembranal que culminará en activación celular. Sin embargo, hasta hoy en día, sólo una proteína, de estructura totalmente definida, llamada CD14, es capaz de unir LPS y a la vez, ser un receptor para éste y mediar la activación ³³.

CD14 es una glicoproteína de 50-55 KD, originalmente descrita como un antígeno de diferenciación de monocitos y macrófagos. Que se puede presentar de dos formas: Una forma anclada a la membrana (mCD14), por medio de glicosilfosfatidil inositol; o en forma soluble (sCD14). El gene para CD14 está localizado en la región del cromosoma 5, es conocido porque codifica para diversos factores de crecimiento, específicos para la línea mieloide (IL-3, GM-CSF, CSF-1), o para el receptor SCF-1 ²².

CD14 con su ligando puede iniciar la respuesta para la síntesis de $\text{TNF}\alpha$; pero se desconoce el mecanismo por el cual CD14 y LBP actúan; ya que no es el mecanismo por el que las células eucarióticas responden a otros agonistas, tales como hormonas o linfoquinas ³³.

A pesar que mCD14 es importante, aparentemente no juega un papel trascendental en la señal de transducción, pero puede ser la principal unidora de ligando.

Existe una hipótesis²² que indica que la unión del LPS a mCD14 está seguida por interacciones con componentes adicionales de la membrana que incrementan la señal transmembranal (figura 7).

Se sabe que a través de CD14 se inicia una serie de eventos que culminan en la activación celular; es un receptor crítico en la respuesta del LPS tanto *in vitro* como *in vivo*, pero recientemente se ha demostrado que el rsCD14 (CD14 soluble recombinante) previene la mortalidad en ratones tratados con la endotoxina²³.

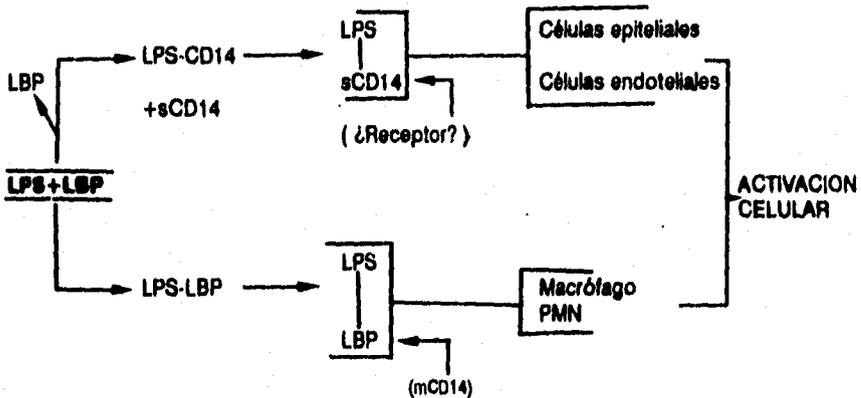


Figura 7. Papel central de LBP y CD14 en la estimulación celular dependiente de lipopolisacárido²².

6.3.1.3 CERAMIDA

La vía de la esfingomielina es un sistema de señalización que se encuentra en todas las células. Esta vía se inicia por hidrólisis del fosfolípido de la esfingomielina (N-acilesfingosina-1-fosfolcolina) que es concentrada, preferentemente, en la membrana plasmática de las células de los mamíferos. La hidrólisis ocurre por la acción de la fosfolipasa C, una esfingomielinasa que genera ceramida.

Por su parte la ceramida inicia una serie de eventos intracelulares, actuando como un segundo mensajero, es decir, juega un papel análogo a 1-2 diacilglicerol o al AMP

cíclico en los sistemas de adenilcinasa y fosfoinositol.

Se requiere la configuración D-eritro, de la ceramida, para dar la señal, lo que indica estereoespecificidad.

Los análisis moleculares y estructurales de la ceramida, y una región del lípido A; revelaron una gran similitud entre ellas, por lo que se afirma que el LPS estimula a las células por simular la función de la ceramida ²² (figura 8).

6.4 SUSCEPTIBILIDAD Y TOLERANCIA A LA ENDOTOXINA

La sensibilidad esta genéticamente determinada, es por ello que diferentes animales muestran gran variación en la susceptibilidad.

Los conejos, los perros y los cerdos presentan una marcada sensibilidad a la endotoxina; mientras que los ratones, las ratas y los cuyos la presentan en menor proporción ⁷. De todos los mamíferos, el hombre es la especie más sensible, en cantidades de 0.03 µg (por 70 kg de peso, administrada intravenosamente), es suficiente para causar una marcada leucopenia 1 hora después de su administración, y leucocitosis a las 3 horas ²¹.

En los humanos, una dosis inicial (pirogénica) induce tolerancia a subsecuentes dosis administradas en intervalos cortos de tiempo (menos de 10 días) ⁷.

En contraste, la sensibilidad normal puede ser incrementada por:

- 1) Tratamiento con bacterias Gram negativas o Gram positivas, ya sea, vivas o muertas. Ejemplos de éstas son: *BCG*, *Coxiella burnetti*, *Salmonella typhimurium*.
- 2) Agentes hepatotóxicos, como la D-galactosamina, y la α -amanitina; y por agentes químicos, como la actinomicina-D ²².
- 3) También el crecimiento tumoral o la deleción de la cortisona (en el ratón) por adrenalectomía ⁷.

6.5 ANALOGOS DEL LIPIDO A

Los cambios en la estructura del lípido A, pueden alterar de gran manera su toxicidad; así, los precursores y análogos, sintetizados en el laboratorio presentan antagonismo competitivo frente a la endotoxina.

Los inhibidores del LPS, mejor caracterizados son:

- Lípido 406 (lípido IVa, lípido Ia, IA-14-PP).
- LPS diacilado por la proteína granular de los neutrófilos, la aciloxiacilhidrolasa.

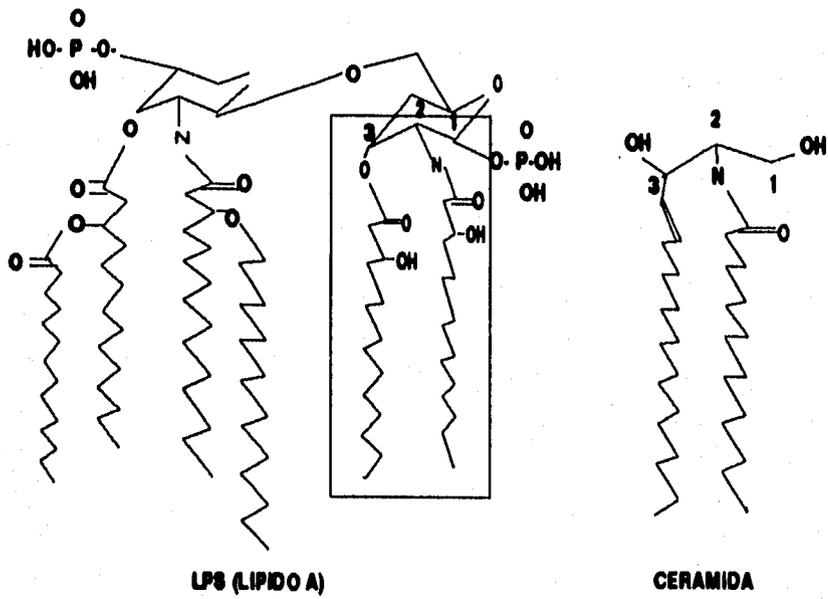


Figura 8. Comparación estructural de la ceramida y el lipopolisacárido ²¹.

- Lípido A de *Rhodopseudomonas sphaeroides*.
- LPS de *Rhodobacter capsulatus* (E5531).

Todas estas moléculas tienen la misma estructura de un disacárido de glucosamina, pero son diferentes en el número y/o longitud de las cadenas aciladas. Además, los efectos inhibitorios que presentan, son específicos para el lípido A, LPS o bacterias Gram negativas ^{29,30,31}.

7. FIEBRE TIFOIDEA

Salmonella typhi es un bacilo no esporulado perteneciente a la familia *Enterobacteriaceae*, tribu *Salmonellae* y especie *typhi*, Gram negativo, móvil, mide de 2 a 3 μm , es citofílico, anaerobio facultativo, intracelular, fermenta la glucosa con producción de ácido, es lactosa y sacarosa negativos. Tiene una estructura antigénica de superficie que incluye al antígeno H o flagelar y el antígeno somático O que contiene carbohidratos específicos útiles en su identificación serológica; de acuerdo a la clasificación de Kauffman-White, *Salmonella typhi* pertenece al grupo D y comparte con las diferentes especies de ese grupo los antígenos somáticos 9, 12; los flagelos contienen el antígeno d y en la superficie se encuentra el antígeno VI, el cual es de naturaleza sacarídica, forma parte de la membrana externa y es indicador de virulencia. La fórmula: 9, 12, VI, d denota a *Salmonella typhi* en forma abreviada ³⁰.

La fiebre tifoidea es el resultado de la invasión sistémica de *Salmonella typhi* al organismo, infección que es adquirida por vía oral. Una vez que entra, se multiplica rápidamente en el intestino delgado, penetra a la membrana basal intestinal sin causar daño importante en los tejidos; aquí es fagocitada por macrófagos y transportada a los ganglios linfáticos regionales, donde se multiplica activamente. Tiene una fase de bacteremia, ya que se distribuye en el sistema fagocítico mononuclear (donde se reproduce) y es liberada nuevamente al sistema circulatorio. Los portadores asintomáticos son los elementos más importantes en la cadena de transmisión de la enfermedad ³⁰.

La enfermedad se caracteriza por síntomas sistémicos como fiebre, malestar general, cefalea, dolor abdominal e hipotensión, puede presentarse con exantema, esplenomegalia, leucopenia y estimulación policlonal de linfocitos B; sus complicaciones más graves son hemorragia y perforación intestinal pudiendo causar peritonitis. Se sabe que gran parte de estas manifestaciones son provocadas por la liberación de endotoxinas ^{30,37}.

