

50524
27

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
ZARAGOZA



USO DE ANTICUERPOS MONOCLONALES PARA LA
IDENTIFICACION DE METABOLITOS DE COCAINA,
MARIHUANA, METILENDIOXIMETANFETAMINA

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO
P R E S E N T A :
EMMA CUEVAS DURAN

ASESOR:
Q.F.B. MARGARITA A. ZAVALA CARBALLO

MEXICO, D.F. 2003

1

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.

AGRADECIMIENTOS

A MIS PADRES:

Por darme lo necesario para realizar este sueño, por todo el apoyo que me brindaron y depositar su confianza en mí, GRACIAS

A MIS HERMANOS:

Por brindarme todo su apoyo y depositar su confianza en mí, GRACIAS

MI mas sincero agradecimiento a todas aquellas personas que han colaborado de una u otra forma en la elaboración de este trabajo.

2

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



INSTITUTO NACIONAL
DE SALUD
SECRETARÍA DE SALUD

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES "ZARAGOZA"

JEFATURA DE LA CARRERA DE
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

ASUNTO: ASIGNACIÓN DE SINODALES

ESTIMADOS MAESTROS:

La Dirección de la Facultad de Estudios Superiores "Zaragoza", ha nombrado a ustedes como Sinodales del Examen Profesional del (la) señor (ita):

CUEVAS DURÁN EMMA

para obtener el Título de Químico Farmacéutico Biólogo.

Les agradeceré se sirvan revisar el trabajo escrito intitulado: **Uso de Anticuerpos Monoclonales para la Identificación de Metabolitos de Cocaína, Marihuana, Metilendioximetanfetamina**

Y asistir en la fecha que después se les hará saber al Examen de Recepción Profesional.

PRESIDENTE	Q.F.B. VALENTÍN ISLAS PÉREZ
VOCAL*	Q.F.B. MARGARITA A. ZAVALA CARBALLO
SECRETARIO	Q.F.B. FRANCISCO JAVIER PARADA GARCÍA
SUPLENTE	Q.F.B. ROBERTO CRUZ GONZÁLEZ MELÉNDEZ
SUPLENTE	Q.F.B. YOLANDA FLORES CABRERA

ATENTAMENTE.
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"
México, D.F. a 5 de noviembre de 2002.

Q.F.B. ROBERTO CRUZ GONZÁLEZ MELÉNDEZ
JEFE DE LA CARRERA

JEFATURA DE LA CARRERA
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

c c p. Departamento de Control de Egresados
c c p. Interesado

1
TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

CONTENIDO

	PÁGINA
1. Resumen	5
2. Introducción	6
3. Marco teórico	7
3.1. Capítulo I Problema social de la drogadicción	7
3.2. Capítulo II Farmacología de las drogas (Marihuana, Cocaína y Metilendioximetanfetamina)	15
3.3. Capítulo III Anticuerpos monoclonales	24
3.4. Capítulo IV Fundamento y técnicas de las pruebas orientadoras para determinación de consumo de drogas	71
4. Planteamiento del problema	76
5. Objetivos	76
6. Propuesta de métodos	77
7. Ventajas y desventajas de las técnicas	80
8. Análisis	80
9. Conclusión	81
10. Perspectivas	82
11. Apéndice de soluciones	83
12. Referencias	86

Lista de abreviaturas

AcM	Anticuerpo monoclonal
THC	Tetrahidrocanabinol
GC/MS	Cromatografía de gases acoplado a espectrofotometría de masas
OMS	Organización mundial de la salud
MDA	Metilendioxianfetamina
MDMA	Metilendioximetanfetamina
SNC	Sistema nervioso central
AVT	Área ventral del tegmento
Igs	Inmunoglobulinas
H	Cadena pesada de la inmunoglobulina
L	Cadena ligera de la inmunoglobulina
VL	Dominio variable de la cadena ligera de la inmunoglobulina
CL	Dominio constante de la cadena pesada de la inmunoglobulina
MHC	Sistema mayor de histocompatibilidad
PEG	Polietilenglicol
TK	Timidina Kinasa
HGPRT	Hipoxantina-guanina fosforibosil transferasa
RIA	Radioinmunoensayo
IF	Inmunofluorescencia
ELISA	Inmunoensayo en fase sólida (Enzyme-linked immunosorbent assay)
PVC	Polivinilo
PE	Poliestireno
BSA	Albúmina serica bovina

