

1
Lj



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
ZARAGOZA

DESARROLLO DE UN ELISA PARA
DETECTAR ANTIGENO p24 DEL VIH

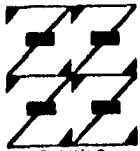
T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE

QUIMICO FARMACEUTICO BIOLGO

P R E S E N T A :

LAURA VIRGINIA ADALID PERALTA



LO PLUMAO
EJE
DE NUESTRA REFLEXION

DIRECTORA DE TESIS:
M en C. CARMEN SOLER CLAUDIN

MÉXICO, D.F.

1996

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.

Agradezco especialmente a la Dra. Carmen Soler Claudín, por las invaluables oportunidades que me ha dado.

Agradezco al Dr. Barry Ziola permitirme trabajar en su laboratorio.

A Heather Gordon y Jenifer Keuchle por caracterizar algunos anticuerpos.

Al programa México-Canadá de investigación en SIDA y a todas las personas que participan en él.

A el profesor Jorge Rivas Montes por alentarme en los momentos difíciles de mi carrera.

Al profesor Ramón Rodríguez por su apoyo.

Dedico este trabajo a Dios, a mis padres Martha Peralta Flores y Ezequiel Adalid Cruz por darme todo su apoyo, cariño y comprensión que me han ayudado a vivir.

A Alex el amor de mi vida.

A mis hermanos Carlos, Beatriz, Francisco y a mis sobrinos por todo su cariño durante mi carrera.

A Ernesto Peña por despertarme con amor cada mañana.

A mis amigos Elizabeth, Juan Francisco, Raúl, Leticia, Claudia, Jorge, Fernando, Maricarmen, Rebeca, Enrique.

A mis compañeros y amigos de la UIRH.

A todas aquellas personas que luchan contra el SIDA.

INDICE

Resumen	1
1. Introducción	2
2. Fundamentación del tema	3
2.1. Epidemiología	3
2.2 Vías de transmisión	3
2.3 Biología del virus de la inmunodeficiencia humana	4
2.4 Ciclo viral	5
2.5 Respuesta del hospedero	7
2.6 Historia natural de la enfermedad	8
2.7 Diagnóstico de VIH	9
2.7.1 ELISA indirecto	10
2.7.2 ELISA de competencia	10
2.7.3 ELISA en sandwich	11
2.8 Parámetros que afectan un ELISA	12
2.9 Anticuerpos	13
2.10 Anticuerpos monoclonales	14
2.10.1 Mieloma	14
2.10.2 Producción de anticuerpos monoclonales	15
2.11 Propagación de hibridomas en fluido de ascitis	17
2.12 Purificación de anticuerpos por el método de precipitación con sulfato de amonio	17
2.13 Marcate de anticuerpos con peroxidasa	18
3. Planteamiento del problema	19
4. Objetivos	20
5. Hipótesis	20
6. Material	21
7. Método	24
7.1 Producción de anticuerpos policlonales de conejo	24
7.2 Obtención de anticuerpos monoclonales	25
7.2.1 Bazotomía	25
7.2.2 Clonación de células de hibridoma por dilución limitante	25
7.2.3 Congelamiento de hibridomas	26
7.2.4 Inoculación de hibridomas en peritoneo de ratón Balb/c	26
7.3 Purificación de anticuerpos por precipitación con sulfato de amonio	27
7.4 Conjugación de anticuerpos con peroxidasa	27
7.5 Ensayo de titulación de anticuerpos	28
7.6 Ensayo de titulación de anticuerpos marcados con peroxidasa	28
7.7 Ensayo de competencia	29
7.8 ELISA en sandwich	30
8. Resultados	31
9. Discusión de resultados	46
10. Conclusiones	49
11. Bibliografía	50
12. Anexo	52

RESUMEN

Este trabajo se realizó en la Unidad de Investigación en Retrovirus Humanos del INDRE-IIB, con la finalidad de desarrollar una técnica de ELISA en sandwich para disminuir los costos en la detección de la proteína p24 del Virus de la Inmunodeficiencia Humana (VIH) que puede presentarse en suero de personas infectadas, en los sobrenadantes de cultivos celulares infectados, en los sobrenadantes de cocultivos de pacientes realizado para aislamiento viral y como un apoyo para la caracterización de la epidemia de SIDA en México.

El paso inicial en el desarrollo de esta técnica fue la obtención, purificación y marcaje con peroxidasa de 15 anticuerpos monoclonales y 2 policlonales. Posteriormente se realizó un mapeo de los epítomos reconocidos por los 15 anticuerpos monoclonales por medio de un ensayo de competencia. Finalmente, se estandarizaron las condiciones para el ELISA en sandwich, se probaron las combinaciones de diversos anticuerpos para captura y detección de p24 recombinante y se evaluó la capacidad de detección del ensayo desarrollado.

Se encontró, bajo las condiciones establecidas, que los mejores anticuerpos monoclonales para captura de p24 recombinante fueron dos anticuerpos a los que denominamos 3A y 5C; para la detección los anticuerpos monoclonales marcados con peroxidasa 6 y 2B y que el ELISA desarrollado presentó un límite de detección para p24 recombinante de 100 pg/ml.

1. INTRODUCCION

Desde los inicios de la epidemia del SIDA se ha implementado el diagnóstico de infección por VIH empleando diferentes métodos de ELISA. Este ensayo ha sido el de mayor empleo por sus bases inmunológicas que le imparten alta especificidad, fácil manejo, mayor exactitud y rápida interpretación de los resultados. Los primeros ensayos de ELISA que se diseñaron empleaban partículas virales completas como antígeno para la detección de anticuerpos en las muestras. Un problema con este tipo de ensayo fue el bajo valor predictivo positivo que presentaban, es decir, cuando se aplicaban en población de bajo riesgo de infección gran porcentaje de las muestras daban falsas, así fue que se diseñaron otros ensayos empleando como antígenos, ya sea proteínas virales obtenidas sintéticamente, o péptidos correspondientes a epítomos específicos, mejorando así la especificidad de los resultados positivos obtenidos.

Aunque se ha mejorado el diagnóstico para la pronta detección de anticuerpos, este método no es útil para el diagnóstico de pacientes pediátricos infectados verticalmente, ya que los anticuerpos de tales pacientes provienen de la madre infectada y no indican una infección real del paciente menor de dos años. El diagnóstico pediátrico, entonces, se puede hacer por medio de un cocultivo; es decir, las células periféricas mononucleares (PBMC) del paciente se cultivan *in vitro* y son alimentadas con PBMC de donadores sanos, estas últimas son susceptibles a infectarse en un lapso de treinta a cuarenta días. A lo largo del cocultivo, la presencia del VIH en el sobrenadante del cultivo se monitorea por medio de un ensayo de ELISA tipo sandwich que detecte la partícula viral o sus componentes.

Los cocultivos que se realizan en la Unidad de Investigación en Retrovirus Humanos (UIRH) requieren el uso de un ELISA tipo sandwich, éste se encuentra disponible comercialmente, pero su costo es bastante elevado. Por ello, se pensó en desarrollar un ELISA tipo sandwich no comercial para disminuir el costo del diagnóstico e investigación.

En colaboración con la Universidad de Saskatchewan en Canadá, se generaron hibridomas para producir anticuerpos monoclonales. Los anticuerpos obtenidos están dirigidos contra una proteína viral (p24) altamente conservada dentro de la estructura del VIH, y distintiva del virus.

En el presente proyecto, se caracterizaron los anticuerpos anti-p24 obtenidos y se emplearon sus propiedades para optimizar las condiciones de un ELISA tipo sandwich.

2. FUNDAMENTACION DEL TEMA

2.1 EPIDEMIOLOGIA

En 1983 comenzaron a notificarse casos de SIDA en México. Sin embargo, se considera que el principio de la epidemia ocurrió en 1981. Desde 1983 hasta el 1 de abril de 1996 se han notificado 26,651 casos de SIDA, de los cuales 39% permanecen vivos. Con respecto al número de casos notificados, México ocupa el decimotercer lugar a nivel mundial y el tercero en el continente americano. Basándose en los datos de prevalencia de la infección por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) en población general: obtenidos de donadores sanguíneos, estudios centinela en mujeres embarazadas y de acuerdo al modelo epidemiológico propuesto por la OMS, se estima que en forma acumulada hay aproximadamente 120,000 infectados por VIH en México, con la siguiente distribución: 86,000 casos de infección asintomática; 13,000 enfermos de SIDA vivos y 21,000 casos que ya habían fallecido. Se predice que durante los próximos 12 meses morirán de SIDA la mitad de los enfermos actuales y se estima que para el año 2000 se presentarán entre 77,000 y 88,000 enfermos de SIDA en México.(1)

2.2 VIAS DE TRANSMISION

Las vías de transmisión del VIH comprenden:

Vía Sexual: El VIH se transmite en relaciones sexuales cuando hay intercambio directo de fluidos biológicos tales como semen, secreciones vaginales, líquido preeyaculatorio y sangre con alguna persona infectada. Hay otros factores como en enfermedades de transmisión sexual (principalmente de tipo ulcerativo) que aumentan la eficiencia de la transmisión del virus.

Vía sanguínea: La transfusión de sangre completa o de hemoderivados tales como linfocitos, paquetes de células rojas, plaquetas y plasma contaminados han demostrado ser una importante vía de contagio. La infección también puede ocurrir por el trasplante de algún órgano infectado, o por accidentes tales como cortaduras o punciones con objetos contaminados con el virus.

Transmisión perinatal: Esta es la vía vertical de transmisión, ocurre cuando el virus de una madre infectada es capaz de ser transmitido al producto; se estima que la transmisión puede ocurrir intra-útero vía infección transplacentaria, durante el momento del parto por contacto directo con sangre infectada o secreciones y en el período postnatal a través de la leche materna. (2)

2.3 BIOLOGIA DEL VIRUS DE LA INMUNODEFICIENCIA HUMANA

El VIH es un virus que pertenece a la familia *Retroviridae*, subfamilia *lentiviridae*. La partícula viral es una estructura esférica de 90 a 120 nm de diámetro (fig. 1), está constituida por una envoltura externa compuesta en un 5 a 10% de proteínas virales glicosiladas, sintetizadas bajo la información codificada por el gen *env*. Las glicoproteínas virales se localizan una en el exterior, sobre la envoltura del virus, conocida como gp120 y otra transmembranal, denominada gp41. (3)

VIRUS DE LA INMUNODEFICIENCIA HUMANA

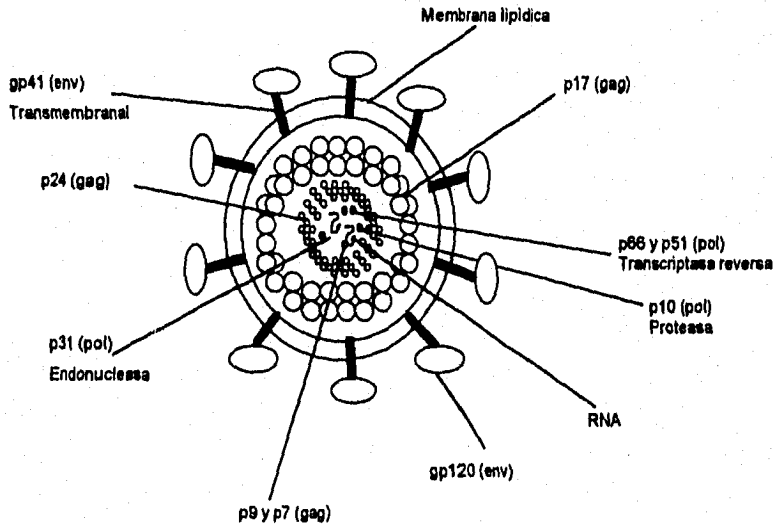


Fig. 1 Estructura general del virus de la inmunodeficiencia humana. (3)

Por debajo de esta envoltura y asociada a esta, se encuentra una capa proteica de forma icosaédrica constituida por la proteína p17 que probablemente estabiliza los componentes externos e internos del virión. En su interior se encuentra la nucleocápside del virus, de forma cónica, la cual está constituida primordialmente por la proteína p24; las proteínas p17 y p24 son codificadas por el gen *gag*. Se ha reportado, la presencia de dos proteínas adicionales producto del mismo gen unidas al RNA viral llamadas p9 y p7. (3, 4)

En el centro del virus se encuentran 2 copias idénticas de RNA y una enzima denominada transcriptasa reversa (TR), la cual es codificada por el gen *pol*; esta enzima está compuesta por las proteínas p66 y p51. La TR es una DNA polimerasa que es responsable de transcribir el RNA viral a DNA (transcripción reversa). Además se encuentran otras proteínas, p31 con funciones de integrasa y una proteína p10 con función de proteasa. (3,4)

Existen otros componentes no estructurales del virus que juegan un papel importante en la infección. Estos componentes virales incluyen factores de regulación negativa, codificados por los genes *nef* (p27) y *vpr* (p15), ambos limitan la replicación viral; la regulación positiva esta mediada por el gen *vpu* (p16) que incrementa la maduración de la proteína viral. También se encuentra un gen de transactivación *tat* (p14); un gen que regula la expresión de la proteína viral *rev* (p19) y además una región reguladora de la transcripción *LTR*. (3,4)