Aunque la fiebre tifoidea y otras enfermedades relacionadas, han sido controladas en países industrializados a través de medidas de salud pública, en países en vías de desarrollo sigue representando un grave problema de salud pública, siendo el grupo más

afectado el que se encuentra entre las edades de 15 a 44 años. Por otro lado, los individuos de mayor edad parecen poseer una relativa inmunidad, probablemente por el hecho de exposiciones frecuentes a dosis moderadas o subinfecciones del bacilo de la tifoidea ³⁷.

En México, la infección presenta características endemicoepidémicas ligadas al saneamiento ambiental y al almacenamiento de agua potable, así como al rápido incremento de su población y urbanización ³⁷.

El diagnóstico puede realizarse por:

1. Aislamiento de la bacteria en:
 - Sangre
 - Aspirado de médula ósea
 - Heces fecales o bilis duodenal.
2. Detección de anticuerpos contra antígenos de la bacteria en:
 - Prueba de Widal (aglutininas H y O)
 - Hemaglutinación de antígenos H, O y Vi
 - ELISA (utilizando LPS, flagelina o antígenos proteicos).
3. Detección de antígenos de la bacteria.
4. Detección de secuencias de DNA específicas de *Salmonella typhi*.

III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Es importante desarrollar sistemas de ensayo capaces de detectar antígenos microbianos en fluidos biológicos sin el requerimiento del cultivo.

Existen varios modos de detectar antígenos en líquidos orgánicos, sin embargo la especificidad y la reproducibilidad del inmunoanálisis han llevado a la amplia aplicación de estas técnicas para este propósito.

En la Unidad de Investigación Médica en Inmunoquímica, se ha propuesto desarrollar un sistema para detectar al lípido A, para obtener una herramienta auxiliar de diagnóstico en enfermedades causadas por bacterias Gram negativas, principalmente en los siguientes casos:

1) FIEBRE TIFOIDEA:

A) Conocer portadores asintomáticos de *Salmonella typhi*, esto podría llevarse a cabo en personas que manejan o preparan alimentos.

B) Mediante la detección de lípido A y la asociación de los síntomas clínicos de fiebre de tifoidea, podría establecerse de manera previa el diagnóstico y tratamiento inmediato.

2) SINDROME SEPTICO

En pacientes intrahospitalarios que han sido sometidos a cirugía, con complicaciones por infección, que culminan en sepsis; la detección temprana del lípido A en fase inicial ayudaría al pronóstico y la evolución del paciente, ya que confirmaría de una infección por bacterias Gram negativas, y se tomarían las medidas necesarias para un tratamiento adecuado.

IV. HIPOTESIS

Con el anticuerpo monoclonal y la metodología propuesta se estará en posibilidad de detectar el lípido A, mediante el ensayo de ELISA de doble anticuerpo; ya que la amplificación por el sistema estreptoavidina-biotina permite detectar el antígeno aún en bajas concentraciones.

V. OBJETIVOS

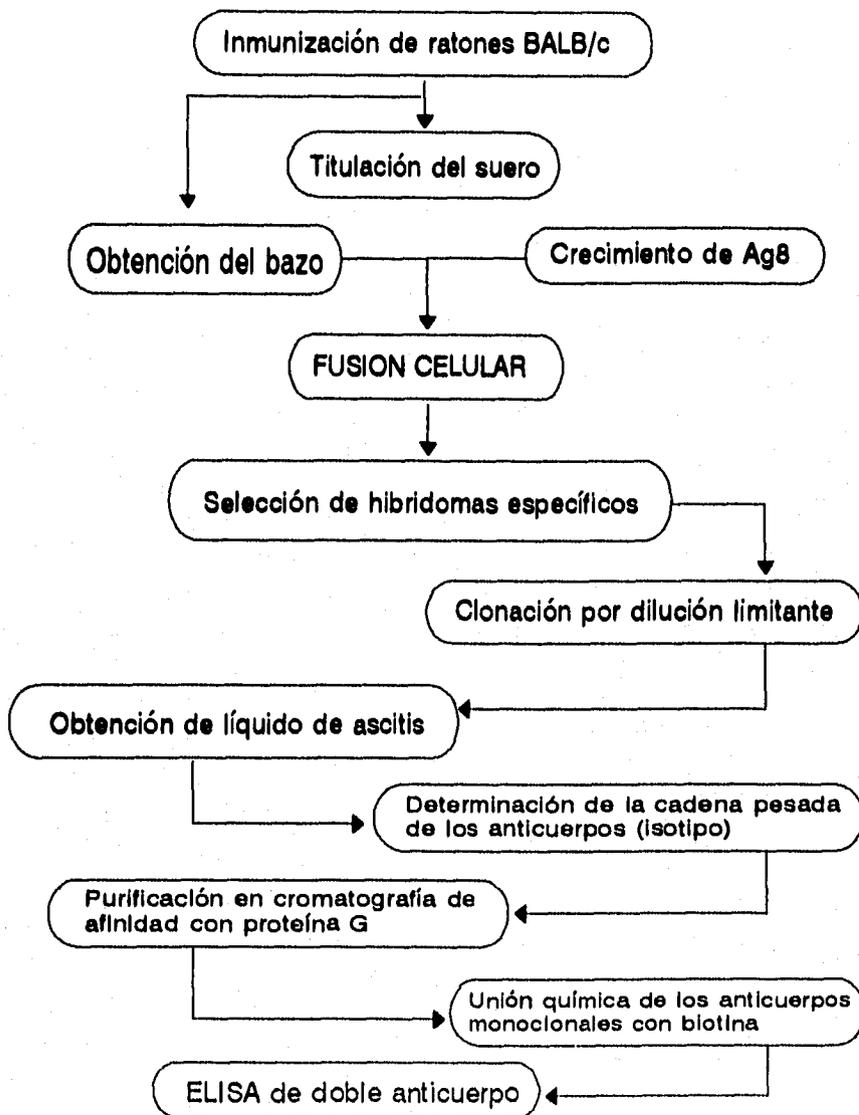
OBJETIVO GENERAL

Obtener anticuerpos monoclonales anti-lípido A para su uso en la detección del antígeno soluble.

OBJETIVOS PARTICULARES

- Obtener suero policlonal anti-lípido A, de ratones BALB/c.
- Obtener hibridomas productores de anticuerpos monoclonales con especificidad para los componentes de una mezcla de proteína-LPS.
- Identificar anticuerpos monoclonales que reconozcan al LPS Re de *Salmonella minnesota* (lípido A).
- Determinar el isotipo al que pertenezca el anticuerpo secretado por los hibridomas.
- Obtener grandes cantidades de el anticuerpo monoclonal, tanto *in vitro* como *in vivo*.
- Purificar el anticuerpo por cromatografía de afinidad con proteína G.
- Conjugar el anticuerpo monoclonal a biotina, y realizar su titulación.

VI MODELO EXPERIMENTAL



VII. MATERIALES Y METODOS

I. ESQUEMA DE INMUNIZACION

Se inmunizaron 8 ratones BALB/c hembras de 16-18 g, con una preparación protéica-LPS.

El esquema de inmunización fué el siguiente:

DIA	VIA	DOSIS (μ g/ratón)
0	Intraperitoneal	50 en AIF
23	Intraperitoneal	30 en PBS
31	Intraperitoneal	30 en PBS
35	RETROORBITAL	SANGRIA

AIF= Adyuvante incompleto de Freund.

2. TITULACION DEL SUERO DE LOS RATONES INMUNIZADOS CON PROTEINA LPS.

Para la obtención de una muestra de suero, los ratones se sangraron por vía retroorbital. De esta manera, la sangre se centrifugó a 1200 rpm por 5 minutos.

La valoración del anticuerpo presente anti-LPS, tanto de los sueros individuales como del pool realizado con los mismos. Se realizó mediante la técnica de ELISA, descrita a continuación:

Las placas de poliestireno de 96 pozos (NUNC), se recubrieron una hora a 37°C y durante toda la noche a 4°C, con 100 μ l/pozo de una solución de 20 μ g/ml de LPS de *Salmonella minnesota* Re 595 (SIGMA cat. L-9764,) en amortiguador de carbonatos (carbonato de sodio-bicarbonato 0.1 M pH 9.5), transcurrido dicho tiempo se lavó 4 veces con PBS-tween 0.1 % (tween 20) (SIGMA). Posteriormente, los pozos se incubaron durante 3 horas a 37°C con 200 μ l de una solución de bloqueo (PBS-gelatina 2 %), lavándose 4 veces con PBS-tween, al término del mismo, se agregaron 100 μ l de la muestra problema, y se incubaron por 2 horas a 37°C.

La placa se incubó 1 hora 30 minutos a 37°C con una dilución 1:1000 del anticuerpo anti-IgG de ratón conjugado a peroxidasa (GIBCO BRL cat. 97135A) después de 10 lavados con PBS-tween 1% se colocaron 100 μ l de sustrato (6 mg de O-fenil-diamina y 10 μ l de H₂O₂ al 30% en solución amortiguadora de citratos 0.1 M, pH 5.6) a los 10 minutos, la reacción se detuvo agregando 50 μ l de H₂SO₄ 2.5 N. Los pozos se leyeron a 490 nm en un lector de ELISA (Labsystems Multiskan Multisoft).

3. OBTENCION DE ANTICUERPOS MONOCLONALES

3.1 Crecimiento de células Ag8

Las células mielómicas Ag8, crecieron en el medio de cultivo RPMI 1640 (Hyclone cat. B-0305-BB); complementado con 10 % de suero fetal bovino (GIBCO BRL), 10^{-3} M beta-mercaptoetanol (MERCK), 2 mM glutamina (GIBCO BRL), 2 mM piruvato de sodio (GIBCO BRL), estreptomina (100 μ g/ml) y penicilina (100 UI/ml).

Las células se colocaron en botellas de cultivo estériles (Corning) de 25 cm² en una incubadora a 37°C, en atmósfera húmeda, y CO₂ al 5%. Días antes de la fusión, se expandieron a botellas de cultivo de 75 cm²

3.2 Obtención de macrófagos como células alimentadoras

El uso de los macrófagos tiene como finalidad, eliminar células muertas, y suministrar factores de crecimiento, para el desarrollo inicial de los hibridomas.

Los macrófagos se obtuvieron de 2 ratones BALB/c de 18-20 g, los cuales se sacrificaron antes en una cámara de éter.

Se les inyectó intraperitonealmente 5 ml de solución de Hanks fría (SIGMA), y se dió un masaje vigoroso por 5 minutos; se removió el líquido con una jeringa estéril.