OPD	Ortofenilendiamina
SFB	Suero fetal bovino
SBN	Suero neonato bovino
SDS	Dodecil sulfato de sodio
PBS	Solución tamponada de sulfatos
FCA	Adyuvante completo de Freund
NAD	Nicotinamida adenin dinucleótido
G6F-DH	Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

1. Resumen

El presente trabajo aborda el problema de la detección de drogas con fines forenses y legales ya que la drogadicción es un problema de tipo social, las drogas de abuso como el cannabis, la metilendioximetanfetamina y la cocaína son sustancias de abuso que alteran la producción normal de neurotransmisores, por lo que en este documento se desarrolla de manera general el problema de la drogadicción; posteriormente se describen algunos aspectos farmacológicos respecto a las drogas antes mencionadas, se expone la técnica inmunoenzimática EMIT, que se usa actualmente en el laboratorio forense; finalmente se propone un método en la cual se plantea la posibilidad de utilizar la técnica de ELISA para el diagnóstico de pacientes consumidores de drogas de abuso, este método ofrece más ventajas, como el que ELISA es más sensible que EMIT la técnica que se utiliza actualmente en los laboratorios forenses, se pueden obtener más económicamente y llevarse a cabo en cualquier tipo de laboratorio, ya que el problema social crece haciéndose necesario abaratar los costos, especialmente cuando escasean los recursos económicos, debiéndose adoptar estrategias para mejorar día a día, cuya aplicación tenga acceso la comunidad en general.

2. Introducción

La producción de AcM involucra la creación de células específicas, repetibles e inagotables que secretan grandes cantidades de AcM, estas se logran por la fusión de dos tipos celulares que tienen características muy especiales mediante el empleo de un desestabilizante de membranas como el polietilenglicol. Dado que cada anticuerpo monoclonal reconoce un determinante antigénico único, es posible seleccionar aquel que identifica la molécula de interés, evitando las reacciones cruzadas que son características de muchos anticuerpos policlonales, de esta forma las reacciones cruzadas inesperadas se deberán exclusivamente a la presencia de epitopos idénticos o muy similares. Los anticuerpos monoclonales (AcM) se emplean en muchos tipos de diagnóstico, como la purificación y caracterización de las moléculas diversas; la tipificación de antígenos de tejido y de grupo sanguíneo; la detección de tóxicos, mutágenos, drogas, de los niveles circundantes de hormonas y otros factores séricos.

La detección de drogas de abuso en fluidos biológicos es incumbencia del personal al servicio del poder judicial, es una tarea difícil y de gran responsabilidad la emisión de resultados y dictámenes, de los cuales dependen en muchos casos la vida y destino de las personas. Para la detección de drogas de abuso se dispone de dos etapas: las pruebas orientadoras (cualitativas) y las pruebas confirmativas (cuantitativas), las primeras son generalmente pruebas de tipo inmunoenzimático que detectan a la droga de manera genérica y las segundas son técnicas de confirmación muy sensibles y de gran especificidad (cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas, GC/MS). Para las pruebas de tipo inmunoenzimático se utilizan EMIT dispositivos de diagnóstico rápido "tipo cassette" o "one-step", y están disponibles como pruebas aisladas (cocaína) o combinados (anfetaminas, metanfetaminas, cocaína, morfina y PCP), sin embargo, existe el inconveniente de que en este tipo de pruebas no se trata de anticuerpos monoclonales, sino de anticuerpos policlonales y anticuerpos monoclonales marcados con enzimas por lo cual no son específicas para un tipo de metabolito, por lo que el presente trabajo monográfico es una propuesta para usar anticuerpos monoclonales utilizando ELISA en lugar de la técnica de EMIT. El uso de ELISA ofrece varias ventajas además de abaratar los costos. El desarrollo de la técnica que se propone permitirá la detección de los metabolitos de drogas de abuso en cualquier fluido biológico que se encuentre (suero, orina, saliva etc) y es más sensible que el EMIT.