2.4 CICLO VIRAL

Generalmente la infección empieza cuando la proteína gp 120, que se encuentra en la membrana del virus, se une al receptor de superficie CD4 de la célula blanco, esta unión es altamente específica y de gran afinidad; el siguiente paso es la penetración y el desnudamiento de la partícula viral, el RNA viral se transcribe para generar el DNA viral gracias a la transcriptasa reversa, la cual se encarga de copiar la secuencia de nucleótidos del RNA viral para sintetizar el DNA de doble cadena y con la ayuda de la integrasa viral se incorpora al DNA de la célula blanco. Al DNA integrado del VIH se le llama provirus, este provirus puede permanecer latente y no expresarse por largos periodos, o puede ser activado por diversos factores, ya sean celulares, o bien por la infección con otros patógenos o por la aparición de variantes virales que pueden inducir la transcripción y la traducción del genoma a partículas virales. Las partículas virales pueden lisis a la célula o liberarse por exocitosis en un crecimiento controlado (fig. 2). (5, 6, 7)

Se han descrito otras vías de ingreso del virus a las células blanco. Una de ellas se lleva a cabo a través de la formación de complejos antígeno-anticuerpo, los cuales facilitan la entrada del virus mediante la interacción de la porción Fc del anticuerpo con un receptor celular específico. Adicionalmente se ha postulado la presencia de otro receptor posiblemente indispensable para la penetración del virus, al cual se le ha denominado receptor de fusión y se propone que tal factor interactúa con la glicoproteína transmembranal gp41 del virus.(8)

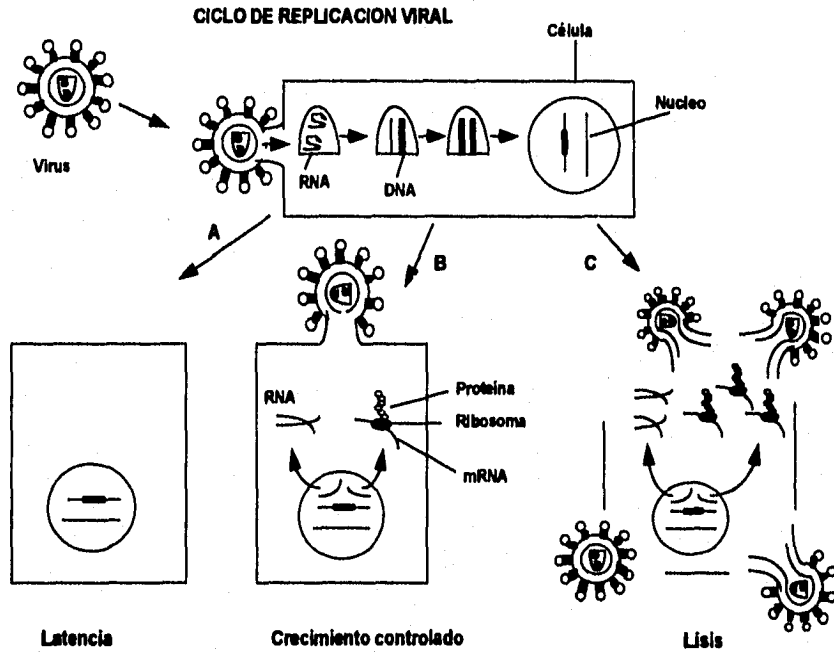


Fig. 2 Infección del VIH. Arriba la interacción entre el virus y una célula susceptible; entrada; formación de DNA a partir de RNA y la formación del provirus. (A) el virus permanece latente, (B) alternativamente usando los mecanismos de la célula el virus se replica de forma lenta sin causar destrucción de la célula, (C) la replicación puede ser muy rápida y causar lisis de la célula. (5)

2.5 RESPUESTA DEL HOSPEDERO

Los componentes principales del sistema inmune incluyen:

Macrófagos: células que fagocitan, procesan y presentan antígeno a otras células inmunitarias.

Linfocitos T: células que juegan un papel vital en la respuesta inmune tipo celular. Existen dos subtipos celulares:

Células ayudadoras (T_H), poseen como marcador de superficie la proteína CD4, su función además de secretar citocinas es de regulación de los otros componentes del sistema inmune como la proliferación, diferenciación y activación de diversas células tales como linfocitos B, células asesinas, células no linfoides, hematopoyéticas, macrófagos y linfocitos T entre otras.

Células citotóxicas (T_C), tienen la proteína CD8 como marcador de superficie y su función principal es lisar células infectadas.

Linfocito B: células que responden al estímulo de un antígeno para producción y secreción de anticuerpos, usualmente requieren ayuda de linfocitos T_H .

Células asesinas (NK): células que controlan la homeóstasis del sistema inmune. (3)

La respuesta inmune normalmente es estimulada cuando un individuo se expone a un antígeno, en este caso el VIH puede ser de dos tipos:

A) **Inmunidad humoral:** es mediada por moléculas en la sangre llamadas anticuerpos que reconocen una parte específica del antígeno. Los anticuerpos anti-VIH se forman entre 6 y 12 semanas posteriores a la infección y algunos son capaces de neutralizar al virus, por ejemplo, en muchos casos la unión virus-anticuerpo evita el ataque del virus a la célula. En pacientes con VIH la respuesta inmune humoral se mantiene durante años; sin embargo, en etapas terminales de la enfermedad el sistema inmune se deteriora y los niveles de anticuerpos disminuyen. La figura 3 muestra los niveles de anticuerpos y de antígenos virales a lo largo de la enfermedad. (3)

B) **Inmunidad celular:** Cuando el VIH infecta a un individuo, usualmente es reconocido como partícula antigénica por los macrófagos, es fagocitado, degradado y procesado hasta péptidos. Subsecuentemente el antígeno es presentado a las células T_H , las cuales reconocen al antígeno en el contexto de moléculas clase II liberando citocinas o factores que contribuyen al aumento de la respuesta inmune. Sin embargo, el antígeno también puede ser presentado en moléculas clase I, ser reconocido por células T_C e inducir citotoxicidad. (3)

Se observa que cuando las células T_H se encuentran comprometidas por la infección del VIH todo el sistema inmune es afectado, ya que eventualmente las células T_C , los macrófagos e incluso los linfocitos B pueden ser incompetentes por la ausencia de células T_H y se presentan infecciones oportunistas, la infección avanza hacia SIDA y la linfopenia es mayor causando inmunodeficiencia. (3, 9, 10)

Respuesta a la infección por VIH

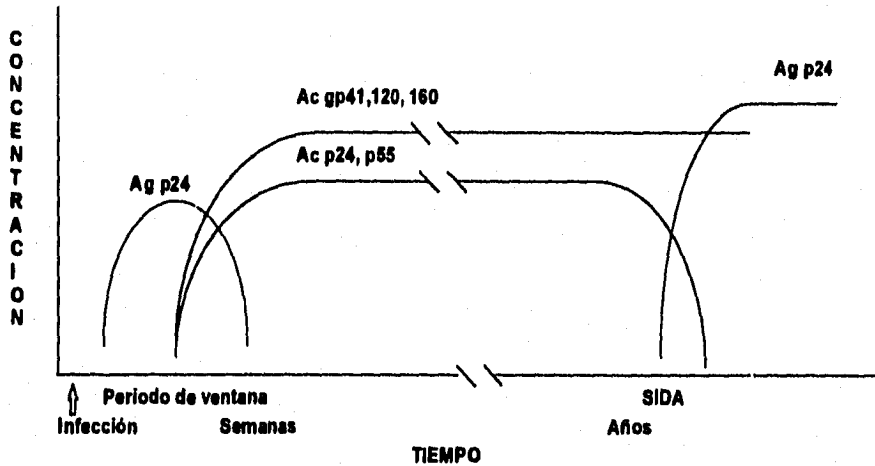


Fig. 3 Respuesta de anticuerpos y antigenemia de p24 durante la infección de VIH. (3)

2.6 HISTORIA NATURAL DE LA ENFERMEDAD

Como respuesta a la infección por VIH se producen anticuerpos, los cuales usualmente aparecen entre seis y doce semanas después del contacto con el virus. Se han encontrado anticuerpos específicos para todas las proteínas virales, tanto estructurales como regulatorias. Se ha observado que los anticuerpos contra p24 disminuyen a medida que progresa la enfermedad, esta disminución al parecer es debida al incremento en la cantidad de virus, que es proporcional a la cantidad de p24 viral circulante como se muestra en la figura 3. (3)

Después de la infección, la aparición del virus en el suero es muy rápida debido a la alta replicación viral, sin embargo disminuye a niveles no detectables y sólo vuelve a ser positivo en los periodos finales de la enfermedad. Con el incremento del antígeno aparecen los primeros síntomas y el SIDA es evidente. (3)

Cuando las pruebas de laboratorio detectan la presencia de los anticuerpos, el nivel de células T_H está próximo al nivel normal de 800 cel/ml, el paciente no muestra ninguna sensación de malestar. Posteriormente en algunos casos se desarrolla una linfadenopatía crónica; después de algunos años se presentan alteraciones inmunitarias que se reflejan en forma de infecciones crónicas en la piel y mucosas a medida que avanza la enfermedad hay infecciones sistémicas generalizadas hasta llegar a desarrollarse cánceres y alteraciones del sistema nervioso central, en estadios terminales de la infección vírica, muchos pacientes sufren el complejo demencial del SIDA, caracterizado por la pérdida gradual de precisión en el pensamiento y en los movimientos. (5)

2.7 DIAGNOSTICO DEL VIH

El VIH puede ser diagnosticado por:

A) Métodos indirectos: en los que se detecta la respuesta inmune del individuo ante la infección; entre estos métodos se encuentran ELISA, RIA, inmunofluorescencia, inmunoaglutinación, Western blot, etc.

B) Métodos directos: son aquellos que detectan al virus o alguno de sus componentes; entre ellos se encuentran aislamiento viral por co-cultivo, detección del genoma viral por amplificación enzimática (PCR) y detección de antígenos virales, principalmente p24. (3)

Uno de los métodos más empleados actualmente en el diagnóstico del VIH es el ELISA, el cual puede ser usado para detectar tanto anticuerpos contra un agente infeccioso, como las proteínas de éste. Existen diversos formatos para un ELISA, aunque todos ellos están basados en la reacción específica entre un antígeno y un anticuerpo, y la detección posterior del complejo antígeno-anticuerpo formado empleando una reacción enzimática que produzca un color.

2.7.1 ELISA INDIRECTO

En este caso la muestra a analizar se adiciona a una fase sólida que contiene al antígeno adherido, se incuba por un tiempo y una temperatura específicos. Si los anticuerpos anti-VIH están presentes en la muestra, se unirán al antígeno. Posteriormente se lava y se adiciona un segundo anticuerpo conjugado con una enzima, se incuba, se lava para remover los anticuerpos no unidos y se adiciona el sustrato de acuerdo a la enzima empleada, lo cual da un color que se determina por absorbancia (fig 4). El valor de la absorbancia o densidad óptica es proporcional a la concentración de sustrato transformado y por lo tanto la presencia de anticuerpos en la muestra problema. (11, 12)

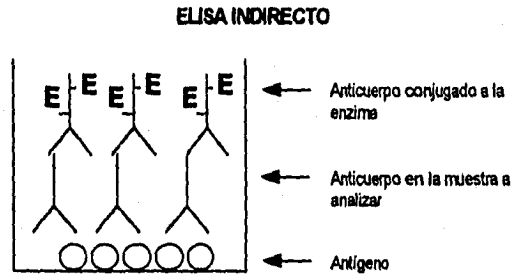


Fig. 4 Fundamento de un ELISA Indirecto. (11)

2.7.2 ELISA DE COMPETENCIA

Este ensayo difiere del directo en que el anticuerpo de la muestra compite con un anticuerpo conjugado (el cual es un anticuerpo que esta dirigido contra el VIH); ambos anticuerpos son adicionados a la fase sólida cubierta con antígeno para competir por la unión con éste, se adiciona un sustrato acorde a la enzima y se determina la absorbancia. (11, 12)

En este caso, la presencia de anticuerpos en la muestra problema producirá una disminución en la cantidad de anticuerpo conjugado que se une al antígeno de la placa y por lo tanto la densidad óptica es inversamente proporcional a la cantidad de anticuerpo. El esquema del ensayo se presenta en la figura 5. Sin embargo, en este ensayo el resultado puede ser afectado por la afinidad de los anticuerpos presentes en la muestra y del anticuerpo marcado a los epítomos correspondientes. (11, 12)

ENSAYO DE COMPETENCIA

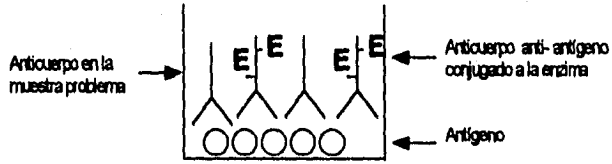


Fig. 5 Fundamento de un ensayo de competencia. (11)

2.7.3 ELISA EN SANDWICH

Es el tipo de ELISA más empleado para detección de antígenos virales. Un anticuerpo específico se une a una fase sólida, se adiciona la muestra en la que quiera determinarse la presencia del antígeno, el cual de estar presente será capturado. Posteriormente se adiciona un segundo anticuerpo contra el antígeno que se quiere detectar, conjugado a una enzima, que detecta al antígeno capturado (fig. 6). Se adiciona el substrato y se determina la absorbancia, el valor de la densidad óptica es directamente proporcional a la concentración del antígeno presente en la muestra. (3, 11, 12)