El líquido así obtenido, se centrifugó 5 minutos a 1200 rpm; y el botón celular se resuspendió en 10 ml de medio de cultivo.

Tomando una muestra de esta solución, se contaron las células totales.

Los macrófagos se colocaron en placas estériles de 96 pozos (NUNC) a razón de 5×10^4 - 1×10^5 células/pozo, en una incubadora a 37°C con atmósfera húmeda y CO₂ al 5%

Cuando se necesitó, en vez de colocarlos en placa, se depositaron en botellas de cultivo.

3.3 Producción de hibridomas

Para la fusión celular, se empleó el protocolo modificado de el original de Köhler y Milstein; quienes obtuvieron por primera vez anticuerpos monoclonales. El cual se describe enseguida:

Un ratón se sacrificó por sangrado a blanco. Este ratón fué el que completó su esquema de inmunización, y obtuvo títulos de anticuerpo. Siendo necesario reestimularlo con el antígeno tres días antes de la fusión.

El bazo se extrajo en condiciones de esterilidad y fue colocado en una caja petri con tela de organza y 10 ml de RPMI sin SFB; éste se exprimió cuidadosamente con una jeringa y su émbolo. Todo el sobrenadante se absorbió, y se colocó en un tubo de 10 ml (NUNC), centrifugándose a 2000 rpm por 5 minutos.

Al paquete celular se le adicionó amortiguador de lisis (cloruro de amonio 0.83%) (MERCK), y después se incubó 2 minutos a 37°C, centrifugándolo a 1200 rpm durante 5 minutos.

El lavado se repitió 2 veces, y se contó el número total de células linfoides.

Las células Ag8 se centrifugaron a 1200 rpm por 5 minutos, y se resuspendieron en 10 ml de RPMI, para contar el número total de ellas.

De esta manera las células, Ag8 y linfoides, fueron colocadas en una proporción de 2:5 respectivamente. Y una vez hecha la relación, se centrifugaron a 1200 rpm por 5 minutos, decantándose el sobrenadante, y resuspendiendo el botón celular.

Enseguida se adicionó 0.8 ml de polietilenglicol (GIBCO BRL).

Se agregó gota a gota 1 ml de RPMI sin SFB (previo a 37°C); en los siguientes 5 minutos se adicionaron 20 ml de medio RPMI sin SFB, y se centrifugó por 3 minutos a 800 rpm.

A el paquete celular, se adicionaron 50 ml de RPMI con SFB 20 %

Previamente fue necesario tener preparadas 5 placas de 96 pozos, de la siguiente manera:

2 placas con macrófagos (tienen RPMI 20 % SFB)

2 placas con HAT (SIGMA)

1 placa con RPMI 20 % SFB

A lo anterior se le agregó 100 µl de mezcla celular a cada pozo de la placa.

Teniendo como controles una fila de pozos con células linfoides y otra con Ag8.

Al día siguiente se cambió el medio de cultivo de todas las placas, y se adicionó a las mismas, 100 µl de medio HAT.

Todas las placas fueron incubadas en las mismas condiciones mencionadas.

3.4 Selección de hibridomas

Después de 24 horas, el medio de las placas se sustituyó por medio HAT. Las células se mantuvieron en éste por 20 días.

En el día 5, se revisaron las placas, mediante un microscopio invertido (Bausch Lomb), para la detección temprana del crecimiento celular.

Cuando se detectaron las primeras clonas, se cuidaron día a día hasta que recubrieron el área de cultivo en un 70% siendo éste el momento adecuado para preparar el sobrenadante que sería utilizado en ELISA.

La técnica de ELISA utilizada fue la misma a la descrita con anterioridad, con la única diferencia que el sobrenadante (muestra problema), se colocó tal cual, sin dilución y por un tiempo de incubación de 18 horas a 4°C. Una vez efectuado este ensayo, se seleccionaron las clonas productoras de anticuerpo.

3.5 Clonación de hibridomas

Las células productoras de anticuerpo, se clonaron mediante la técnica de dilución limitante. Esto es, a razón de 0.3 células por pozo, en placas de cultivo de 96 pozos con 100 μ l de RPMI 10% SFB.

Al cabo de aproximadamente 10 días, se detectaron las primeras clonas, desechándose los pozos que presentaron más de una clona.

La detección de los híbridos productores, se realizó por ELISA, usando como anticuerpos conjugados a peroxidasa, anti-IgG de ratón y polivalente (anti-IgG, IgA, IgM) de ratón (SIGMA Cat. A0412).

Las clonas positivas, productoras de anticuerpo se criopreservaron y también se mantuvieron tanto *in vivo* como *in vitro*.

3.6 Propagación *in vivo*

Para la obtención de líquido de ascitis, se inocularon intraperitonealmente 10 ratones con 0.5 ml de AIF.

Al cabo de 7 días, se inocularon, por la misma vía, de 5×10^5 a 5×10^6 hibridomas por ratón, resuspendidas en 1 ml de RPMI.

En una o dos semanas, los ratones que desarrollaron el tumor (los cuales se identificaron por un vientre prominente), fueron tomados para la recolección del líquido.

La recolección se realizó por punción intraperitoneal con una aguja de 20x32 en recipientes estériles, anestesiando antes a los animales, en una cámara de éter.

El líquido colectado se incubó a 37°C por espacio de 1 hora, y toda la noche a 4°C. Al día siguiente, se centrifugó a 3000 rpm por 10 minutos. El líquido resultante, se almacenó a -20°C.

3.7 Cultivo de agotamiento

Esta técnica tiene como finalidad, concentrar anticuerpo del sobrenadante de cultivo, con la ventaja de que se obtiene relativamente purificado.

Los hibridomas se expandieron en una botella de cultivo de 75 cm², hasta lograr una cantidad de 10⁸ células/ml, en un volumen final de 100 ml.

Después de una semana, se adicionó 20 ml de RPMI 10% y se dejaron una semana más, o hasta que la mayoría de los hibridomas hubieran muerto, para recolectar el sobrenadante de cultivo.

3.8 Criopreservación

Dado que en estadios tempranos, los hibridomas pueden perder parte de su material cromosómico, lo preferible es criopreservarlos. Además, también se previenen

posible muerte de los hibridomas en cultivo, por contaminación con hongos, levaduras o bacterias.

Así, las células a congelar debieron encontrarse en fase logarítmica de crecimiento. Utilizándose para ello una solución crioprotectora, compuesta de RPMI 20% SFB y DMSO al 1% (SIGMA).

Esta solución se esterilizó por filtración.

Los hibridomas que se encontraron en el medio de cultivo se centrifugaron a 1200 rpm por 5 minutos, el botón celular obtenido, se resuspendió en 1 ml de solución crioprotectora (10^8 células/ml), y se colocó en un criotubo (NUNC). De manera gradual se disminuyó la temperatura, y éstos se colocaron en refrigeradores de -20°C , -70°C y finalmente en nitrógeno líquido.

4. DETERMINACION DE LA CADENA PESADA DE LOS ANTICUERPOS

Para establecer que clase de inmunoglobulina (IgG, IgM) y de qué isotipo (IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3) esta produciendo el hibridoma, es necesario determinarlo, mediante la detección de la cadena pesada (H).

Para tal determinación, se llevo a cabo la técnica de ELISA de captura de anticuerpo, con el Kit ISO-2 (SIGMA).

Los anti-isotipos se diluyeron 1:1000 en PBS, y se colocaron 100 μl por cada pozo en una placa de microtitulación, incubándose una hora a 37°C .

Después de dicho tiempo, se lavó 4 veces con PBS-Tween 0.05 % y los pozos se recubrieron con 200 μl de solución de bloqueo (PBS-gelatina 2%) 2 horas 30 minutos a 37°C .

Se colocaron 300 μl de sobrenadante por pozo, y se incubaron 1 hora 30 minutos a temperatura ambiente, en atmósfera húmeda.

El conjugado polivalente (anti-isotipos IgG, IgM e IgA) de ratón unido a peroxidasa se diluyó 1:500 en PBS, colocando 100 μl en cada pozo, con un período de incubación de 50 minutos a temperatura ambiente.

El sustrato se colocó en 100 μl de una solución hecha con o-fenildiamina y H_2O_2 en amortiguador de citratos 0.1 M pH 5.6 A los 10 minutos la reacción se detuvo agregando 50 μl de H_2SO_4 2.5 N. La placa se leyó a 490 nm en el mismo lector de ELISA.

5. PURIFICACION DE LOS ANTICUERPOS POR CROMATOGRAFIA DE AFINIDAD CON PROTEINA G

El sobrenadante de el medio de cultivo y el líquido de ascitis se purificaron por cromatografía de afinidad con Proteína G.

Para ello, se utilizó una columna de proteína G en soporte de sepharosa.

Antes de su uso, fue necesario lavarla 10 veces su volumen con cada una de las siguientes soluciones: urea 2 M, cloruro de litio 1 M, y glicina 100 mM pH 2.5

Por otra parte, el líquido de ascitis se diluyó 1:5 con solución de Hanks, y el pH se ajustó con TRIS 1 M pH 8. Esta nueva solución se hizo pasar por la columna 3 veces, al término de las cuales, se lavó 10 veces su volumen con TRIS 100 mM pH 8, y con TRIS 10 mM pH 8, respectivamente.

La obtención del anticuerpo purificado se llevo a cabo por la elución de la columna con glicina 100 mM pH 3.

Las fracciones obtenidas se leyeron a 280 nm en un espectrofotómetro (BECKMAN DU 640), y guardadas a -20°C, hasta obtener suficiente para dialisar contra PBS.

6. UNION QUIMICA DE LOS ANTICUERPOS CON LA MOLECULA DE BIOTINA

Los anticuerpos monoclonales obtenidos, se unieron químicamente a la biotina, por la oxidación de los carbohidratos de la inmunoglobulina, previo a la formación de hidrazonas.

Procedimiento a seguir mediante la técnica proporcionada por los laboratorios PIERCE (U.S.A. Rockford). La cual se describe enseguida:

Se tomó 1 ml de una solución fría de IgG (2 mg/ml) en amortiguador de acetatos 0.1 M pH 5.5 (MERCK) y se mezcló con 1 ml de metaperiodato de sodio (20 mM) (MERCK), realizandose la oxidación por un tiempo de 20 minutos, a 0°C y en oscuridad.