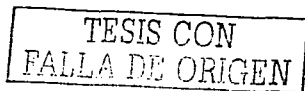
Marco Teórico

3.1. CAPITULO 1 PROBLEMA SOCIAL DE LA DROGADICCION

El abuso de drogas es un problema internacional que afecta a casi todos los países del mundo, tanto desarrollados como en desarrollo, las razones o el porque del *uso médico* de fármacos por el hombre puede parecer sencillo: la prevención o el tratamiento de enfermedades, el porqué del uso no médico (*abuso*) de fármacos es más difícil de determinar, aunque se pueden identificar algunos factores que lo facilitan: la búsqueda de placer, el alivio de la tensión o el estrés, para escapar de una realidad agobiante, por presión social, etcétera, es un problema social grave que no distingue países, grados de desarrollo económico, clases sociales o religiones (1).

Los múltiples problemas de salud e incluso las defunciones asociadas a dicho abuso se deben a una compleja acción combinada entre el fármaco (y sus propiedades farmacéuticas y toxicológicas), el individuo (junto con su personalidad y estado de salud) y el entorno en que se toma la droga, debido a la escasez de datos fidedignos, es difícil determinar con exactitud el costo total que representa para la sociedad cada tipo de abuso de drogas pero, no cabe duda que todos los países del mundo asumen costos considerables provenientes de los daños directos e indirectos que causan las drogas.

La OMS informa que en los últimos años se ha incrementado extraordinariamente y progresivamente el consumo de drogas, cada vez son más las mujeres que fuman y beben y la edad de su inicio es cada vez menor ya que en todo el mundo hay datos de que sigue aumentando el abuso de drogas psicoactivas, sin embargo, dada la naturaleza del fenómeno y debido a las prácticas actuales de acopio de datos, la información de que se dispone es deficiente, con lo cual se subestima la verdadera magnitud del problema, cualquier país puede encontrar graves problemas relacionados con el abuso de drogas, el problema del abuso de drogas abarca no sólo las sustancias ilícitas, sino también las lícitas y las que son objeto de prescripción facultativa, además, como señala la Conferencia de Ministros de Salud sobre el uso indebido, cualquier sustancia que provoque en el hombre euforia, acostumbramiento, hábito, síntomas de dependencia y de abstinencia, puede considerarse toxicomanígeno y la persona sometida a la misma, un toxicómano, el comité de expertos de lo OMS (Organización Mundial de la Salud) recomendó la sustitución de los términos "toxicomanía" y el hábito de las drogas por el de "dependencia" término que ha sido utilizado hasta la actualidad entendiendo como tal "el estado psíquico y a veces físico causado por la interacción entre un organismo vivo y un fármaco, caracterizado por modificaciones en el comportamiento y por otras reacciones que comprenden siempre un impulso irreprimible a tomar el fármaco en forma continua y periódica a fin de experimentar sus efectos psíquicos y a veces evitar el malestar producido por la privación, las drogas son capaces de



producir dependencia, conciliándose aspectos farmacológicos, jurídicos y psiquiátrico, que repercuten grandemente en el aspecto social (2). La dependencia puede ir o no acompañada por la tolerancia, entendida como tal la adaptación del organismo a los efectos de la droga, lo que implica la necesidad de aumentar las dosis para seguir obteniendo resultados de igual magnitud, una misma persona puede ser dependiente de uno o más fármacos y su dependencia puede ser física o psíquica, a una gran variedad de sustancias químicas que actúan sobre el sistema nervioso central, produciendo excitación o depresión, u otra alteración de las funciones psíquicas y trastornos de conducta(2).

Con relación a la población juvenil, se observa un claro declive de ciertos tipos de estupefacientes como los alucinógenos y las sustancias volátiles, así como un ligero descenso en el consumo de heroína, mientras que por el contrario se aprecia un aumento en el consumo de cocaína y de drogas de diseño. los problemas relativos al consumo de drogas han ido evolucionando a lo largo de los años y en este momento nos plantean un panorama sustancialmente distinto del que existía en la década de los 80's.