ELISA EN SANDWICH

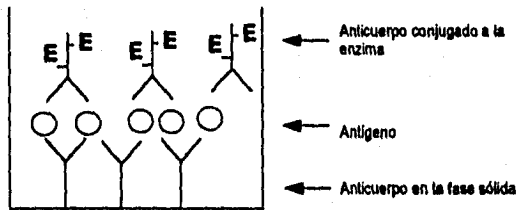


Fig. 6 Fundamento de un ELISA en sandwich. (12)

2.8 PARAMETROS QUE AFECTAN A UN ELISA EN SANDWICH

Existen varios parámetros que pueden afectar un ELISA en sandwich; una primera consideración es la afinidad del anticuerpo hacia la placa. Esta unión está dada por fuerzas de Van der Waals y múltiples fuerzas de enlaces no covalentes (hidrofóbicas), por lo que se considera que la unión es por absorción; en segundo lugar, la concentración del anticuerpo debe ser la adecuada, ya que un exceso produce un fenómeno de eclipsamiento, en el cual un anticuerpo se encuentra sobre otro provocando un ocultamiento de los sitios de unión; sin embargo, si tenemos una cantidad menor del anticuerpo tendremos la posibilidad de no captar adecuadamente al antígeno que se desea detectar. Además, se debe tener en cuenta la clase de anticuerpos que se empleen. Los de clase IgG están constituidos por una sola molécula de inmunoglobulina y son los más usados; otras clases, como IgM o IgA se emplean menos, debido a que en su estructura tienen gran cantidad de carbohidratos (4 a 8% para IgM) y esto provoca un aumento en el fondo del ensayo, siendo además menor la constante de afinidad. (13,14)

Otro parámetro de vital importancia es el uso de un agente que bloquee los espacios libres en la placa. El uso de un buen agente de bloqueo determina en muchos casos que no exista unión inespecífica de otros elementos a la fase sólida. (13, 14)

Otro factor importante lo constituyen los lavados para eliminar los componentes de la muestra que no han reaccionado; los lavados deben realizarse empleando un detergente, en el caso del ELISA, se prefiere el uso de detergentes no iónicos a una concentración tal que formen micelas para eliminar más fácilmente los componentes no reaccionantes. Sin embargo, no sólo es importante el tipo de detergente, sino también el tiempo, la agitación y la temperatura de cada lavado, ya que el exceso en estos parámetros puede provocar una disminución en la solidez de las uniones antígeno-anticuerpo. (15,16)

Es necesario controlar la temperatura en cada uno de los pasos, ya que se pueden desnaturalizar las proteínas tanto del antígeno como del anticuerpo; así como la temperatura de incubación de la cual depende la cinética de reacción. Como se muestra en la figura 7, la reacción a temperatura ambiente es constante, por lo que la interacción antígeno-anticuerpo es mejor. Aunado a esto es indispensable controlar el tiempo de reacción. (13)

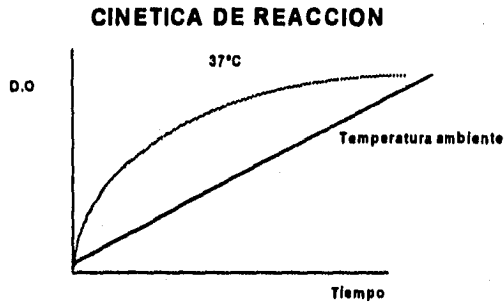


Fig. 7 Esquema de la interacción antígeno-anticuerpo respecto a la temperatura. (13)

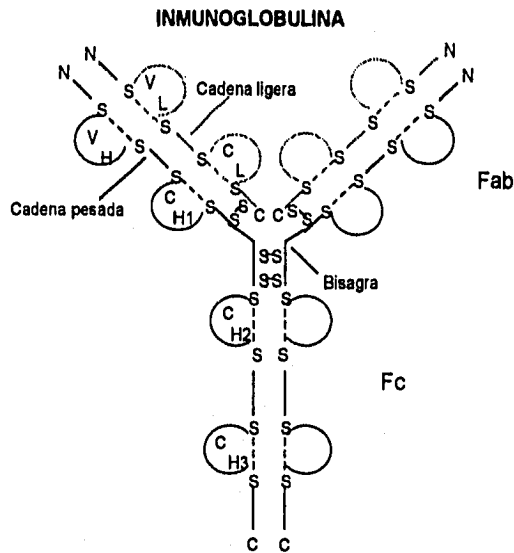
En todo el desarrollo del ensayo deben existir electrolitos que ayuden a la exteriorización de cargas que facilitan las reacciones del antígeno y el anticuerpo, sin embargo la selección de una buena solución amortiguadora debe ser cuidadosa, debido a que el ensayo usa una enzima que es susceptible a cambios de pH, en general el pH óptimo es cercano a 7. (14)

2.9 ANTICUERPOS

Los anticuerpos son moléculas simétricas, la IgG (fig. 8) está formada por dos estructuras glicosiladas conocidas como cadenas pesadas de un peso molecular de 50,000-70,000 daltons, y dos estructuras no glicosiladas llamadas cadenas ligeras con un peso de 25,000 daltons. Las cadenas pesadas están unidas entre sí por enlaces disulfuro, y a su vez están unidas a la cadena ligera por enlaces disulfuro. (9)

La unión entre las cadenas pesadas y ligeras involucra interacciones covalentes, que son las formadas por los puentes disulfuro entre ellas e interacciones no covalentes dadas principalmente por los puentes de hidrógeno. (9)

Cada inmunoglobulina tiene en sus dos cadenas una secuencia de aminoácidos llamada región variable (V), y secuencias más conservadas conocidas como regiones constantes (C). En las regiones variables existen secuencias de una mayor divergencia y son las llamadas zonas hipervariables. En una inmunoglobulina hay tres regiones hipervariables en cada cadena (pesada y ligera) ambas en tres dimensiones forman la superficie de unión con el antígeno. Las regiones variables son también llamadas regiones determinantes o paratopes. (9, 17)



2.10 ANTICUERPOS MONOCLONALES

2.10.1 MIELOMA

Los leucocitos sanguíneos, incluyendo los que participan en los procesos inmunitarios, están sujetos a sufrir transformaciones neoplásicas que producen tumores de las células que secretan anticuerpos a los cuales se conocen como plasmocitos o mielomas. Cuando se transforman las células productoras de anticuerpos (célula plasmática) se producen los mielomas, que es un grupo heterogéneo de enfermedades caracterizadas por la presencia de una inmunoglobulina homogénea en el suero o en la orina que proviene de una sola clona celular, esta proteína se conoce como proteína de mieloma, factor M, paraproteína o inmunoglobulina monoclonal. (17)

En 1959 accidentalmente se descubrió que irradiando el peritoneo de un ratón Balb/c se puede provocar el desarrollo de mielomas, también la administración de aceite mineral es un potente inductor de mielomas en estos ratones. Aproximadamente el 40% de los ratones Balb/c pueden desarrollar mielomas con una serie de tres inyecciones intraperitoneales de aceite mineral durante un año. (17)

2.10.2 PRODUCCION DE ANTICUERPOS MONOCLONALES

Los anticuerpos monoclonales tienen gran importancia en el desarrollo de métodos de diagnóstico, ya sea mediante su uso directo o como reactivos para purificación de moléculas de interés. La tecnología de los anticuerpos se inició a partir de los trabajos de Kohner y Milstein (1975) quienes fueron los primeros en obtener hibridomas. La fusión entre células B productoras de anticuerpos específicos con células de mieloma da por resultado un hibridoma que secreta anticuerpos específicos para un determinado antígeno (fig. 9). Estos anticuerpos son homogéneos ya que son secretados por una clona derivada de una sola célula. La selección de los híbridos resultantes de la fusión mieloma-célula B de las células no fusionadas se realiza por su capacidad de resistir al bloqueo de la aminopterina, esta propiedad se logra utilizando para la fusión mielomas con mutaciones genéticas que los hacen carentes de las enzimas hipoxantina-guanidina-fosforil transferasa (HGPRT) y timidina cinasa (TK), que los inhabilitan para efectuar la ruta alterna para la síntesis de DNA. Así, la célula deficiente necesita sintetizar *de novo* las bases nucleotídicas a partir de compuestos más simples presentes en el medio de cultivo; por lo tanto estos mielomas son muy sensibles a la aminopterina que bloquea la síntesis *de novo* de la hipoxantina y timidina, indispensables para la síntesis de DNA. Después de la fusión celular se agrega un medio básico que contiene hipoxantina, aminopterina y timidina (HAT) donde sobrevivirán únicamente los híbridos que poseen las enzimas HGPRT y TK, propiedad heredada de la célula B, además los híbridos poseen la capacidad de proliferación continua heredada del mieloma, por lo que las células de mieloma no fusionadas morirán ante la aminopterina, en tanto que las células B no fusionadas desaparecerán del cultivo en pocos días. (18)

Una vez efectuada la fusión y la selección, las células híbridas se cultivan y se someten a pruebas para determinar si producen el anticuerpo deseado; si el resultado es positivo, los cultivos se clonan a dilución limitante, es decir, se siembran en los pozos de una microplaca de modo que sólo se encuentre una célula por pozo. (18)

Este es el comienzo de una clona de células derivadas de un único progenitor, que crece continuamente y da lugar a la producción de anticuerpos monoclonales, que pueden servir como reactivos homogéneos y reproducibles. Dado que cada anticuerpo monoclonal reconoce un determinante antigénico único, es posible seleccionar aquel que identifica exclusivamente la molécula de interés, evitando las reacciones cruzadas que son características de muchos antisueros policlonales. De esta forma, las reacciones cruzadas se deberán exclusivamente a la presencia de epítomos (determinantes antigénicos) idénticos o muy similares en el antígeno. (18)

PRODUCCION DE ANTICUERPOS MONOCLONALES

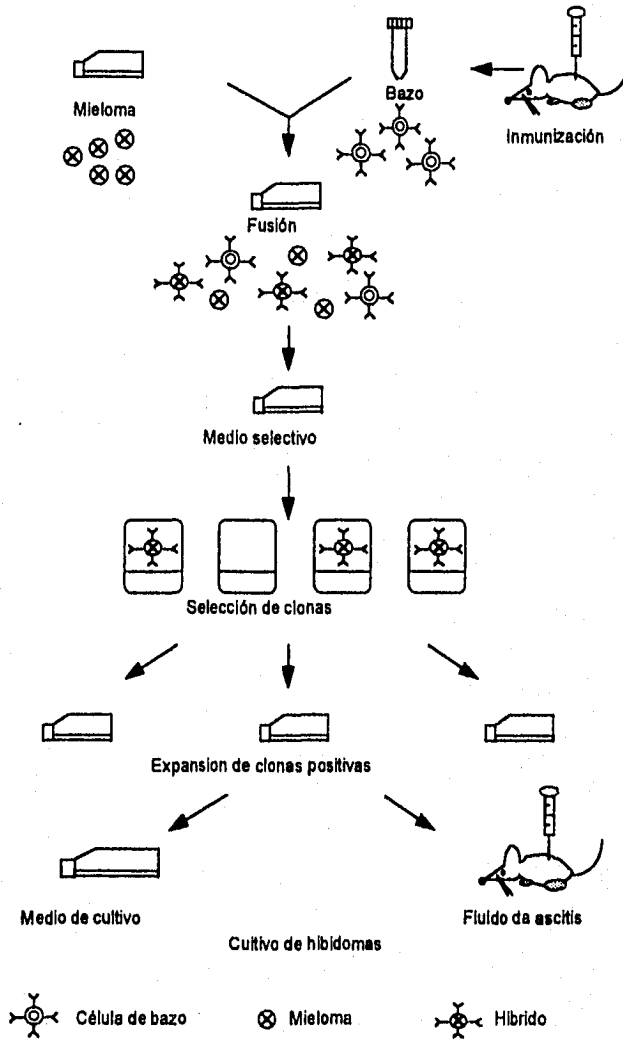


Fig. 9 Diagrama general de obtención de anticuerpos monoclonales. (10)

2.11 PROPAGACION DE HIBRIDOMAS EN FLUIDO DE ASCITIS

La inyección de hibridomas intraperitonealmente en ratones de la misma cepa causa el crecimiento del hibridoma (tumor) dentro del peritoneo del ratón, la velocidad de propagación de las células de hibridoma y la formación de fluido ascítico aumenta con la inyección de adyuvante incompleto de Freund, éste inicia una respuesta inmune, generándose cofactores necesarios para el cultivo de los hibridomas. (17, 18)

Después de 2 a 3 semanas es posible obtener un fluido que se ha formado gracias a la excreción de anticuerpos del hibridoma así como a la presencia de cofactores necesarios. El nivel de anticuerpos encontrado en el fluido ascítico es de 5,000 a 15,000 µg/ml, a diferencia de la cantidad que se obtiene por cultivo en medio que es de 0.1 a 10 µg/ml, por lo tanto se prefiere el cultivo de hibridomas en fluido ascítico para una producción masiva de anticuerpos monoclonales, como se muestra en la figura 9. (17)

2.12 PURIFICACION DE ANTICUERPOS POR EL METODO DE PRECIPITACION CON SULFATO DE AMONIO

El proceso final de la obtención de anticuerpos monoclonales, después de propagar los hibridomas en fluido de ascitis o bien de coleccionar el medio sobrenadante de los cultivos, consiste en purificar los anticuerpos, lo cual puede hacerse por precipitación diferencial de proteínas con sulfato de amonio. (19)

En una solución las proteínas se encuentran formando puentes de hidrógeno con el agua a través de sus grupos iónicos y polares expuestos; al adicionar una alta concentración de sulfato de amonio, los grupos de éste compiten con las proteínas por la unión a las moléculas de agua, así al remover las moléculas de agua con el sulfato de amonio, las proteínas disminuyen su solubilidad resultando una precipitación. (19)

Los factores que pueden afectar la concentración de proteína precipitada, incluyen el número y posición de los grupos polares, el peso molecular de la proteína, el pH de la solución y la temperatura a la cual se lleva a cabo la reacción. (19)

La concentración de sulfato de amonio a la cual los anticuerpos pueden precipitarse, varía de especie a especie, para ratones es de 45 a 55% de saturación, la desventaja de este método es la posibilidad de precipitar otras proteínas diferentes de los anticuerpos que puedan contaminar, para evitar la presencia de proteínas ajenas se precipita dos veces la muestra. (19)

2.13 MARCAJE DE ANTICUERPOS CON PEROXIDASA

Los anticuerpos puros necesitan marcarse para diversos fines. Una enzima muy utilizada en los Inmunoensayos es la peroxidasa. Sin embargo, se pueden emplear otras enzimas como fosfatasa alcalina, catalasa, tirosinasa y lactoperoxidas entre otras. (20)

La molécula de peroxidasa debe ser activada inicialmente a través de su oxidación con periodato de sodio para exponer sus grupos aldehído, los cuales reaccionarán posteriormente con la porción Fc de una inmunoglobulina, la unión da lugar a una base de Schiff que es estabilizada por borohidruro de sodio, finalmente el anticuerpo se dializa con solución amortiguadora de fosfatos para mantener los anticuerpos en condiciones fisiológicas. (20)

3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

En la actualidad el virus de la inmunodeficiencia humana está causando graves problemas en la salud de la población mundial. El número de casos reportados de infección por VIH se ha incrementado en los últimos años y los modelos epidemiológicos sugieren que este aumento continuará a lo largo de esta segunda década de la epidemia, es por ello que la investigación mundial se ha encaminado a encontrar una forma de solucionar este problema.