Posteriormente se adicionó glicerol (MONTERREY), para detener la reacción, en una concentración final de 15 mM, incubandose por 5 minutos a 0°C.

La muestra se dializó toda la noche a 4°C en amortiguador de acetatos.

Posteriormente la biotina Lc hidrazida (PIERCE cat. 21340X), se adicionó hasta obtener una concentración final de 5 mM, siguiendo la reacción con agitación en un lapso de 2 horas a temperatura ambiente.

De esta manera, las muestras que ya se unieron a la biotina, se dializaron contra PBS y se almacenaron a 4°C.

7. ELISA DE DOBLE ANTICUERPO

En un ensayo de este tipo, un anticuerpo es unido a un soporte sólido, y el antígeno se adiciona enseguida, para que pueda unirse al primer anticuerpo. Este ensayo puede cuantificar el segundo anticuerpo marcado.

La técnica utilizada se describe a continuación:

El anticuerpo no marcado (Suero policlonal anti-LPS Re), se adicionó a una placa

de poliestireno, a razón de 1 μg en un volumen de 100 μl de PBS, con una incubación de 2 horas a temperatura ambiente, en atmósfera húmeda. Transcurrido dicho tiempo se lavó 3 veces con PBS.

Los pozos se recubrieron con 200 μl de una solución de bloqueo (PBS gelatina 2% con albúmina sérica bovina 1%), y con un tiempo de incubación de 2 horas a 37°C.

El antígeno (LPS Re) se añadió en una concentración de 1 μg por pozo; con 2 horas de incubación a temperatura ambiente.

El anticuerpo monoclonal unido a biotina se agregó en una dilución 1:16 (4 μg /pozo) en PBS, y se incubó 2 horas a temperatura ambiente.

Al término de dicho tiempo, se adicionó la estreptoavidina conjugada a peroxidasa en una dilución 1:5000 en PBS, con un tiempo de incubación de 1 hora 30 minutos a 37°C.

La adición del sustrato y la lectura de la densidad óptica, se realizó de la misma manera mencionada anteriormente.

VIII. RESULTADOS

1. ANALISIS DE LOS SUEROS DE RATONES INMUNES

Los ratones inmunizados se sangraron y la inmunoreactividad de los sueros se analizó en un ensayo inmunoenzimático (ELISA), donde se obtuvieron los resultados que se presentan en las figuras 9 y 10. El suero fue capaz de reconocer a la porina Omp C y LPS. Para Omp C, se obtuvieron D.O. próximas a 1.0, aún a una dilución 1:1600 (figura 9). No sucede lo mismo con la respuesta a LPS, ya que las D.O. oscilan entre un rango de 0.13 - 0.3, desde diluciones 1:20 - 1:160 (figura 10).

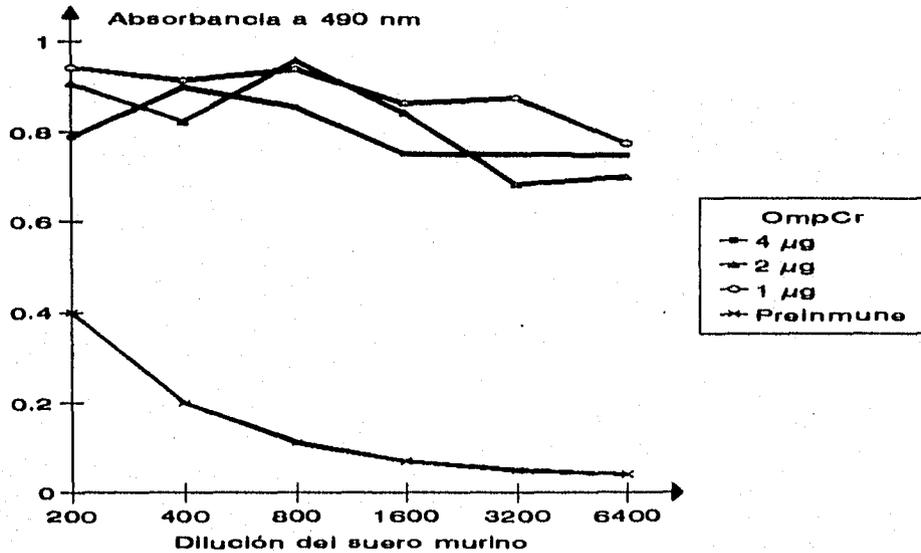


Figura 9. Reconocimiento de la porina OmpC por el suero de los ratones inmunizados con mezcla proteína-LPS. La reactividad se determinó por ELISA empleando como antígeno OmpC.

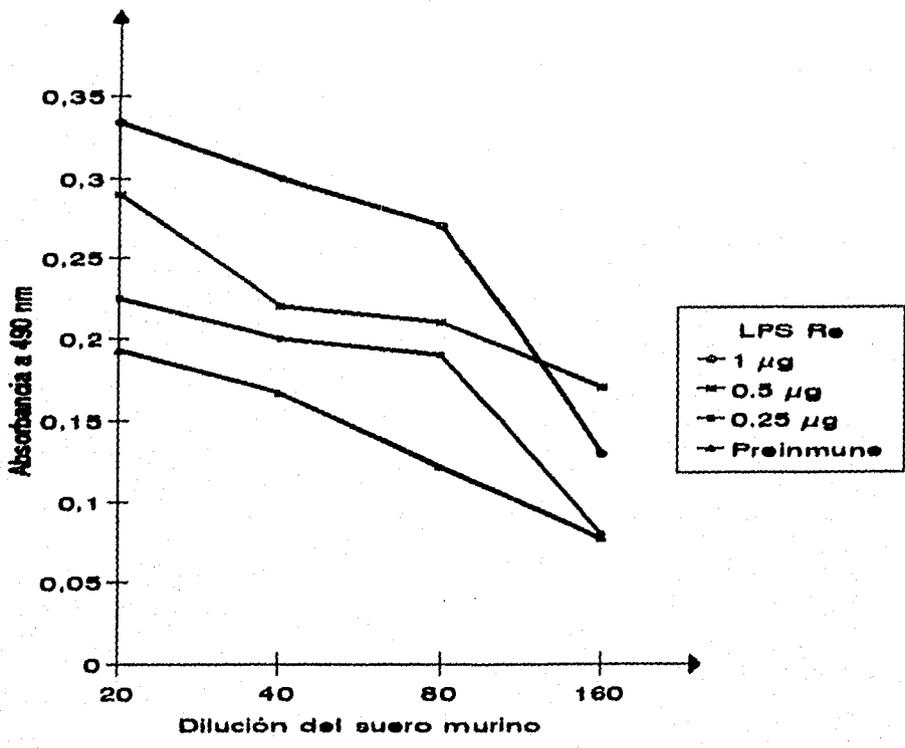


Figura 10. Reconocimiento del LPS Re por el suero de los ratones inmunizados con la mezcla proteína-LPS. La reactividad se determinó por ELISA empleando como antígeno LPS Re.

2. DETECCIÓN DE HIBRIDOMAS PRODUCTORES DE ANTICUERPO ESPECIFICO

Para realizar la fusión se utilizó una mezcla 5:2 de células linfoides y células de mieloma. Es decir, se fusionaron 2.25×10^7 células con 9×10^6 células respectivamente.

Al décimo día después de la fusión, se observó que los cultivos deberían ser analizados por el ensayo de detección de anticuerpos específicos.

Los resultados de ELISA se analizaron por medición del desarrollo del color en un lector de ELISA, descartándose aquellos que presentaron D.O. menores o iguales al sobrenadante de células Ag8 (control negativo). Se encontró que un total de 20 pozos fueron positivos para OMP C, y que tres de ellos presentaban las D.O. más altas, éstos fueron B4, F3 y A10 (figura 11).

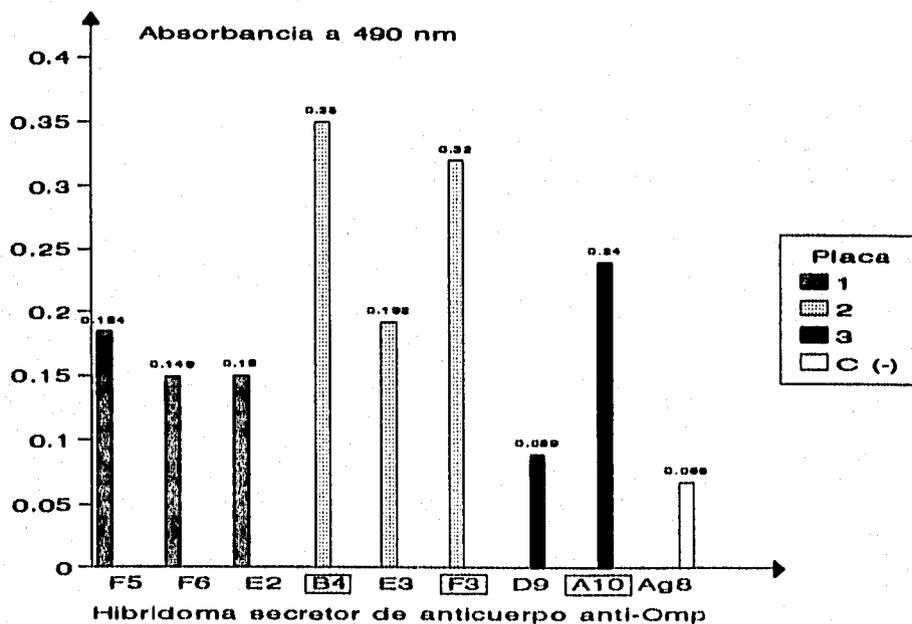


Figura 11. Hibridomas secretores de anticuerpo anti-OmpC. Su reactividad se determinó por ELISA empleando como antígeno a OmpC. Como control negativo se utilizó sobrenadante de células Ag8.

Mientras que en la respuesta para LPS, se obtuvieron 9 pozos secretores de anticuerpo anti-LPS, y sólo dos presentaron altos títulos de absorbancia, ellos fueron F5 y G3 (figura 12).