La extensión del consumo de heroína que se produjo a principios de la década de los 80's constituyó un problema multiforme, con desajustes sociales asociados al consumo y con la subsiguiente alarma social, aumentando la edad de las personas consumidoras y disminuyendo el número de muertes por reacción tóxica aguda, todos estos datos permiten creer que se está conteniendo el uso de heroína, sin embargo, los consumidores continúan necesitando asistencia específica ya que forman una población con abundantes problemas sanitarios, infectada por los virus del SIDA y de hepatitis en una importante proporción, y con serios problemas de desestructuración personal y social, desde hace unos años, diversos datos han puesto de manifiesto un aumento del consumo de cocaína y de otras sustancias estimulantes. Estos consumos parecen haberse instaurado con unos patrones de uso menos lesivos que los que se emplearon con la heroína y, en estos momentos se reflejan en un aumento importante de problemas sociales y sanitarios, creando una condición de riesgo grave(3).

El tratamiento de los casos de abuso de drogas se suelen considerar como la principal respuesta social al problema, sin embargo, en el marco amplio de la prevención, el tratamiento debe ser sólo una pequeña parte de la respuesta de conjunto, el problema de las drogas es en sí de tal magnitud que resulta poco probable llegar a resolverlo con simples servicios especiales de tratamiento, además, el separar el tratamiento de la prevención es erróneo en principio y contraproducente en la práctica; siempre que sea posible se deberán integrar todas las actividades, el tratamiento está también estrechamente relacionado con la localización de casos, el tipo de tratamiento que milagrosamente da a una persona nuevas esperanzas puede resultar totalmente inadecuado para la siguiente persona que se examina.

La prevención de los problemas de drogas se ve complicada por las siguientes razones: 1) las drogas difieren en cuanto a efectos y toxicidad; 2) el consumo habitual puede originar problemas muy diversos y, 3) las modalidades de uso son muy distintas según las sociedades, el abuso es un problema multidimensional, y resulta imposible idear una sola estrategia de prevención aplicable en todos los casos, por ello, es importante estudiar distintos métodos y estrategias para evitar el consumo de drogas según el entorno sociocultural, también deben tomarse en cuenta las propiedades específicas de cada tipo de droga, pese a la diversidad de sustancias utilizadas en todo el mundo, cabe simplificar el problema si se considera que los tipos o familias de drogas son relativamente pocos y que todas las drogas que pertenecen a un mismo tipo tienen características muy parecidas (1).

CANNABIS (MARIHUANA)

El botánico sueco Linneo (Carolus Linnaeus) clasificó la marihuana como *Cannabis sativa*, en 1753, y más recientemente, el etnobotánico R. Schultes distinguió tres especies: *C. sativa*, *C. indica* y *C. ruderalis*.

La historia de la *Cannabis* es interesante, la primera descripción que encontramos de la planta data del 2737 A. C., por el emperador chino (o alguien de su "equipo") Shen Nung, quien prescribía la marihuana para el tratamiento de la gota, la malaria, algunos dolores, y la falta de concentración, por lo que la planta despertaba entre los chinos gran interés, en otra obra china de alrededor de 500 años A. C. se hablaba de la *Cannabis* como "liberadora del pecado". En la India la *Cannabis* tiene también una larga tradición, tanto religiosa como médica, en escritos antiguos describen la ceremonia de la recolección de la resina de las flores (la cual, en forma de pasta, se le conoce como hachís), se han encontrado registros asirios de los años 650 A. C. que describen una droga llamada *azulla* que se utilizaba para fabricar cuerda, ropa y también como euforizante, Galeno también menciona el uso del cañamo en pasteles, y los efectos narcóticos en elevadas cantidades. El origen del nombre *hachís* ha despertado controversia, se cuenta que fue Marco Polo, el célebre explorador y comerciante italiano del siglo XII, quien inició la historia el marino contaba la suerte del legendario Hasan Ibn Sabbah, que aterrorizaba una parte de Arabia con su banda de criminales, realizando robos y asesinatos, se decía que estos hombres trabajaban bajo la influencia de una droga que los hacía más fuertes y valientes, como parte de un culto llamado *hashishiyya*, de donde provendría la palabra hashish o hachís, otros dicen que el término hachís se deriva del nombre de un noble árabe Sheik Hasan, y de sus hombres también célebres por su violencia.(10)