En México el diagnóstico y la investigación del VIH tienen la necesidad de detectar la partícula viral, sin embargo, los materiales empleados para tales fines se ven limitados por los altos costos de los reactivos. Por lo cual se ha buscado la forma de obtener técnicas que empleen reactivos de bajo costo, con una alta eficiencia de detección.

Existen diferentes formas para determinar la presencia del virus, una de ellas es detectando sus componentes proteicos (antígenos) por medio de un inmunoensayo que utilice anticuerpos adheridos a una superficie para capturar las proteínas del virus y empleando un segundo anticuerpo marcado con una enzima para la detección del complejo antígeno-anticuerpo formado.

Este ensayo se encuentra disponible comercialmente pero su costo es bastante elevado limitando su uso, motivo por lo cual se pensó que el desarrollo de un ELISA no comercial abatirá considerablemente los costos de detección de antígeno, que actualmente se realizan tanto en sueros de pacientes como en sobrenadantes de cultivo virales. Con la técnica desarrollada se permitirá la realización de diferentes protocolos de investigación; como el estudio de la larga sobrevivencia en México, la caracterización del tropismo viral en diferentes tipos y líneas celulares, así como la reacción *in vitro* del sistema inmune en presencia de diferentes virus.

4. OBJETIVOS

1. Construir un mapa de los epítopos de la proteína rp24 reconocidos por un panel de 15 anticuerpos monoclonales anti-rp24.

2. Estandarizar un ELISA de captura de antígeno para detectar rp24 de VIH-1, empleando dichos anticuerpos monoclonales.

2.1 Determinar el (los) anticuerpo(s) monoclonal(es) óptimo(s) para la captura de la cantidad mínima de antígeno en solución.

2.2 Determinar la cantidad óptima de el (los) anticuerpo(s) monoclonal(es) para la detección del complejo de captura.

3. Determinar la cantidad de antígeno detectada por el ensayo desarrollado.

4 Determinar la sensibilidad del ensayo final.

5. HIPOTESIS

Los anticuerpos monoclonales reconocen la proteína viral rp24, si estos anticuerpos se encuentran en la combinación y condiciones adecuadas se obtendrá un ELISA en sandwich óptimo para la captura del virus de la inmunodeficiencia humana.

6. MATERIAL

REACTIVOS

Acido clorhidrico
Acido sulfúrico
Adyuvante incompleto de Freund
Azida de sodio
Deoxiglicolato
Dimetil sulfoxido (DMSO)
Duodecil sulfato de sodio
Fenil metil sulfonil fluoruro (PMSF)
Fosfato dibásico de sodio
Fosfato monobásico de potasio
Hidróxido de sodio
Membrana de nitrocelulosa
Merthioiate
o-ferilendiamina
Placas de 96 pozos, marca Nunc Maxi Sorp,
para ELISA
Periodato de sodio
Peroxidasa de rábano picante
Peróxido de hidrógeno
Sulfato de amonio
Tris hidroximetil amino metano HCl (Tris HCl)
Tritón X100
Tween 20

MATERIAL BIOLÓGICO

Albúmina sérica bovina
Anticuerpos monoclonales contra rp24
Anti-ratón conjugado con peroxidasa
Hibridomas
Medio de Cultivo RPMI 1640
Suero fetal bovino (SFB)
Ratones Balb/c

MATERIAL DE LABORATORIO

Cajas de petri
Estuche de disección
Frascos de cultivo
Matraces erlenmeyer
Pipetas
Probetas

EQUIPO

Campana de flujo laminar
Centrifuga clínica
Incubadora con atmósfera de CO₂
Lector de ELISA
Microscopio
Tanque con nitrógeno líquido
Ultracentrifuga
Ultracongelador
Vortex

SOLUCIONES

Solución amortiguadora de fosfatos salina (PBS)

1000 ml de agua destilada
8 g de cloruro de sodio
0.2 g de cloruro de potasio
1.44 g de fosfato dibásico de sodio
0.24 g de fosfato monobásico de potasio
Ajustar a pH 7.4

Solución amortiguadora de dilución

100 ml PBS
2 g albúmina
2 ml de tween 20
1 ml de methiolate 1×10^{-2} M

Solución amortiguadora de citrofosfatos

500 ml de agua destilada
2.26 g de ácido cítrico
7.65 g de fosfato dibásico de sodio
Ajustar a pH 5.5

Solución para congelar células

RPMI 1640
20% de dimetil sulfóxido
10% de suero fetal bovino

Solución saturada de sulfato de amonio

80g de sulfato de amonio
100 ml de agua destilada

Solución amortiguadora de carbonatos

0.23 g de carbonato de sodio
0.63 g de bicarbonato de sodio
1000 ml de agua destilada
Ajustar a pH 9.5

Solución de bicarbonato de sodio 0.3 M

2.52 g de bicarbonato de sodio
100 ml de agua destilada

Solución de periodato de sodio 0.08 M

1.71 g de periodato de sodio
100 ml de agua destilada

Solución de etilenglicol 0.16 M

0.900 ml de etilenglicol
100 ml de agua destilada

Solución de azul de Tripano

0.4 g de colorante azul de Tripano
100 ml de PBS

7. METODOS

El anticuerpo policlonal de ratón, la proteína rp24 y los hibridomas que producen anticuerpos anti-rp24 se obtuvieron del laboratorio de inmunología que dirige el Dr. Barry Ziola del Departamento de Microbiología de la Universidad de Saskatchewan.

7.1 PRODUCCION DE ANTICUERPOS POLICLONALES DE CONEJO

1. Preliminarmente, corroborar la ubicación del conejo de raza Nueva Zelanda, así como el número de identificación del mismo.
2. Al día 1, extraer una muestra sanguínea de 5 a 15 ml de la vena marginal de la oreja del conejo a inocular.
3. Identificar la muestra como basal y centrifugar a 2000 rpm durante 15 min.
4. Separar el suero basal en alícuotas de 1.5 ml, congelar a -70 °C y mantener en un ultracongelador.
5. Para cada inoculación, preparar antígeno, resuspendiendo 500 µg de proteína viral en 500 µl de PBS.
6. Mezclar 500 µl del antígeno del punto cinco con 500 µl de adyuvante completo de Freund e inocular vía subcutánea en seis puntos diferentes.
7. Al día 7 mezclar 500 µl de antígeno del punto cinco con 500 µl de adyuvante incompleto de Freund e inocular vía intramuscular en un solo punto.
8. Al día 14 extraer una muestra sanguínea de 1 a 2 ml de la vena marginal de la oreja, rotular, centrifugar a 2000 rpm durante 15 min, congelar a -70 °C y mantener en un ultracongelador.
9. Mezclar 500 µl de antígeno del punto cinco con 500 µl de PBS e inocular vía intramuscular en un solo punto.
10. A los días 21, 28 y 35 repetir puntos ocho y nueve.
11. En los sueros de cada sangrado, evaluar la presencia de anticuerpos específicos (anti-VIH) por medio de un Western blot, utilizando el suero basal como control negativo y la proteína viral preparada en el punto cinco como control positivo.
12. Cuando se detecte una banda intensa correspondiente a p24 en el Western blot, anestesiarse al conejo con cloroformo y sangrar a blanco por punción cardíaca.
13. Centrifugar la sangre a 2000 rpm durante 15 min, alícuotar el suero y conservar en congelación a -70 °C en un ultracongelador.
14. Sacrificar al conejo con una sobredosis de cloroformo e incinerarlo.

7.2 OBTENCION DE ANTICUERPOS MONOCLONALES

7.2.1 BAZOTOMIA

1. En dos cajas de petri adicionar 10 ml de medio RPMI 1640 10% SFB.
2. Sacrificar un ratón Balb/c por dislocación cervical, bañar el ratón con etanol al 70%.
3. Hacer una incisión en la superficie de la piel del peritoneo y cortar hasta la pata superior izquierda.
4. Bañar nuevamente con alcohol, cortar la piel que recubre los órganos de forma similar.
5. Extraer el bazo, pasarlo a una caja de petri con 10 ml de medio y transportar a una campana de flujo laminar para trabajar en condiciones estériles.
6. Pasar el bazo a una segunda caja de petri con 10 ml de medio y macerar con el embolo de una jeringa cuidadosamente el órgano hasta obtener un fluido relativamente claro.
7. Pasar las células de la caja a un tubo y centrifugar a 2000 rpm durante 7 min, descartar el sobrenadante y resuspender el botón celular en 10 ml de medio.
8. Centrifugar a 2000 rpm durante 7 min, resuspender en 45 ml de medio, contar las células tiñendo con azul de Tripano 1:10 (ver anexo). Las células pueden ser usadas para expansión o para clonar por dilución limitante.

7.2.2 CLONACION DE CELULAS DE HIBRIDOMA POR DILUCION LIMITANTE

1. Obtener células del bazo de un ratón Balb/c por bazotomía y adicionar 100 μ l (del concentrado con 1×10^6 cel/ml) por pozo a una placa de 96 pozos. Incubar a 37° centígrados.
2. Tomar un frasco de 75 cm² con células de hibridoma confluentes (aproximadamente 1×10^6 cel/ml), transferir las células a un tubo de 15 ml, centrifugar a 2000 rpm durante 7 min, resuspender el botón celular en 1 ml de medio y contar el número de células empleando una dilución 1:10 con azul de Tripano (ver anexo).
3. Ajustar el número de células a 1×10^5 cel/ml, transferir a un segundo tubo 0.1 ml del primero y diluir con 9.9 ml de medio, transferir a un tercer tubo 1.5 ml del segundo y adicionar 13.5 ml, mezclar bien.
4. Adicionar 2 gotas de la última dilución a pozos de una placa de 96 pozos conteniendo células de bazo. El número de células de hibridoma por pozo es de aproximadamente 1 célula.

5. Al día 8, verificar la presencia y crecimiento de las clonas observando con un microscopio óptico la aparición de grupos celulares. Tomar una muestra de 200 μ l del sobrenadante de los pozos que presenten clonas y adicionar una gota de medio RPMI 1640.
6. Correr un ELISA indirecto para determinar el título de cada clona.
7. Al día 10 de cultivo de las clonas, de acuerdo a el título y a la forma de crecimiento de las clonas pasar el contenido del pozo a una placa de 24 pozos.
8. Al día 18 pasar las clonas a un frasco de 25 cm^2 con medio nuevo.
9. Entre los días 21 - 23 pasar a un frasco de 75 cm^2 .
10. Subcultivar las células al día 32. Las células se podrán usar para inoculación de ratones Balb/c y obtener fluido ascítico o para ser almacenadas en medio de congelamiento bajo nitrógeno líquido a menos 230° C.

7.2.3 CONGELAMIENTO DE HIBRIDOMAS

1. Preparar una solución de medio RPMI 1640 con 20 % de DMSO, enfriar la solución y mantenerla a 4° C.
2. Resuspender las células de hibridoma confluentes de un frasco de cultivo de 75 cm^2 y pasarlas a un tubo de 50 ml.
3. Centrifugar a 2000 rpm durante 7 min.
4. Descartar el sobrenadante, resuspender las células en 2.5 ml de medio RPMI 1640 sin DMSO.
5. Agitar y adicionar 2.5 ml de la mezcla del punto 1 gota a gota.
6. La suspensión resultante, que contiene células en medio para congelar, deberá colocarse en criotubos para nitrógeno.
7. Los tubos deberán colocarse en un tanque con nitrógeno líquido, empleando un nivelador de altura.