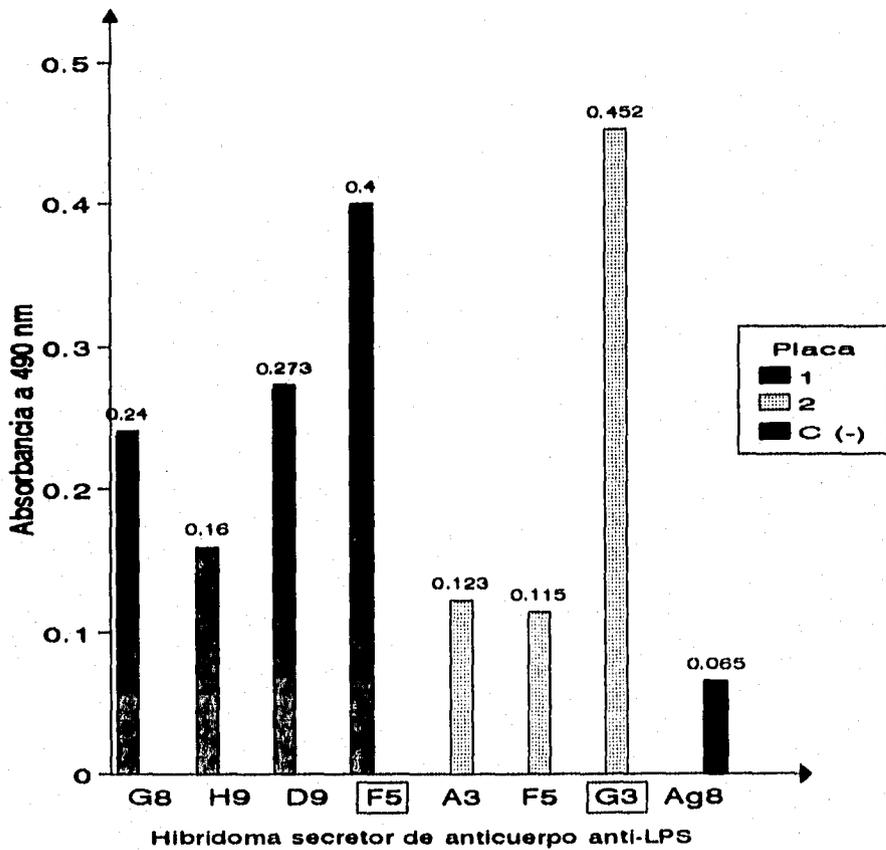
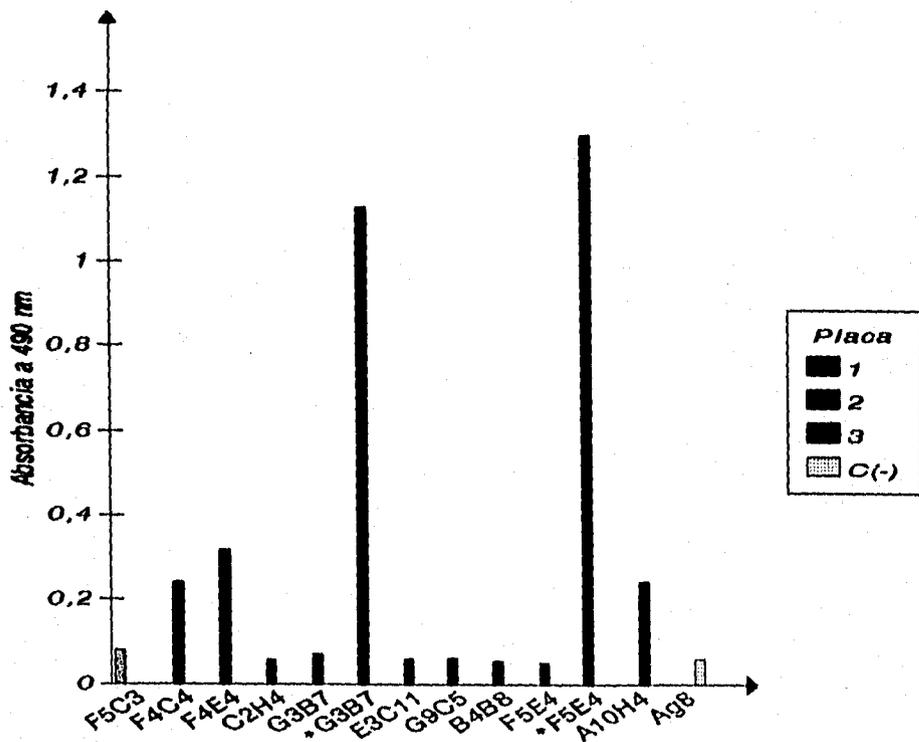


Figura 12. Hibridomas productores de anticuerpo anti-LPS. Su reactividad se determinó por ELISA empleando como antígeno al LPS de *Salmonella typhi*. Como control negativo se utilizó sobrenadante de células Ag8.

3. CLONACION DE HIBRIDOMAS

La mayoría de los cultivos productores de anticuerpos con reactividad anti-OMPC, y algunos con reactividad anti-LPS, se congelaron. Los restantes se clonaron por la técnica de dilución limitante.

Se clonó en 40 placas, sólo en 100 pozos se desarrolló el crecimiento celular. De ellos, en la figura 13 se muestran: Algunos no productores de anticuerpo, los 4 hibridomas productores de anticuerpo anti Omp C y dos hibridomas productores de anticuerpo LPS. De éstos últimos, la clona G3B7 presenta una D.O. mayor a la unidad, mientras que la clona F5E4 presenta una D.O. de 1.3



Clonas productoras de anticuerpo anti-OmpC y anti-LPS

Figura 13. Clonas productoras de anticuerpo monoclonal anti-OmpC y anti-LPS*. La reactividad se determinó por ELISA utilizando como antígenos OmpC y LPS de *Salmonella typhi*, como control negativo se utilizó sobrenadante de células Ag8.

4. EVALUACION DEL ANTICUERPO MONOCLONAL G3B7 CONTRA 2 LPS

Para saber que tipo de LPS reconocía G3B7, fue necesario probar el sobrenadante de cultivo con LPS de *Salmonella typhi* y LPS Re de *Salmonella minnesota*. Para ello se utilizó sobrenadante de cultivo en agotamiento y normal (de tres días). Es en el primero, donde el título de absorbancia es mayor para el LPS de *Salmonella minnesota* (figura 14).

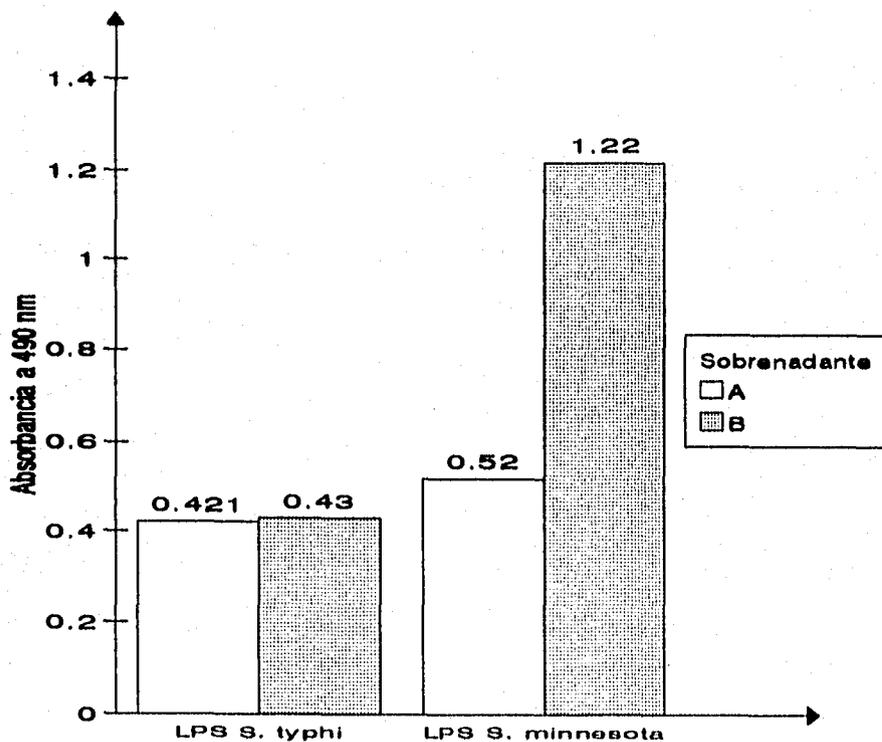


Figura 14. Reactividad del anticuerpo monoclonal G3B7 contra el LPS de *Salmonella typhi* y el LPS de *Salmonella minnesota*. La reactividad se determinó por ELISA. El sobrenadante A se cosechó en tres días mientras que en el B es cultivo de agotamiento (7 días), con la misma densidad celular.

5. RENDIMIENTO OBTENIDO DEL ANTICUERPO MONOCLONAL EN ASCITIS Y SOBRENADANTE DE CULTIVO.

Los resultados se resumen enseguida:

	LIQUIDO DE ASCITIS	SOBRENADANTE
INOCULO CELULAR	5x10 ⁶ células/ratón	10 ⁶ células/ml
TIEMPO DE COSECHA	7-15 días	7-30 días
VOLUMEN	70 ml	500 ml
ANTICUERPO OBTENIDO	7 mg	700 µg
RENDIMIENTO	100 µg/ml	1.4 µg/ml

6. DETERMINACION DE LA CADENA PESADA DE LA INMUNOGLOBULINA

El isotipo se determinó por la detección de la cadena pesada de la inmunoglobulina. De esta manera, los isotipos encontrados en el líquido de ascitis fueron IgG1 e IgM (figura 15). A mayor dilución, mejor se aprecia el isotipo; ya que a una dilución 1:5000 se están eliminando proteínas extrañas que interfieren en la reacción. El control negativo obtuvo títulos menores de 0.05 de D.O.