7.2.4 INOCULACION DE HIBRIDOMAS EN PERITONEO DE RATON BALB/C

1. Al día 1 inocular 5 ratones Balb/c en el peritoneo con 0.4 ml de adyuvante incompleto de Freund.
2. Al día 2 resuspender las células de hibridoma de un frasco con monocapa confluyente de 75 cm^2 , centrifugar las células a 2000 rpm durante 7 min, resuspender en 5 ml de medio RPMI 1640.
3. Inocular intraperitonealmente 1 ml con aproximadamente 1×10^6 células a cada ratón.

4. Observar los ratones al día 10. Los ratones deben de mostrar un aumento en el tamaño del peritoneo; si no es así, se observan cada día hasta un máximo de 14 días.
5. Tomar al ratón y sin anestesia, insertar una aguja en el peritoneo y esperar a que fluya el líquido de ascitis y recolectar en un tubo.
6. Agitar y centrifugar el fluido de ascitis a 2000 rpm durante 10 min, tomar el sobrenadante y guardar a 4° C con 0.1 mM de merthiolate.
7. Al día siguiente de la extracción del fluido de ascitis se puede tomar una segunda muestra de fluido de ascitis; si el ratón muestra reflejos normales, se alimenta y toma agua.
8. Sacrificar al ratón por dislocación cervical e incinerarlo.

7.3 PURIFICACION DE ANTICUERPOS POR PRECIPITACION CON SULFATO DE AMONIO.

1. Tomar 3 ml de fluido ascítico, colocarlo en un tubo de ultra centrifuga, adicionar 2 ml de PBS.
2. Con agitación añadir 4.5 ml de solución saturada de sulfato de amonio gota a gota a 4° C en un tiempo máximo de 2.5 min.
3. Incubar a 4° C por 45 min.
4. Centrifugar a 9500 rpm durante 10 min, descartar el sobrenadante y disolver el precipitado en 7 ml de PBS.
5. Adicionar 6.3 ml de solución saturada de sulfato de amonio a 4°C en un tiempo máximo de 2 min. Incubar a 4°C por 45 min, (la concentración final de saturación es de 47.5%).
6. Centrifugar a 9500 rpm durante 10 min, descartar el sobrenadante y resuspender en 4 ml de PBS.
7. Cortar una membrana de diálisis con tamaño de poro 12,000, lavarla con agua fría 5 min, sellar la membrana por uno de sus lados con un cordón, adicionar la solución con una pipeta, sellar el otro extremo.
8. Dializar contra 4 cambios de solución amortiguadora de carbonatos 10 mM pH 9.5 a 4° C.
9. Recuperar la solución dializada y leer la absorbancia a 280 nm (1 unidad de absorbancia es aproximadamente igual a 0.8 mg/ml). (19)

7.4 CONJUGACION DE ANTICUERPOS CON PEROXIDASA.

1. Disolver 20 mg de peroxidasa en 4 ml de bicarbonato de sodio 0.3 M pH 8.1.
2. Adicionar 4 ml de periodato de sodio 0.08 M.
3. Agitar lentamente por 30 min a temperatura ambiente. La mezcla toma un color amarillo verdoso.
4. Adicionar 4 ml de etilenglicol 0.16 M, agitar por 1 h a temperatura ambiente.
5. Cortar una membrana de diálisis con tamaño de poro 12,000, lavarla con agua fría 5 min, sellar la membrana por uno de sus lados con un cordón, adicionar la solución con una pipeta, sellar el otro extremo.
6. Dializar contra 4 cambios de solución amortiguadora de carbonatos 10 mM pH 9.5 a 4° C.
7. En un tubo colocar el anticuerpo a marcar previamente purificado y la aldehído-peroxidasa (obtenida en el punto 4) en una proporción de 1:4 respectivamente, agitar 2 h a temperatura ambiente.
8. Adicionar un peso igual al de peroxidasa de borohidruro de sodio y mantener en agitación toda la noche.
9. Dializar contra 4 cambios de PBS. Un pequeño precipitado se puede formar por lo que al recuperar la muestra se debe centrifugar a 3000 rpm por 1 min.

7.5 ENSAYO DE TITULACION DE ANTICUERPOS.

1. En una placa de ELISA de 96 pozos colocar 100 µl de solución de PBS conteniendo 120 ng de proteína p24 recombinante (rp24) por pozo, incubar toda la noche a temperatura ambiente.
2. Vaciar el contenido de los pozos y lavar una vez con agua destilada.
3. Hacer una dilución inicial de 1:25 del anticuerpo monoclonal en solución amortiguadora de dilución y diluciones seriadas con un factor de 2 (1:50, 1:100,1:51,200) Adicionar 100 µl de la primera dilución del anticuerpo en el pozo A1, la segunda dilución en el A2, etc. hasta el A12, usar una fila para cada anticuerpo que quiera probarse. De tal manera que pueden probarse hasta 8 anticuerpos diferentes por placa. Incubar 1 h a 37° C. Desechar la solución.
4. Lavar 4 veces con agua destilada, adicionar 100 µl de anti-IgG de ratón marcado con peroxidasa en dilución predeterminada en solución amortiguadora de dilución. Incubar 90 min a 37° C. Desechar la solución.
5. Lavar 4 veces con agua destilada y adicionar 200 µl de o-fenilendiamina (3 mg/ml) en solución amortiguadora de citofosfatos 80 mM pH 5.5, incubar 30 min a temperatura ambiente.
6. Detener la reacción con la adición de 50 µl de HCl 1 N, leer la absorbancia a 492 nm.

7.6 ENSAYO DE TITULACION DE ANTICUERPOS MARCADOS CON PEROXIDASA.

1. En una placa de ELISA de 96 pozos colocar 100 μ l de solución de PBS conteniendo 120 ng de rp24 por pozo. Incubar toda la noche a temperatura ambiente.
2. Vaciar el contenido de los pozos y lavar una vez con agua destilada.
3. Hacer una dilución inicial de 1:100 del anticuerpo monoclonal marcado en solución amortiguadora de dilución y diluciones seriadas con un factor de 2 (1:200, 1:300....204,800). Adicionar 100 μ l de la primera dilución del anticuerpo en el pozo A1, la segunda dilución en el A2, etc. hasta el A12, usar una fila para cada anticuerpo que quiera probarse. De tal manera que pueden probarse hasta 8 anticuerpos diferentes por placa. Incubar 1 h a 37° C. Desechar la solución.
4. Lavar 4 veces con agua destilada y adicionar 200 μ l de o-fenilendiamina (3 mg/ml) en solución amortiguadora de citrofosfatos 80 mM pH 5.5, incubar 30 min a temperatura ambiente.
5. Detener la reacción con la adición de 50 μ l de HCl 1N, leer la absorbancia a 492 nm.

7.7 ENSAYO DE COMPETENCIA

1. En una placa de ELISA de 96 pozos colocar 100 μ l de solución de PBS conteniendo 120 ng de rp24 por pozo, incubar toda la noche a temperatura ambiente.
2. Vaciar el contenido de los pozos y lavar una vez con agua destilada.
3. Hacer una dilución inicial de 1:25 del primer anticuerpo monoclonal en solución amortiguadora de dilución y diluciones seriadas con un factor de 2 (1:50, 1:100....1: 51,200). Adicionar 100 μ l de la primera dilución del anticuerpo en el pozo A1, la segunda dilución en el A2, etc. hasta el A12, usar una fila para cada anticuerpo que quiera probarse. De tal manera que pueden probarse hasta 8 anticuerpos diferentes por placa. Incubar 1 h a 37° C.
4. Adicionar 100 μ l del anticuerpo monoclonal de competencia marcado con peroxidasa en una dilución predeterminada para dar una densidad óptica entre 0.6 y 1.0 sin la presencia del monoclonal de competencia.
5. Mezclar 30 seg e incubar 90 min a 37° C. Desechar la solución.

6. Lavar los pozos 4 veces con agua destilada y adicionar 200 μ l de o-fenilendiamina (3 mg/ml) en solución amortiguadora de citrofosfatos 80 mM pH 5.5, incubar 30 min a temperatura ambiente.
7. Detener la reacción con la adición de 50 μ l de HCl 1N, leer a 492 nm.

La competencia entre dos anticuerpos monoclonales heterólogos hacia el antígeno se define como la inhibición al 50% que ejerce el primer anticuerpo sobre la unión del segundo anticuerpo. Como referencia, esta inhibición sólo es significativa si ocurre a una dilución 8 veces mayor a aquella que resulta en la inhibición del primer anticuerpo sobre si mismo.

Un aumento en la densidad óptica se interpretó como cooperatividad entre anticuerpos. Se consideró débil si la densidad óptica establecida de 0.6 a 1 aumentaba en un 100% y se consideró cooperatividad fuerte si el aumento era mayor a 100%.

Paralelamente al ensayo de competencia se corre un ensayo de titulación de los anticuerpos monoclonales utilizados como se describe anteriormente.

7.8 ELISA EN SANDWICH

1. En una placa de ELISA de 96 pozos colocar 2 μ g del anticuerpo monoclonal que se quiera probar para captura en 200 μ l de PBS. Incubar toda la noche a temperatura ambiente. Desechar la solución.
2. Lavar la placa una vez, adicionar 20 ng de rp24 en 200 μ l de solución amortiguadora de dilución, incubar 90 min a 37° C. Desechar la solución.
3. Lavar 4 veces, adicionar 200 μ l del anticuerpo monoclonal marcado con peroxidasa que se quiera probar diluido 1:25 con diluciones seriadas con un factor de 2 (1:50, 1:100...1: 51,200). en solución amortiguadora de dilución, adicionar la primera dilución del anticuerpo en el pozo A1, la segunda dilución en el A2, etc. hasta el A12, usar una fila para cada anticuerpo que quiera probarse. De tal manera que pueden probarse hasta 8 anticuerpos diferentes por placa. Incubar 90 min a 37° C. Desechar la solución.
4. Lavar los pozos 4 veces con agua destilada y adicionar 200 μ l de o-fenilendiamina (3 mg/ml) en solución amortiguadora de citrofosfatos 80 mM pH 5.5, incubar 30 min a temperatura ambiente.
5. Detener la reacción con la adición de 50 μ l de HCl 1N, leer a 492 nm.

Paralelamente se corre un ensayo de titulación de los anticuerpos marcados utilizados para el ensayo.

Notas:

* En el paso 1 se usó hasta dos anticuerpos para captura del antígeno.

** En el paso 3 se usó hasta tres anticuerpos para detección.

8. RESULTADOS

En el desarrollo de un ELISA es de fundamental importancia contar con un panel de anticuerpos con características bien definidas, así inicialmente los hibridomas se cultivan para la producción de anticuerpos anti rp24, el cultivo es en peritoneo de ratón, el fluido ascítico resultante se purifica por precipitación con sulfato de amonio para eliminar componentes no deseables, los anticuerpos son cuantificados para conocer la concentración proteica y así estandarizar la cantidad de anticuerpo en cada prueba a determinar, finalmente los anticuerpos son marcados con la enzima peroxidasa para poder determinar la presencia del antígeno en una muestra a través de la formación de color después de la reacción con un sustrato. Una forma de conocer el comportamiento de los anticuerpos es por medio de un ensayo de Western blot para determinar el tipo de epítipo que reconoce. Los resultados de la caracterización de anticuerpos se muestra en la tabla 1.

En la primera columna se muestra el anticuerpo, en la segunda se indican los mg de proteína por ml. Para cada anticuerpo monoclonal se partió de 3 ml de fluido ascítico, la concentración de anticuerpos está en relación a la producción de éste en cada clona, en el caso de anticuerpos policlonales de ratón y conejo la purificación se inició del suero. La tercera columna muestra el título con rp24 de cada anticuerpo después de ser marcado con peroxidasa, el título se consideró como la mayor dilución que da un valor entre 0.6 y 1.0 de densidad óptica (DO) en el ensayo (fig 10). En la última columna se muestra la reactividad de cada anticuerpo hacia Western blot, este ensayo permite indirectamente determinar el tipo de epítipos que reconocen los anticuerpos monoclonales, ya que en la tira se encuentra la proteína p24 en forma lineal.

ANTICUERPO PURIFICADO	CONCENTRACION PROTEICA	TITULO AC-HRPO	WESTERN BLOT PARA LA BANDA DE p24
	mg/ml	DILUCION	REACCION
1A	5.700	1:20000	Negativo
1B	5.170	1:400	Negativo
2A	5.730	1:5000	Negativo
2B	5.810	1:10000	Negativo
3A	6.400	1:5000	Negativo
3B	8.200	1:1500	Negativo
3C	6.260	1:1000	Negativo
4	5.300	1:700	Positivo
5A	5.000	1:30000	Negativo
5B	4.410	1:5000	Negativo
5C	7.150	1:2000	Negativo
5D	5.150	1:1000	Negativo
6	3.240	1:1000	Negativo
7	5.280	1:200	Negativo
8	2.750	1:2500	Negativo
Ratón*	3.430	1:800	Positivo
Conejo*	6.170	1:200	Positivo

AC-HRPO: ANTICUERPO MARCADO CON PEROXIDASA
 * ANTICUERPOS POLICLONALES

Tabla 1. Caracterización de anticuerpos monoclonales y policlonales en cuanto a su concentración proteica, título con peroxidasa y reactividad a Western blot.

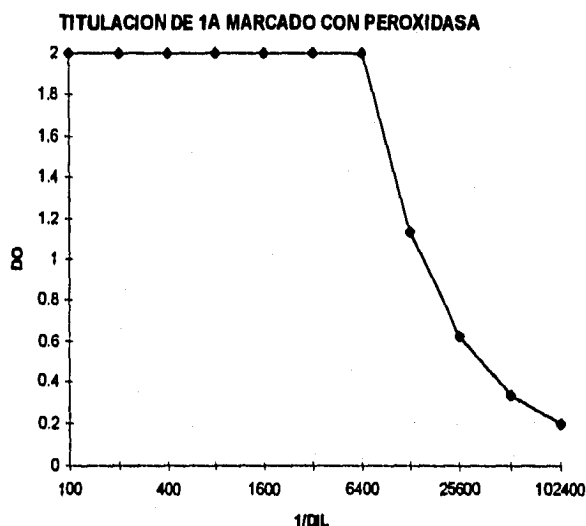


Fig. 10 Ejemplo de una curva de titulación del anticuerpo 1A marcado con peroxidasa. El título se encuentra aproximadamente a una dilución de 1:20,000.

MAPEO DE LOS EPITOPOS QUE RECONOCEN LOS ANTICUERPOS MONOCLONALES.

Es importante determinar el comportamiento de los anticuerpos monoclonales, es decir identificar los epítomos que dichos anticuerpos reconocen y si están dirigidos contra un solo epítomo o contra epítomos diferentes.

Conociendo esta información, podemos desarrollar un ELISA empleando anticuerpos que reaccionen hacia diferentes epítomos para la captura y para la detección de la molécula rp24. Se realizó un mapeo de los epítomos reconocidos por medio de un ensayo de competencia; este ensayo permite determinar si uno o más anticuerpos del panel se unen al mismo sitio del antígeno.

Se emplearon los siguientes criterios para interpretar los resultados obtenidos en el ensayo de competencia:

+ Cooperatividad fuerte: cuando el anticuerpo no marcado aumenta en un 100% o más la absorbancia del anticuerpo marcado enzimáticamente solo.

(+) Cooperatividad débil: cuando el anticuerpo no marcado aumenta la absorbancia entre un 40 y 100% sobre del anticuerpo marcado enzimáticamente solo.

NE No efecto: No hay afinidad entre los sitios de unión de ambos anticuerpos, no se presenta aumento ni disminución en la absorbancia.

- Competencia fuerte: es cuando el anticuerpo no marcado inhibe en un 100% ó más la absorbancia obtenida con el anticuerpo marcado solo.

(-)Competencia débil: es cuando el anticuerpo no marcado inhibe hasta un 50% la absorbancia obtenida con el anticuerpo marcado solo.

Se considera que los anticuerpos que presenten fenómenos de cooperatividad (fuerte o débil) o bien no efecto reconocen epítomos diferentes, mientras que los anticuerpos que en el ensayo de competencia muestren una inhibición reconocen al mismo epítomo. Para el desarrollo del ELISA para detección del antígeno rp24 se emplearon anticuerpos que presentaron cooperatividad. Los anticuerpos que presentaron competencia se descartaron como componentes del ELISA a desarrollar.

La tabla 2 muestra los resultados obtenidos al realizar ensayos de competencia de los distintos anticuerpos monoclonales entre sí.

Los datos obtenidos con el ensayo de competencia pueden usarse para proponer en forma diagramática los epítomos reconocidos por cada anticuerpo y las relaciones que guardan entre ellos. (fig. 11) El esquema es una representación gráfica y no tiene relación con la posible localización de los diferentes epítomos.

Interacciones entre los anticuerpos monoclonales anti rp24

Anticuerpo de captura	Anticuerpo conjugado con peroxidasa														
	1A	1B	2A	2B	3A	3B	3C	4	5A	5B	5C	5D	6	7	8
1A	-	-	NE	NE	-	-	-	-	-	-	-	-	NE	NE	NE
1B	-	-	NE	NE	-	(-)	(-)	-	-	-	-	-	NE	(-)	NE
2A	NE	(+)	-	-	(+)	+	+	NE	NE	(+)	(+)	(+)	+	+	+
2B	NE	(+)	-	-	(+)	+	+	NE	NE	(+)	NE	(+)	NE	(+)	+
3A	NE	NE	NE	NE	-	-	-	NE	(+)	(+)	(+)	+	NE	NE	NE
3B	NE	NE	NE	NE	-	-	-	NE	(+)	(+)	NE	+	NE	NE	NE
3C	(-)	NE	NE	NE	-	-	-	NE	(+)	NE	NE	(+)	NE	NE	NE
4	-	-	NE	NE	NE	-	-	-	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE
5A	-	-	NE	NE	+	(+)	+	NE	-	-	-	-	NE	NE	NE
5B	-	-	NE	NE	+	(+)	(+)	NE	-	-	-	-	NE	NE	NE
5C	-	-	NE	NE	+	(+)	(+)	NE	-	-	-	-	NE	NE	NE
5D	-	-	NE	NE	+	(+)	(+)	NE	-	-	-	-	NE	NE	NE
6	NE	NE	NE	NE	(+)	(+)	(+)	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE
7	NE	NE	NE	NE	(+)	(+)	(+)	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	-
8	NE	NE	NE	NE	(+)	(+)	(+)	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	-

35

NE No competencia o cooperatividad

+ Cooperatividad fuerte

- Competencia fuerte

(-) Competencia débil

(+) Cooperatividad débil

Tabla 2. Comportamiento de anticuerpos monoclonales anti-rp24 dentro de un ensayo de competencia y características de las interacciones entre ellos.

MAPA DE LOS EPITOPOS EN rP24 QUE RECONOCEN ANTICUERPOS MONOCLONALES

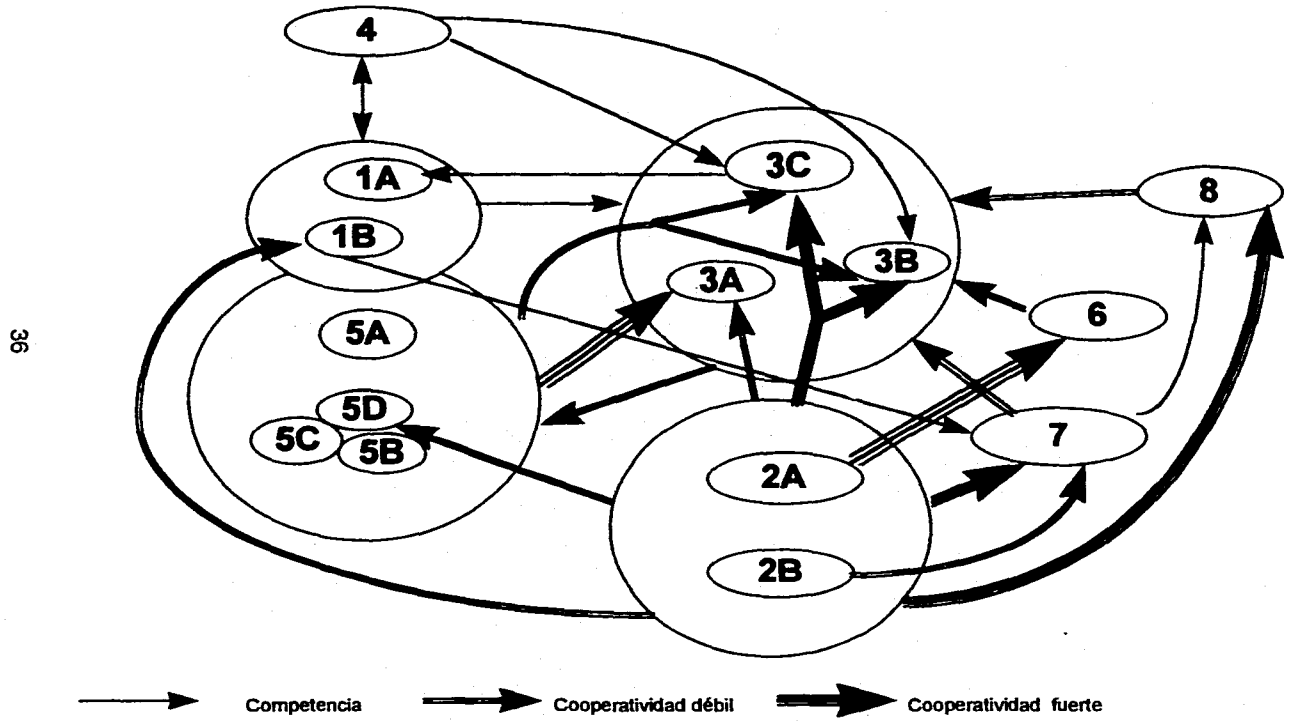


Fig. 11 Mapa de los epítomos que reconocen los 15 anticuerpos monoclonales

El diagrama se construyó asumiendo que los anticuerpos que reconocen el mismo epítipo se comportarán de forma similar frente a los demás anticuerpos. En el diagrama (fig. 11) cada anticuerpo se encuentra representado por un número y una letra encerrados dentro de un óvalo, su cercanía indica la homología entre ellos. Sin embargo, los anticuerpos que se cree reconocen a un mismo epítipo están agrupados dentro de un círculo y por definición estos anticuerpos se inhiben entre sí. Con estas consideraciones se forman 8 grupos de anticuerpos de acuerdo a los sitios de unión: cuatro grupos (1, 2, 3 y 5) formados por más de un anticuerpo y que probablemente se unen a sitios superpuestos; los otros cuatro anticuerpos monoclonales reconocen epítipos independientes (4, 6, 7 y 8).

El comportamiento de los anticuerpos está indicado por las diferentes flechas, su origen indica el efecto que producen estos anticuerpos sobre el o los anticuerpos indicados por la punta de la flecha. Sin embargo, si una flecha se origina dentro de un óvalo, indica que sólo este anticuerpo (no el grupo) tiene efecto sobre el otro; además si la flecha se origina del círculo indica que todos los miembros del grupo afectan a otros anticuerpos.

Las flechas de una línea indican inhibición. Por ejemplo 1B inhibe a 7 y tanto 1B como 1A inhiben a los tres anticuerpos monoclonales del grupo 3. Las flechas de 2 líneas representan cooperatividad débil y las flechas de 3 líneas cooperatividad fuerte. Por ejemplo, el grupo 5 coopera con 3C y 3B débilmente y con 3A del mismo grupo fuertemente.

DETERMINACION DE LA CONCENTRACION DE ANTICUERPOS UNIDOS A LA PLACA PARA LA CAPTURA DE ANTIGENO rp24

Dentro del desarrollo del ensayo fue necesario determinar la cantidad de anticuerpos óptima necesaria para capturar al antígeno, ya que un exceso inhibe la captura adecuada (eclipsamiento entre anticuerpos) y una concentración baja causarí una menor capacidad de captura del antígeno. La figura 12 muestra una gráfica empleando cantidades variables de anticuerpos. La concentración óptima de anticuerpos para captura es 2 $\mu\text{g/pozo}$ ya que da el valor más alto en la densidad óptica.

DETERMINACION DE LA CANTIDAD OPTIMA DE ANTICUERPO PARA CAPTURA

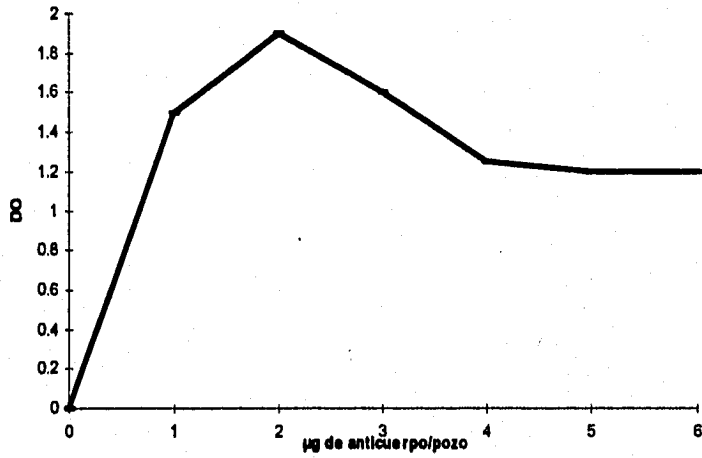


Figura 12 Gráfica de 5C para determinar la cantidad de anticuerpo necesario para la captura del antígeno rp24.

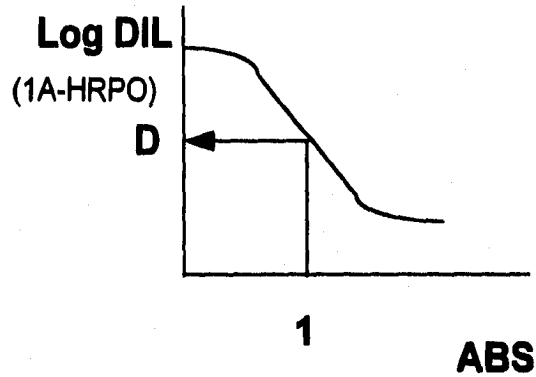
DETERMINACION DE LA CAPACIDAD DE CAPTURA Y DETECCION DE ANTIGENO rp24 POR LOS DIFERENTES ANTICUERPOS MONOCLONALES.

Los anticuerpos monoclonales presentan diferente reactividad hacia el antígeno rp24 dependiendo de la afinidad, el tipo de epítipo que reconocen, la exposición del mismo, y el hecho de encontrarse adheridos a la placa o de reaccionar con un antígeno unido a otro anticuerpo.