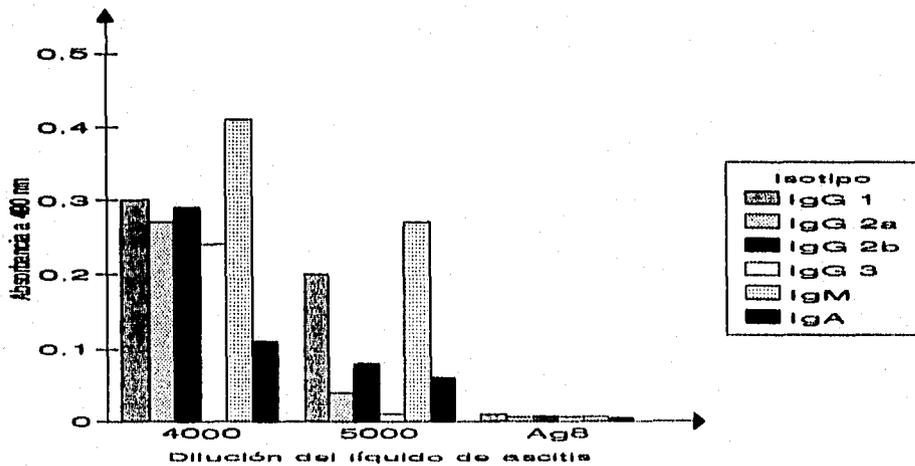


Figura 15. Isotipificación del anticuerpo G3B7 en el líquido de ascitis. El líquido se produjo por la inoculación de 5 millones de células G3B7 en la cavidad peritoneal de ratones BALB/c. Como control negativo se utilizó sobrenadante de Ag8 sin diluir.

Cuando el líquido de ascitis se purificó en cromatografía de afinidad con proteína G, se observó que el anticuerpo purificado (*Purificado*) presenta todos los isotipos. En cambio la fracción *Ascitis* presenta en mayor proporción IgG1 e IgM (figura 16). Esto nos indicó que es necesario pasar más veces el líquido en la columna de sepharosa, por que gran cantidad de IgG1 no se unió a la proteína G.

En el sobrenadante de cultivo no se observa interferencia de otras proteínas, ya que el medio de cultivo carece de ellas. Se ve claramente que el isotipo producido por los hibridomas es IgG1 e IgM, y aunque en este medio se obtiene el anticuerpo relativamente purificado, el alto costo de los reactivos empleados en su producción, impide que se produzcan en grandes cantidades.

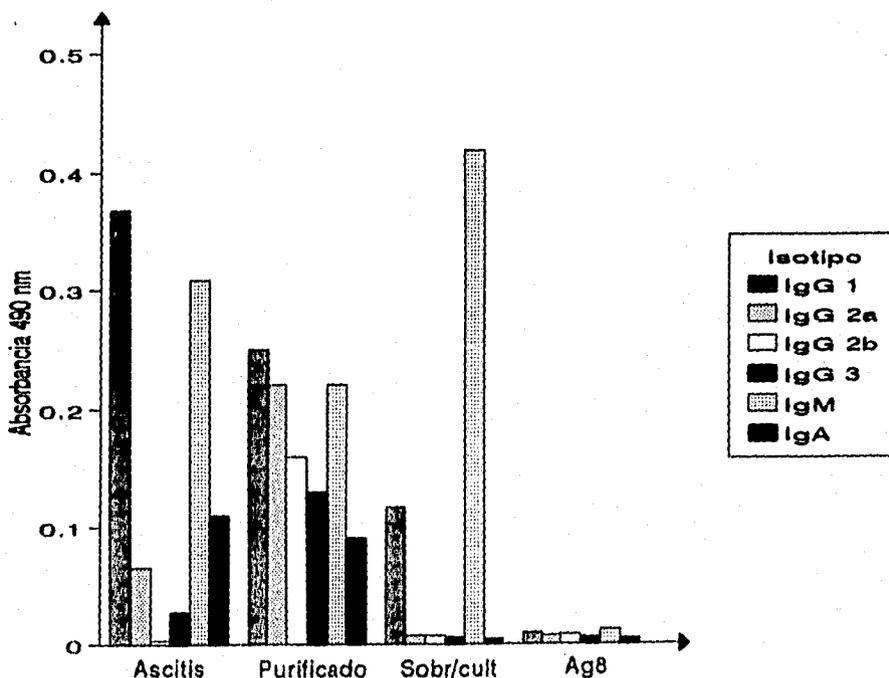


Figura 16. Isotipificación del líquido de ascitis purificado en cromatografía de afinidad con proteína G. La fracción *Ascitis* es el líquido colectado una vez pasado por la columna y la fracción *Purificado* es el anticuerpo unido a la proteína G y eluido con glicina 100 mM pH3. En el sobrenadante de cultivo (*Sobr/cult*) se observa que el isotipo es IgG1 e IgM.

7. DETERMINACION DE LA CONCENTRACION OPTIMA PARA EL ANTICUERPO MONOCLONAL UNIDO A LA MOLECULA DE BIOTINA

El sistema de amplificación dado por el complejo estreptoavidina-biotina es de gran utilidad, cuando lo que se requiere es unirlo al anticuerpo y detectar mínimas concentraciones del antígeno.

Para determinar que concentraciones estarían involucradas en la detección del antígeno, se utilizó el anticuerpo monoclonal unido a biotina, y se tituló.

A una concentración de 4 μg del anticuerpo y 500 ng de antígeno, la D.O. es cercana a la unidad (figura 17).

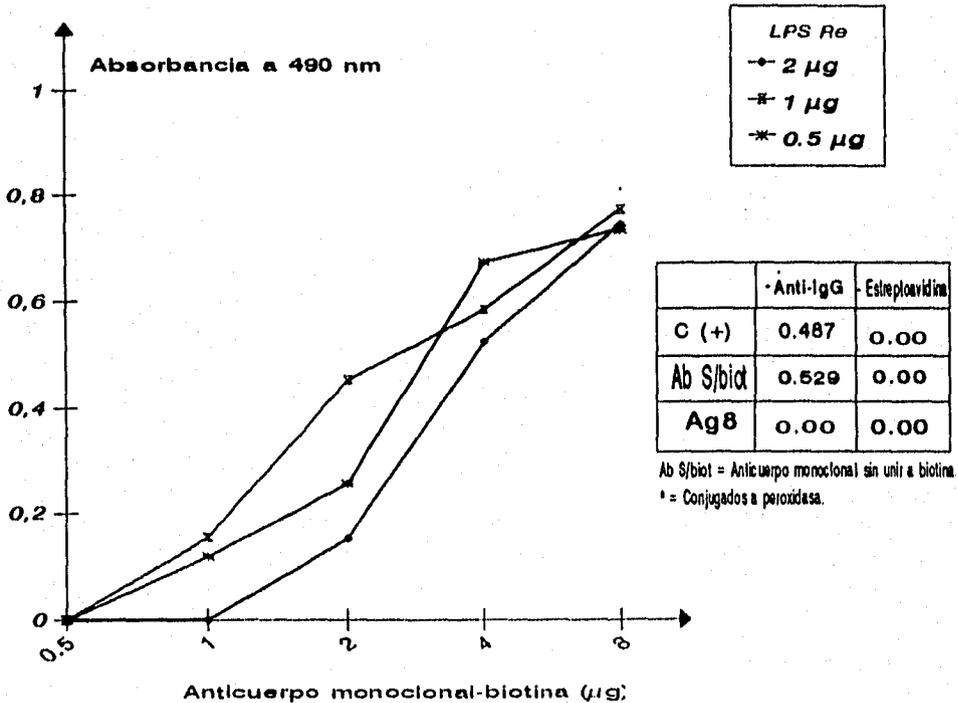


Figura 17. Titulación del anticuerpo monoclonal unido a biotina. Se utilizó el anticuerpo purificado en proteína G y como reactivo revelador se empleó estreptoavidina conjugada a peroxidasa. La tabla muestra los controles y su absorbancia.

8. ELISA DE DOBLE ANTICUERPO

Dado que se requiere cuantificar o detectar antígeno en mínimas concentraciones, se necesita un ensayo de ELISA de doble anticuerpo. Así, se realizó el primero de estos ensayos. A pesar de utilizar varias diluciones del antígeno y del anticuerpo de captura, manteniendo constante la concentración del monoclonal. No se observó efecto de dilución (datos no mostrados).

En el siguiente ensayo, se mantuvo constante la concentración del anticuerpo de captura, y se variaron las concentraciones del antígeno (desde 100 ng) y el monoclonal (desde 8 μ g). Aún así no hay efecto de dilución ya que los controles marcados sin antígeno revelaron una D.O. de 0.149 mientras que el control sin anticuerpo de captura tuvo una D.O. de 0.113 (datos no mostrados).

En el siguiente ensayo, se colocó una dilución constante del anticuerpo captador, diversas diluciones dobles del antígeno y diluciones del anticuerpo monoclonal.

No se observó un efecto de dilución, ya que los controles marcados sin antígeno revelaron una D.O. de 0.136, mientras que sin anticuerpo captador la D.O. resultó ser de 0.107

IX. ANALISIS DE RESULTADOS

Algunos autores han reportado hibridomas productores de anticuerpo anti-LPS, utilizando como antígeno un extracto sonicado de *Salmonella typhi*³⁸ y/o la bacteria completa^{38,39}. Otros en cambio, han reportado hibridomas secretores de anticuerpo capaz de reconocer un antígeno proteico de *Salmonella typhi*⁴⁰. En ambos casos la membrana externa de la bacteria presenta varios determinantes inmunodominantes. Aunque la respuesta inmune humoral es mayor para antígenos de naturaleza protéica.

Por ello, en el esquema de inmunización, se utilizó una preparación protéica-LPS de *Salmonella typhi*; ya que era probable obtener células plasmáticas productoras de cada anticuerpo, e incluso la línea de trabajo en el laboratorio es sobre las proteínas de esta bacteria y en su producción el LPS, que se encuentra presente en 0.4 %^{41,42}.

Así, se comprobó la presencia de anticuerpos anti-OmpC y anti-LPS Re en el suero de los ratones inmunizados, mediante la técnica de ELISA, tal como se muestra en las figuras 9 y 10.

De las cinco placas utilizadas al inicio de la fusión, sólo sobrevivieron los híbridos que se encontraron en las placas de macrófagos 1 y 2, y RPMI. De las que contenían HAT, ninguno sobrevivió. Esto nos indica que después de que las células han sido fusionadas, no es conveniente realizar la selección enseguida en medio HAT, ya que su carga genómica aún no se estabiliza. En cambio, las placas que contenían un tapiz de macrófagos fueron un excelente medio para que los hibridomas se estabilizaran y crecieran, ya que estos tipos celulares proveen factores de crecimiento, además de eliminar desechos y restos celulares; e incluso pueden remover levaduras, hongos y bacterias en estadíos tempranos de la infección. Fueron en estas placas donde se encontraron los tres tipos de hibridomas:

- 1) Productores de anticuerpo anti-OMP C
- 2) Productores de anticuerpo anti-LPS
- 3) Productores de anticuerpo anti-lípido A.

Para concluir si una fusión fue excelente o no, sólo se puede comprobar realizando otras fusiones, para determinar la frecuencia la estabilidad y viabilidad de los hibridomas⁴.

Cuando se realizan fusiones celulares, los híbridos resultantes pueden perder parte del material cromosómico, esto es al azar y no existe manera de prevenirlo. Por ello, es necesario congelar para preservar la línea.

A pesar de la obtención de varios hibridomas sólo se trabajó con el productor de anti-lípido A, llamado G3B7; los demás se congelaron en nitrógeno líquido.

Este hibridoma fue capaz de reconocer tanto al LPS de *Salmonella typhi* como al de *Salmonella minnesota* (figura 13) ya que ambas estructuras comparten la fracción común de las enterobacterias: el lípido A.

El hecho de que el anticuerpo sea capaz de reconocer al LPS de *Salmonella minnesota* se debe a que carece del antígeno O y parte del núcleo, lo que lo hace accesible al reconocimiento. Mientras que la configuración espacial del LPS de *Salmonella typhi* impide, parcialmente, que los anticuerpos reconozcan al antígeno.

En la determinación del isotipo (figura 15, dilución 1:5000) se encontró que existían IgG1 e IgM, esto no es extraño dado que IgM aparece en la respuesta inmune primaria, además de que la respuesta de anticuerpos a antígenos timo-independientes, se restringe a una inmunoglobulina de corta duración. Las clonas productoras de IgG aparecen en el día 5, y se incrementan hasta el día 14, para que esto siga así, el LPS puede ser administrado en vesículas fosfolipídicas⁴³. Además, Qadri y colaboradores³⁸, reportan el isotipo IgG1 de sus hibridomas, cuando inmunizan con un extracto sonificado de la bacteria o con la bacteria completa.

En 1983⁴⁴, se demostró que los isotipos IgG1, IgG2 o IgG3 pueden ser inducidos por la longitud de la estructura del LPS. Los fosfolípidos y las proteínas usados como adyuvantes alteran el número y las subclases de células formadoras de placa (PFC) de la IgG específica. Las mezclas de LPS con fosfolípidos o proteínas hidrofóbicas inducen, predominantemente PFC de tipo IgG1, mientras que la mezcla del LPS con proteínas hidrofílicas induce IgG2.

Aunque la proteína G tiene gran afinidad por todos los subtipos de la inmunoglobulina G, también une a los demás isotipos (IgA, e IgM). Es tal vez por esto que en la figura 16 se observen todos los isotipos (en *Purificado*), mientras que en *Ascitis* se observa todavía IgG1 e IgM. Y aunque se siga pasando más líquido de ascitis, las fracciones de la proteína G que unen la región Fc se han saturado por la presencia de IgM. Por lo que se recomienda precipitar esta inmunoglobulina antes de purificar.

El método de amplificación más estudiado es el de el sistema estreptoavidina-biotina. Al ser la biotina una molécula pequeña, puede ser unida a los anticuerpos sin ningún problema. Entre los métodos que se utilizan para unir moléculas a las inmunoglobulinas se cuentan las que reaccionan con grupos:

- Aminos
- Sulfhídricos
- Residuos de tirosina
- Aldehídos (después de la oxidación de los carbohidratos del anticuerpo).

De todos estos los grupos aldehídos son mejor para conjugar, debido a que por encontrarse en la región Fc del anticuerpo, no se interfiere con el sitio de unión antígeno-anticuerpo.

Los inmunoanálisis en fase sólida pueden llevarse a cabo siguiendo varios protocolos. En cada caso, el protocolo de elección depende de las necesidades del laboratorio, de la naturaleza del antígeno a medir y de los Inmunoreactantes disponibles. Además se deben determinar las diluciones de los reactivos y las condiciones de reacción óptimas para cada sistema analítico mediante titulaciones adecuadas ¹⁶.

La obtención de anticuerpos monoclonales, contra un antígeno determinado, depende en gran medida, del tipo de ensayo de detección que se emplee. La elección del ensayo depende no sólo de la rapidez, eficiencia y confiabilidad del mismo, sino que debe tomarse en cuenta en que será utilizado el anticuerpo.

Sabiendo que el objetivo principal de contar con anticuerpos monoclonales contra el lípido A es utilizarlos como una herramienta auxiliar de diagnóstico en Fiebre tifoidea y choque endotóxico. Se eligió un sistema de escrutinio que reuniera las siguientes consideraciones:

- 1) Que el sistema nos permitiera detectar al antígeno en forma soluble, es decir en fluidos biológicos.
- 2) Al presentarse el antígeno en concentraciones mínimas, los anticuerpos deberían ser unidos a algún sistema que amplificaran la señal.
- 3) Y que, el ensayo elegido reuniera, también, facilidad en su realización, sensibilidad, eficiencia, y confiabilidad.

Por tales motivos, el sistema escogido fue el de ELISA de doble anticuerpo o sandwich. Esta técnica presenta grandes ventajas a diferencia de otros sistemas de diagnóstico o selección de anticuerpos monoclonales como el radioinmunoensayo (RIA) o inmunofluorescencia (IFA) que implican un mayor costo en su realización debido a los cuidados y equipo especial que se necesitan ⁴⁵.

El ensayo de ELISA para diagnóstico es más económico y de una sensibilidad igualable al tomarse mediciones de absorción de la reacción enzimática colorida en un espectrofotómetro convencional.

En los ensayos finales (datos no mostrados) no se observó un efecto de dilución, ésto se conoce como "fenómeno de dosis altas". Ocurre cuando existe exceso de antígeno; y consiste en un incremento de la señal, para posteriormente mostrar un descenso de la misma. Así, la señal A puede ser interpretada como una concentración X o Y (figura 18).

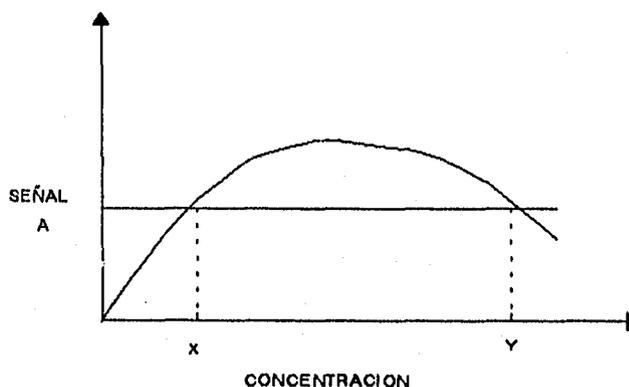


Figura 10. Fenómeno de "dosis altas". Cuando en ELISA se encuentra los reactivos en altas concentraciones, comienzan a saturar la fase sólida causando la meseta, así la señal A puede ser interpretada como la concentración X o Y.

La explicación dada es que la cantidad de anticuerpo capturado a la fase sólida es restrictiva. En dosis altas, el antígeno primero satura la fase sólida causando la meseta, eventualmente, también el anticuerpo marcado la comienza a saturar, y el antígeno libre empieza a competir con el complejo antígeno-anticuerpo marcado, esto lleva a la inversión del sistema.

Para poder ser eliminado, se debe remover el antígeno libre por varios lavados, y las muestras que dan doble señal en la meseta deben ser más diluidas.

Las razones más importantes para la obtención de anticuerpos monoclonales dirigidos contra el lípido A, radica en la utilización para la detección de las bacterias o sus endotoxinas ya sea en agua, alimentos o en la clínica.

Los anticuerpos monoclonales también puede ser probados en sistemas experimentales para el tratamiento de la infección, es decir en seroterapia y para neutralizar toxinas bacterianas.

Y finalmente, se diagnostica fiebre tifoidea sin tener pruebas de laboratorio que lo confirmen, basándose únicamente en criterios clínicos o cuando más en una sola determinación de la prueba de Widal ⁴⁶, por lo que probablemente la incidencia real sea

menor a la reportada a nivel nacional por la Secretaría de Salud, sin perder de vista que también es cierto que el reporte de padecimientos no se realiza adecuadamente, principalmente entre médicos que ejercen la medicina privada en México ^{36,45}.

También se observa que en realidad en los cuadros febriles y diarreicos es importante el contar con apoyos de laboratorio, para poder establecer el diagnóstico nosológico, y el paciente no sea expuesto al riesgo potencial que genera el uso innecesario de antibióticos, los que generalmente son administrados en varias combinaciones pretendiendo dar un tratamiento de amplio espectro que cubra la posibilidad de atacar varios gérmenes involucrados en la patogénesis de cuadros diarreicos o febriles, práctica comúnmente observada en la atención a los pacientes ³⁷.

X. CONCLUSIONES

Con el presente trabajo se llegaron a las siguientes conclusiones:

- * Se obtuvieron hibridomas productores de anticuerpo anti-OmpC, anti-LPS y anti-LPS Re. Ya que la mezcla antigénica, compuesta de proteína y LPS, es capaz de inducir la producción de anticuerpos para cada uno de sus componentes.
- * El anticuerpo monoclonal secretado por el hibridoma G3B7 es capaz de reconocer al LPS Re de *Salmonella minnesota*. La determinación del isotipo reveló una mezcla de dos hibridomas; uno que secreta IgG1 y otro IgM. Este último se encuentra en mayor proporción.
- * La inoculación del hibridoma G3B7 a ratones BALB/c, produjo apreciables cantidades del anticuerpo. Mientras que en el medio de cultivo, la producción fue menor. Ambos se purificaron en cromatografía de afinidad con proteína G.
- * Existe saturación en el sistema de doble anticuerpo.
- * Los anticuerpos monoclonales deben ser evaluados, en el futuro, para su empleo en el diagnóstico de infecciones por bacterias Gram negativas.