Se determinó la captura de rp24 por los diversos monoclonales a través de un ELISA en sandwich, se empleó para tal fin una concentración constante del anticuerpo de captura (predeterminada en la página anterior), y una concentración de antígeno constante; el anticuerpo marcado enzimáticamente para detección se adicionó en diferentes diluciones, así la unión del anticuerpo marcado depende de la presencia del anticuerpo de captura.

Para determinar la capacidad de detección del anticuerpo marcado se determina la dilución en la cual el sistema da una densidad óptica igual a uno, esto se interpreta así: entre más diluido se encuentre el anticuerpo mayor será la capacidad de detección del antígeno. Sin embargo es importante considerar el ruido del ensayo y para este fin se determina la dilución del anticuerpo a densidad óptica igual a uno con el anticuerpo homólogo de captura, finalmente este ruido se divide entre la dilución del anticuerpo heterólogo para determinar la capacidad de unión del anticuerpo en estudio.

Los cálculos se realizaron Interpolando en una gráfica considerando que: 1A, 1B, 2A....etc. son distintos anticuerpos empleados para captura y 1A-HRPO, 1B-HRPO....etc., representan a los distintos anticuerpos conjugados con peroxidasa empleados para detección, se determina primero la dilución (D) del anticuerpo marcado para detectar una absorbancia igual a uno en presencia del anticuerpo homólogo, graficando el logaritmo de la dilución del anticuerpo marcado contra la absorbancia.



$$X = 1A/1A\text{-HRPO}$$

donde X= dilución de 1A-HRPO en presencia del anticuerpo homólogo

En seguida se determina la dilución (Y) del anticuerpo marcado para detectar una absorbancia de 1 en presencia de un anticuerpo heterólogo no marcado.

$$Y = 1C/1A\text{-HRPO}$$

donde Y= dilución de 1A-HRPO en presencia del anticuerpo heterólogo.

La relación Y/X será entonces, en este ejemplo, la capacidad de unión del anticuerpo 1A-HRPO en presencia de 1C.

Los datos obtenidos por el ELISA en sandwich para detectar la capacidad de captura y detección se presentan en la tabla 3, en ésta sólo se indican valores iguales o mayores que 5, ya que los valores menores indican que dicha combinación de anticuerpos no es eficiente para detectar el antígeno rp24 y no se considera para el desarrollo de un ELISA de las características buscadas.

CAPTURA Y DETECCIÓN DE ANTIGENO rp24 POR LOS DIFERENTES ANTICUERPOS MONOCLONALES

Anticuerpo de captura	Anticuerpo conjugado con peroxidasa																
	1A	1B	2A	2B	3A	3B	3C	4	5A	5B	5C	5D	6	7	8	RATON	CONEJO
1A	X	X	2426	199	X	X	X	X	X	X	X	X	14	X	X	X	X
1B	X	X	30	21	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X		
2A	1832	26	X	X	165	80	68	8	711	443	551	224	59	X	23	14	X
2B	418	17	1	X	66	20	17	8	775	116	631	201	23	X	10		
3A	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
3B	X	X	X	9	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
3C	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
4	X	X	5	27	X	X	X	X	7	X	5	X	X	X	X	X	X
5A	X	X	630	179	19	X	X	X	X	X	X	X	5	X	X	X	X
5B	X	X	6	33	8	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
5C	X	X	6747	271	27	X	X	X	X	X	X	X	12	X	X	X	X
5D	X	X	31	151	17	X	X	X	X	X	X	X	4	X	X	X	X
6	X	X	7	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X		
7	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X		
8	X	X	12	X	6	X	5	5	5	X	X	X	X	X	X		
RATON	X	X	X	13	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
CONEJO	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X

41

Tabla 3. Capacidad de captura y detección de rp24 para cada anticuerpo con su homólogo y los heterólogos.
X representa un valor <5.0

DETERMINACION DE LA CAPACIDAD DE CAPTURA DE rp24, COMBINANDO DIFERENTES ANTICUERPOS MONOCLONALES.

Inicialmente se observó que la determinación de rp24 empleando un anticuerpo para captura y otro para detección no es muy eficiente, por esto se propone el uso de más de un anticuerpo para captura y detección.

Para determinar la(s) combinación(es) de anticuerpo(s) de captura y qué combinación(es) de detección es (son) óptimas en un ELISA de sandwich para rp24, se probaron individualmente y en combinaciones por pares o por tríos del panel de anticuerpos disponibles. Estas combinaciones se determinaron en base a los datos de cooperatividad o no efecto entre los anticuerpos.

En la figura 13 se presentan los datos obtenidos por ELISAs en sandwich utilizando las diferentes combinaciones de anticuerpos señaladas. El intervalo de detección se encuentra de 100 a 20,000 pg/ml de rp24. Debe notarse que la mejor combinación es la barra más baja ya que detecta 100 pg/ml.

CAPACIDAD DE DETECCION PARA rp24

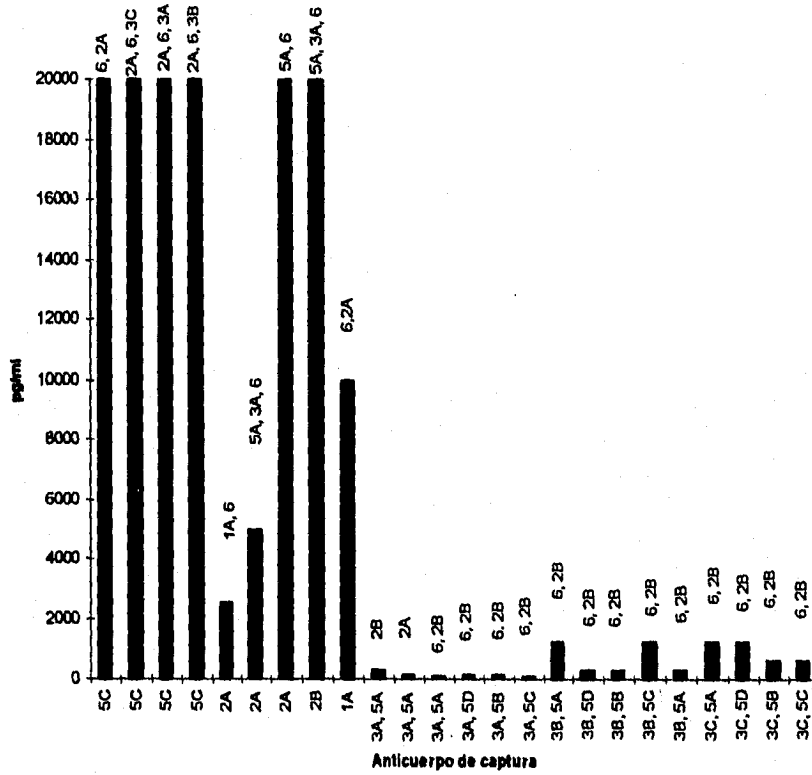


Fig. 13 Combinaciones probadas para detectar rp24. En el eje de las X se encuentran los anticuerpos de captura y en la parte superior de la columna los anticuerpos de detección.

DETERMINACION DEL TITULO DE ANTICUERPOS PARA DETECCION

La combinación de anticuerpos que mejor detecta al antígeno rp24 según los datos presentados en la figura 13 es 3A-5C para captura y 6-HRPO y 2B-HRPO para detección.

Para optimizar el ensayo desarrollado, se realizó un ELISA con diferentes diluciones de los anticuerpos marcados con peroxidasa, con el fin de determinar la concentración óptima de los anticuerpos para detección del antígeno rp24. La figura 14 muestra los valores de densidad óptica obtenidos con distintas diluciones de dos anticuerpos conjugados. Se observa una mejor diferenciación entre muestras positivas y blancos al emplear los anticuerpos a diluciones menores de 1:5,000.

El control positivo es la proteína rp24 y el control negativo es solución amortiguadora de dilución.

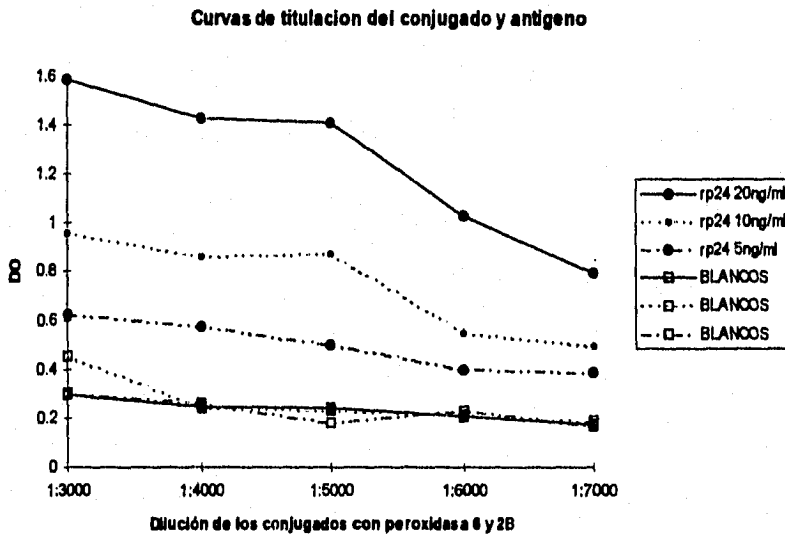


Figura 14. Curva para determinar la concentración óptima para detección de rp24 con los anticuerpos marcados con peroxidasa.

Con la combinación óptima de los anticuerpos 3A-5C en concentración de 2µg/pozo para la captura y los anticuerpos 6-HRPO y 2B-HRPO en dilución 1:5,000 para detección, se realizó una curva estándar, empleando rp24 desde 39 hasta 20,000 pg/ml.

Dentro de este ensayo se determinó la línea de corte que define los valores positivos y negativos dentro del ensayo. La línea de corte se obtiene con el promedio de los controles negativos más dos veces el valor de la desviación estándar de tales valores.

En la figura 15 se representa la curva obtenida para determinar la capacidad mínima de detección de esa combinación para rp24, encontrándose que su nivel mínimo de detección es de 100 pg/ml.

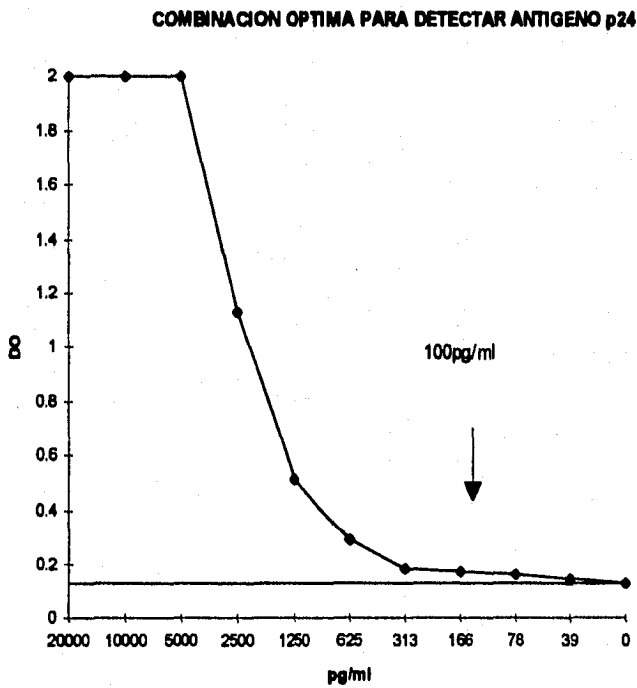


Fig., 15 Curva para determinar el nivel de detección con la combinación de anticuerpos: 3A-5C para captura y 6-2B para detección.

9. DISCUSION DE RESULTADOS

MAPEO DE ANTICUERPOS MONOCLONALES CONTRA p24

Los resultados muestran que el panel de los 15 anticuerpos monoclonales de que se dispone forman grupos que reconocen un total de 8 diferentes epítopos de la molécula de rp24 (Fig. 11). Experimentalmente se observan similitudes entre los anticuerpos que comprenden un mismo grupo así como interacciones de diferente tipo con el resto de los anticuerpos.

Con el fin de mapear los epítopos de la molécula rp24 reconocidos por los 15 anticuerpos monoclonales, se realizó un ensayo de competencia. En el ensayo se observan los siguientes fenómenos:

- 1) El reconocimiento del mismo epítopo de la molécula de rp24 por dos anticuerpos diferentes, dando como resultado una competencia entre ellos debido a que el segundo anticuerpo no puede unirse al antígeno por encontrarse el epítopo ocupado.
- 2) El reconocimiento de epítopos no relacionados, dando como resultado que la presencia de un segundo anticuerpo no afecte los valores obtenidos por el primero.
- 3) Que la unión de un anticuerpo a un epítopo genere un cambio, probablemente conformacional en la molécula de rp24, creando una mayor exposición de otros sitios de unión adyacentes o diferentes que permita una mayor unión del segundo anticuerpo.

Como se mencionó, el fenómeno de cooperatividad puede ser atribuido a cambios conformacionales de la molécula rp24, por lo que se puede pensar que los anticuerpos monoclonales están reconociendo variedades tridimensionales de la proteína. Para reforzar esta hipótesis debemos considerar los resultados obtenidos con el ensayo de Western blot, que demuestran que sólo el anticuerpo 4 reconoce a p24 cuando esta molécula se encuentra en forma desnaturizada, mientras que el resto de los anticuerpos del panel no reaccionan con la proteína cuando ésta se presenta en estructura primaria. Además se observa que el anticuerpo 4 no induce cooperatividad con ningún otro en el ensayo de competencia.