XI. PERSPECTIVAS

Dado que, en el hibridoma productor de anticuerpo anti-lípido A, se encuentran dos clonas, es necesario separarlas. Así, sólo la clona de isotipo IgG1 debe ser utilizada en los siguientes ensayos. Además, también es necesario probar el anticuerpo frente a una batería de LPS de varias enterobacterias, o en todo caso, probarse con la bacteria completa.

Una vez que se haya logrado la estandarización de la técnica de doble anticuerpo, se podrá ensayar con fluidos biológicos de pacientes que presenten una infección por bacterias Gram negativas, o en la búsqueda de la endotoxina en agua o alimentos.

XII. BIBLIOGRAFIA

1. Abbas, K. A., Litchman, H. A., Pober, S. J. 1994. Cellular and molecular Immunology. 2a. U.S.A. : W. B. Saunders Company.
2. Rose, N. R. 1984. El laboratorio en inmunología clínica. Buenos Aires: Médica Panamericana.
3. Osmond, D. G., Fahlman, M. T., Fulop, G. M., Rahal, D. M., 1981. Regulation and localization of lymphocyte production in the bone marrow. In: Porter R, Wheland J. Microenvironments in haematopoietic and lymphoid differentiation. London: Pitman. pp 68-70.
4. Köhler, G., Milstein, C. 1975. Continuous culture of fused cells secreting antibody of predefined specificity. Nature. 256:495-497.
5. Peters, H. J., Baumgarten, H. 1992. Monoclonal antibodies. Germany: Springer Laboratory.
6. Rittler, A., Ladyman, M. 1985. Monoclonal antibodies production, engineering and clinic application. Great Britain: Cambridge University Press.
7. Roitt, M. I. (Ed). 1992. Encyclopedia of immunology. 2ª ed. New York: Academic Press. vol 3.
8. Stevenson, M., Volsky, B., Volsky, J. D. 1986. Immortalization of human lymphocytes after transfection of Epstein-Barr virus DNA. Science. 233:980-984.
9. Nordan, P. R., Porter, M. 1986. A macrophage-derived factor required by plasmacitomas for survival and proliferation in vitro. Science. 233:566-569.
10. Macario, L. A. 1985. Monoclonal antibodies against bacteria. New York: Academic Press. vol 1.
11. Nieto, A., Carbonetto, H. C. 1989. Enzimoinmunoensayo (ELISA). En: Magni, F. A. Inmunología e inmunoquímica. 4ª ed. Buenos Aires: Médica Panamericana.
12. Raetz, H. R., Ulevitch, J. R., Wright, D. S., Sibley, H. C., Ding, A., Nathan, F. C. 1991. Gram-negative endotoxin: An extraordinary lipid with profound effects on eukaryotic signal transduction. FASEB J. 5:2652-2660.

13. Kronvall, G. 1973. A surface component in group A, C, and G streptococci with non-immune reactivity for immunoglobulin G. *J. Immunol.* 111:1401-1406.
14. Björk, L., Kronvall, G. 1984. Purification and some properties of streptococcal protein G, a novel IgG-binding reagent. *J. Immunol.* 133:969-974.
15. Heitzmann, H., Richards, M. F. 1974. Use of the avidin-biotin complex for specific staining of biological membranes in electron microscopy. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 71:3537-3541.
16. Guesdon, J. L., Ternynck, T., Avrameas, S. 1979. The use of avidin-biotin interaction of immunoenzymatic techniques. *J. Histochem. Cytochem.* 27:1131-1139.
17. Engvall, E., Perlmann, P. 1971. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) quantitative assay of immunoglobulin G. *Immunochemistry.* 8:871-879.
18. Voller, A., Bidwell, D., Bartlett, A. 1984. Análisis por enzimas fijadas a imunoabsorbentes. En: Rose, N. R. *El laboratorio en inmunología clínica.* Buenos Aires: Médica Panamericana.
19. Yolken R. H. 1991. Enzimoimmunoanálisis en fase sólida para detección de antígenos microbianos en líquidos orgánicos. En: Lennete, E. *Microbiología Química.* 4ª. Buenos Aires: Médica Panamericana.
20. Nowotny, A. 1987. Review of the molecular requirements of endotoxic actions. *Rev. Infect. Dis.* 9 (Suppl. 5): S503-S511.
21. Ulevitch, J. R., Tobias, S. P. 1994. Recognition by cell leading to transmembrane signaling. *Curr. Opin. Immunol.* 6:125-130.
22. Ulevitch, J. R., Tobias, S. P. 1995. Receptor-dependent mechanisms of cell stimulation by bacterial endotoxin. *Annu. Rev. Immunol.* 13:437-457.
23. Hitchcock, P. J., Brown, M. T. 1983. Morphological heterogeneity among *Salmonella* lipopolysaccharide chemotypes in silver-stained polyacrylamide gels. *J. Bacteriol.* 154:269-277.
24. Amano, K. I., Watanabe, M., Takimoto, H., Kumazawa, I. 1991. Structural and biological comparison of lipopolysaccharides (LPS) from *Bordetella* species. *Develop. Biol. Standar.* 73:193-199.
25. Weckesser, J., Drews, G. 1979. Lipopolysaccharides of photosynthetic prokaryotes. *Ann. Rev. Microbiol.* 33:215-239.

26. Michalek, M. S., Kiyono, H., Babb, L. J., McGhee, R. J. 1980. Inheritance of LPS non responsiveness and elevated splenic IgA immune responses in mice orally immunized with heterologous erythrocytes. *J. Immunol.* 125:2220-2224.
27. McGhee, R. J., Kiyono, H., Michalek, M. S., Babb, L. J., Rosenstreich, L. D., Mergenhagen, E. S. 1980. Lipopolysaccharides (LPS) regulation of the immune responses T lymphocytes from normal mice suppress mitogenic and immunogenic responses to LPS. *J. Immunol.* 124:1603-1611.
28. Christ, J. W., Asano, O., Robidoux, R. C., Perez, M., Wang, Y., Dubuc, R. G., Gavin, E. W. 1995. E5531, a pure endotoxin antagonist of high potency. *Science.* 268:80-83.
29. Sato, K., Yoo, C. Y., Fukushima, A., Saiky, I. 1995. A novel synthetic lipid A analog with low endotoxicity, DT5461, prevents lethal endotoxemia. *Infect. Immun.* 63:2859-2866.
30. Iwanaga, S. 1993. The Limulus clotting reaction. *Curr. Opin. Immunol.* 5:74-82.
31. Lynn, A. W., Cohen, J. 1995. Adjunctive therapy for septic shock: A review of experimental approaches. *Clin. Infect. Dis.* 20:143-158.
32. Keppler, D., Hagmann, W., Rapp, S. 1987. Role of leukotrienes in endotoxin action in vivo. *Rev. Infect. Dis.* 9 (Suppl. 5): S580-S584.
33. Heumann, D., Barras, C., Severin, A., Glauser, P. M., Tomasz, A. 1994. Gram positive cell walls stimulate synthesis of tumor necrosis factor alpha and interleukin-6 by human monocytes. *Infect. Immun.* 62:2715-2721.
34. Rosenstreich, L. D., Globe, M. L. 1975. Difference in cell B mitogen responsiveness between closely related strains of mice. *J. Immunol.* 115:777-780.
35. Haziot, A., Rong, G. W., Lin, X. Y., Silver, J., Goyert, M. S. 1995. Recombinant soluble CD14 prevents mortality in mice treated with endotoxin (Lipopolysaccharide). *J. Immunol.* 154:6529-6532
36. Edelman, R., Levine, M. M. 1986. Summary of an international Workshop on typhoid fever. *Rev. Infect. Dis.* 8:329-335.
37. González, C., Ortiz, V., Rojas, R., Ramirez, A., Isibasi, A., Kumate, J. 1989. Seroepidemiología de la fiebre de tifoidea en 8 estados del norte de la República Mexicana. XX Congreso Nacional de Microbiología. Morelia, Mich. México.
38. Qadri, A., Gupta, K. S., Talwar, P. G. 1988. Monoclonal antibodies delineate multiple epitopes on the antigen O of *Salmonella typhi* lipopolysaccharide. *J. Clin. Microbiol.* 26:2292-2296.

39. Paniagua, J., Isibasi, A., Pelayo, R., Ortiz, V., Muy, M., Gonzalez, C., García, A., Islas, S., Kumate, J. 1989. Anticuerpos monoclonales antilipopolisacárido de *Salmonella typhi* 9, 12, Vi:d: análisis de protección pasiva en un modelo murino de fiebre de tifoidea. Rev. Archiv. Invest. 20:315-320.
40. Sarasombath, S., Lertmemongkolchai, G., Banchuin, N. 1988. Characterization of monoclonal antibodies to protein antigen of *Salmonella typhi*. J. Clin. Microbiol. 26:508-512.
41. Isibasi, A., Ortiz, V., Vargas, M., Paniagua, J., Gonzalez, C., Moreno, J., Kumate, J. 1988. Protection against *Salmonella typhi* infection in mice after immunization with outer membrane proteins isolated from *Salmonella typhi* 9, 12, d, Vi. Infect. Immun. 56:2953-2958.
42. Wesphal, O., Jann, K. 1965. Bacterial lipopolysaccharides. Extraction with phenol-water and further application of the procedure. Methods. Carbohydr. Chem. 5:83-90.
43. Rutkowski, E., Nixdorff, K. 1980. Qualitative and quantitative changes in the antibody-producing cell response to lipopolysaccharide induced phospholipid vesicles. J. Immunol. 124:2548-2551.
44. Karch, H., Nixdorff, K. 1983. Modulation of the IgG subclass responses to lipopolysaccharide by bacterial membrane components: Differential adjuvant effects produced by primary and secondary stimulation. J. Immunol. 131:6-8.
45. Cortes, F. A. 1992 : Ensayo inmunoenzimático para la detección de Salmonellas en: Heces, sangre y orina. Escuela Nacional de Estudios Profesionales Aragon. Tesis UNAM., México D. F.
46. Abraham, G., Teklu, B., Gedebu M., Selassie, H. G., Azene, G. 1981. Diagnostic value of the Widal test. Trop. Geogr. Med. 33:329-333.