El mapeo de los epítopos de rp24 es de suma importancia para el desarrollo de un ELISA, ya que permite seleccionar los anticuerpos más adecuados evitando fenómenos de inhibición y mejorando así la capacidad para detectar rp24 mediante el uso de anticuerpos que presenten fenómenos de cooperatividad.

Si observamos el mapa de la figura 11, los anticuerpos 2A y 2B son anticuerpos que inducen un fuerte fenómeno de cooperatividad sobre otros anticuerpos, por lo que la inclusión de cualquiera de estos anticuerpos en un ELISA puede resultar en una mejor sensibilidad de éste. Así mismo los grupos 3 y 5 presentan fenómenos de aumento recíprocos; experimentalmente se observó un fenómeno de sinergismo entre los miembros de los dos grupos, por lo que la combinación ellos se consideró para el desarrollo del ensayo.

DESARROLLO DE UN ELISA EN SANDWICH

Uno de los parámetros clave para el desarrollo de un ELISA en sandwich es la concentración de anticuerpos necesaria para la captura. En la fig. 12 se observa que a concentraciones menores de 2µg no existe suficiente anticuerpo en la placa para capturar el máximo posible de antígeno y que a concentraciones mayores ya se presenta un fenómeno de eclipsamiento por exceso de anticuerpo.

Se observó un fenómeno interesante que es el hecho de que no todas las combinaciones que producen cooperatividad en el ensayo de competencia presentan una buena capacidad de detección en el ensayo tipo sandwich, lo cual podría explicarse debido a que en el primer caso rp24 se encuentra unido a la placa, mientras que en el segundo se encuentra en solución lo cual de alguna manera afecta la exposición de distintas regiones de la molécula.

Si se postula que la capacidad de un anticuerpo para detectar rp24, debe producir un valor de densidad óptica mínimo igual a uno en un ensayo tipo sandwich, con un anticuerpo para captura y un anticuerpo marcado con peroxidasa (Tabla 3) se observa que los sueros policlonales de que disponemos no alcanzan dicho valor y por lo tanto se descartó su uso en el desarrollo de este ensayo.

Al analizarse los resultados de los grupos 3 y 5 en la tabla 3, puede apreciarse que la mayoría de los valores se encuentran por debajo de 5, de tal modo que puede considerarse que su capacidad de captura no es buena. Sin embargo, al combinar los integrantes de los grupos 3 y 5 se observa que hay un fenómeno de sinergismo, ya que la capacidad de captura mejora considerablemente a la que presenta cada anticuerpo por separado.

Posteriormente se probaron combinaciones con integrantes de los grupos que no presentan efecto. Los resultados se muestran en la fig. 13 donde se observa que con algunas combinaciones la captura es poco sensible (barras altas) y para otras existe una buena sensibilidad (barras bajas). La barra más baja representa una captura aproximada de 100 ng/ml de rp24 y se obtuvo con la combinación de 5C y 3A unidos a la placa y 2B y 6 conjugados para la detección.

Los anticuerpos para la detección marcados con peroxidasa se titularon para obtener la concentración óptima. Podemos observar en la figura 14 que 1:5,000 es la concentración de anticuerpos en la cual la diferencia entre una muestra con o sin rp24 es mayor, por lo tanto se consideró esa era la dilución adecuada para la detección del antígeno y definir correctamente cuando una muestra es positiva o negativa.

Finalmente, con los datos de la figura 15, se puede concluir que se desarrolló un ELISA que detecta 100-150 pg/ml de rp24 lo cual comparado con un kit comercial que detecta hasta 10 pg/ml ofrece una buena sensibilidad. El ensayo desarrollado cuenta con las características y la calidad suficientes para ser empleado en diagnósticos como en ensayos experimentales.

10. CONCLUSIONES

Se desarrolló un ELISA en sandwich que detecta el antígeno rp24 del VIH con el empleo de anticuerpos monoclonales. El ensayo cuenta con las propiedades de calidad y sensibilidad equivalentes a las de un ensayo comercial para detección de p24.

El discernimiento de los distintos epítomos reconocidos por nuestro panel de 15 anticuerpos monoclonales permitió establecer la interacción entre los anticuerpos al unirse a la molécula de rp24 y con estos datos se determinó la mejor combinación de anticuerpos tanto para captura como para detección del complejo antígeno-anticuerpo formado.

Considerando que la concentración de antígeno rp24 en una muestra es proporcional a la cantidad de virus, se ha desarrollado un ensayo que podría ser útil tanto en investigación como en diagnóstico, ya que cuenta con un nivel de detección de 100 pg/ml.

El desarrollo de un ensayo con parámetros bien definidos en cuanto a sensibilidad y cantidad de muestra que detecta permite la implementación de diversos proyectos de investigación en México, disminuyendo considerablemente los costos de dichos estudios y empleando el mismo tiempo que un ELISA comercial para la realización del ensayo.

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

11. BIBLIOGRAFIA

1. Valdesplno J, et al. (1995) "Epidemiología del SIDA/VIH en México de 1983 a marzo de 1996", *Salud pública de México*, Vol. 37(6):556-569.
2. Folleto CONASIDA (1996) "El Síndrome de Inmunodeficiencia Humana" Ed. Consejo Nacional para la Prevención y Control del SIDA, México.
3. Constantine N et al. (1992) "Retroviral Testing" Ed. CRC press, USA, pp 5-10, 37-46.
4. Sepulveda J, et al. (1989) "SIDA Ciencia y Sociedad en México" Ed. Instituto Nacional de Salud Pública, México, pp. 54-65.
5. Gallo R, et al. (1988) "The Science of AIDS" Ed. Scientific American, USA, pp. 13-27, 63-84.
6. Dalgleish, A, et al. (1984) "The CD4 Antigen is an Essential Component of the Receptor for the AIDS Retrovirus" *Nature*, Vol 312 :763-767.
7. Sattentau Q, et al. (1988) "The CD4 Antigen: Physiological Ligand and HIV-1 Receptor", *Cell*, Vol 52: 631-633.
8. Soler C, et al. (1995) "A 11 Años del Descubrimiento del Virus de la Inmunodeficiencia Humana", *Salud pública de México*, Vol. 37(6):499-506.
9. Abbas A, et al. (1991) "Cellular and Molecular Immunology", Ed. WB: Saunders company, USA, pp. 6-10.
10. Kubi J, et al. (1992) "Immunology", Ed. Freeman and Company, USA, pp. 99-110.
11. Aldovini A, et al. (1990) "Techniques in HIV Research", Ed. Stockton press, USA, pp. 3-6.
12. Wreghitt D, et al. (1990) "ELISA in the Clinical Microbiology" Ed. Public Health, USA, pp. 3-35.
13. Maggio E, et al. (1993) "Enzyme Immunoassay", 6ª ed, Ed. CRC Press, USA, pp.167-178.
14. Williams A, et al. (1967) "Methods in Immunology and Immunochemistry" Vol. 1, Ed. Academic press, London, pp.1-9.
15. Hjelmeland L, et al. (1990) "Solubilization of Native Membrane Proteins" *Methods in enzymology*, Vol 192:253-264.
16. Helenius A, et al. (1979) "Properties of Detergents" *Methods in enzymology*, Vol 56:734-749.
17. Goding J, et al. (1983) "Monoclonal Antibodies: Principles and Practice" Ed. Academic press, INC. London, pp:230-234.
18. Medina Y, et al. (1995) "Manual de Técnicas de Producción de Anticuerpos Monoclonales", INDRE-SSA, México.
19. Harlow E, et al. (1988) "Antibodies a Laboratory Manual" Ed. Cold Spring Harbor Laboratory, USA, pp. 139-150, 196-238.

20. Nakane P, et al. (1974) "Peroxidase-labeled Antibody a New Method of Conjugation" *J. of Histochemistry and cytochemistry*, Vol 22(2):1080-1091.
21. Golub E, et al. (1991) "Immunology a Synthesis", 2^a ed., Ed. Sinauer Associates, USA, pp.21-38.
22. Higgins R, et al. (1986) "Detection and Differentation by Sandwich Enzyme Linked Immunosorbent Assay of Human T-cell Lymphotropic Virus Type III/Lymphadenopathy-Associated Virus and Acquired Immunodeficiency Syndrome-Associated Retrovirus Like Clinical Isolates" *J. Clin. microbiol*, Vol. 40 (3):424-430.
23. Laal S, et al. (1993) "A Rapid Automated Microtiter Assay for Measuring Neutralization of HIV-1" *AIDS Reseach and Human Retrovirus*, Vol. 9 (8):781-785.
24. Sydow M, et al. (1988) "Antigen Detection in Primary HIV Infection" *Britis Medical Journal*, Vol 296 (23):238-430.
25. Toedter J, et al. (1992) "Development of a Monoclonal Antibody-Based p24 Capsid Antigen Detection Assay for HTLV-1, HTLV-2 and STLV-1 Infection", *AIDS Reseach and Human Retrovirus*, Vol. 8 (4):527-532.
26. McRae B, et al. (1991) "Immune Response to HIV p24 Core Protein During the Early Phases of Human Immunodeficiency Virus Infection", *AIDS Reseach and Human Retrovirus*, Vol. 7 (8):626-630.
27. Ascher D, et al. (1992) "Acidification Modified p24 Antigen Capture Assay in HIV Seropositives" *J. Acquired Deficiency Syndromes*, Vol. 5 (11):1080-1083.
28. Lombardi S, et al. (1994) "Detection of Feline Immunodeficiency Virus p24 Antigen and p-24 Specific Antibodies by Monoclonal Antibody Based Assay" *J. Virological. Methods*, Vol. 46:287-301.
29. Burgard M, et al. (1992) "The Use of Viral Culture and p24 Antigen Testing to Diagnose Human Immunodeficiency Virus Infection in Neonates" *The New England Journal Of Medicine*, Vol. 327 (17):1192-1197.

12. ANEXO

CUANTIFICACION DE CELULAS

Para la cuantificación de células viables, se utiliza un hemocitómetro y un colorante vital (azul de Tripano), el cual no es absorbido por las células vivas (exclusión).

1. Limpiar un hemocitómetro (cámara de Neubauer) con etanol y una gasa.
2. Colocar un cubre objetos sobre el área central.
3. Preparar una suspensión de células: En un microtubo colocar 90 μ l de azul de Tripano (0.4 % en PBS filtrado) y adicionar 10 μ l de la suspensión celular, mezclar bien en vortex. No dejar pasar más de 5 min antes de contar las células, ya que las células viables pueden empezar a absorber colorante.
4. Con una micropipeta tocar el borde del cubre objetos y depositar, dejando que se llene por capilaridad una o ambas secciones de la cámara.
5. Contar las células viables (no teñidas) de los cuatro cuadrantes de las esquinas (cada uno tiene 16 cuadros) y obtener el promedio; se deben contar las células que toquen la línea central de la parte superior y al lado izquierdo y no contar las células que toquen la línea central de la parte inferior y de la derecha. Si más de 10% de las células están formando grupos repetir el montaje de la cámara pipeteando vigorosamente para dispersar las células.

CALCULOS.

Cada cuadro del hemocitómetro contiene un volumen de 0.1 mm³ es decir 10⁻⁴ cm³, 1 cm³ es equivalente a 1 ml, por lo tanto:

Nº células por ml = Promedio de células por cuadrante X Factor de dilución X 10⁴.

El factor de dilución depende de la dilución que se haya realizado de la suspensión de células con azul de Tripano. En este ejemplo se uso 10 μ l de suspensión y 90 μ l de colorante, el factor es 10.

ENSAYO DE WESTERN BLOT (WB)

Solución amortiguadora de lavado: PBS con 2 % de Tween 20.

Solución amortiguadora de dilución: Solución amortiguadora de lavado con 1 % de albúmina bovina.

1. Cortar tiras de nitrocelulosa con antígenos del VIH de 3 mm de ancho, numerarlas y colocar las en una charola de WB, teniendo cuidado de que el antígeno quede hacia arriba.
2. Añadir a cada canal 1 ml de amortiguador de dilución.
3. Adicionar 10 μ l de la muestra (anticuerpos monoclonales y policlonales anti-p24) al canal adecuado, usando un control positivo y un control negativo en cada corrida.
4. Cubrir la charola e incubar a 37°C por una hora con agitación.
5. Aspirar el contenido de cada canal en una trampa con desinfectante, lavar las tiras tres veces con amortiguador de lavado, para ello verter el amortiguador sobre los canales, agitar por cinco minutos y tirar el amortiguador.
6. Diluir el anti-ratón o anti-conejo marcado con peroxidasa 1:800 en amortiguador de dilución y añadir 1 ml por cada canal.
7. Cubrir la charola e incubar a 37°C por una hora con agitación.
8. Lavar las tiras tres veces con amortiguador de lavado, para ello verter el amortiguador sobre los canales, agitar por cinco minutos y tirar el amortiguador. Lavar una vez más con PBS solo por cinco minutos, agitando.
9. Preparar el reactivo de revelado (Diaminobenzidina DAB), a una concentración de 0.05 % en PBS.
10. Tirar el PBS del último lavado y añadir peróxido de hidrógeno a la solución de DAB a una concentración de 0.05 %. Esta solución debe usarse antes de 10 min.
11. Añadir 1 ml de esta solución de revelado a cada canal, agitar manualmente y observar la aparición de bandas en el control positivo, cuando aparezcan las bandas en el control (aproximadamente 5 min) tirar la solución y lavar las tiras de 3 a 5 veces con agua destilada para detener la reacción.
12. Secar las tiras de nitrocelulosa sobre papel blotting, cuando estén secas leer y guardar.