De cualquier manera, no existen pruebas reales de que esto haya sucedido, y se maneja más la hipótesis de que estos hombres consumían hachís después de sus actos, como parte de la celebración.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Las tropas de Napoleón I lo trajeron a Europa después de la conquista de Egipto, y para los años 1840, en Francia e Inglaterra la intelectualidad ya fumaba opio o hachís. En 1844, Alejandro Dumas mencionaba el hachís en su obra *El Conde de Montecristo*, al tiempo que participaba en las reuniones del *Club des Hachichins*, junto con Charles Baudelaire, Théophile Gautier y otros famosos intelectuales de la época, en el año 1850, psiquiatras franceses recomendaban a sus estudiantes el uso del hachís como modelo de alteraciones mentales, y a finales del mismo siglo, los psicólogos hablaban del hachís como una herramienta para amplificar los estados psíquicos y así poder estudiarlos más ampliamente.

Estados Unidos de Norteamérica actualmente se considera como el principal consumidor mundial de *Cannabis* para fines recreativos, se sabe que, hacia 1770, George Washington cultivaba el cáñamo y en algunos estados de la unión americana este cultivo era incluso obligatorio, para proveerse de material para las redes de pesca, en 1857, E H Ludlow publica el primer tratado estadounidense sobre el uso de la *Cannabis*, y Walter Benjamin narra sus experiencias con el hachís entre 1827 y 1834.

COCAÍNA

La cocaína, obtenida de las hojas de *Erythroxylon coca*, ha sido utilizada como estimulante desde hace cientos de años, quizás la huella más antigua de su uso data de los años 500 D. C., en Perú, donde se encontraron bolsas conteniendo hojas de la planta de la coca en una tumba, probablemente como ofrenda para acompañar al muerto en su viaje, a la llegada de los españoles, los incas habían desarrollado una civilización evolucionada que incluía las hojas de coca entre sus valores de intercambio, los españoles incluso adoptaron esta costumbre y pagaban a los esclavos con hojas de coca, a cambio de oro y plata.

A mediados del siglo diecinueve, se extrajo por primera vez la cocaína pura de la hoja de la planta "Eritroxilon", que crece principalmente en Perú y Bolivia, a finales del siglo XIX, un químico corso Angelo Mariani, importaba hacia Europa toneladas de hojas de coca para preparar el entonces célebre Vin Mariani, que contenía un extracto de estas hojas Sigmund Freud recomendaba la cocaína a pacientes, amigos y familiares; Sir Arthur Conan Doyle, en 1890, describía a Sherlock Holmes como usuario habitual de cocaína (¡intravenosa!); y Robert Louis Stevenson escribía en sólo seis días *Doctor Jekyll y Mister Hyde*, probablemente bajo la influencia de la cocaína.

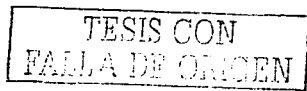
En Estados Unidos, en 1886, el doctor J.C. Pemberton fabricaba un nuevo tónico para los nervios a partir de extractos de dos plantas: las de la coca y del árbol de la cola (o kola), a partir de las hojas de la primera obtenía la coca, y de las semillas de la segunda, cafeína, a principios del siglo veinte, la cocaína se convirtió en el ingrediente principal en la mayoría de los tónicos y elixires que se crearon para tratar numerosas enfermedades, en la actualidad la cocaína es una droga

clasificada bajo la Lista ("Schedule II"), lo que significa que se considera que hay un gran potencial para su abuso, pero que puede ser administrada por un doctor para usos médicos legítimos, o sea, como anestesia local para ciertos tipos de cirugías de los ojos, oídos y garganta, se ha usado la cocaína por vía oral, gingival (encías), nasal, parenteral o por inhalación (fumada), la rapidez de aparición de los efectos y su duración varían inversamente: o sea, mientras más rápidamente aparecen, menos tiempo duran, por vía oral se absorbe lentamente, mientras que cuando es inhalada la cocaína llega en pocos segundos al cerebro, de acuerdo con la vía de administración varía la presentación de la cocaína: desde polvo de clorhidrato hasta pasta o cristales.

La cocaína es un estimulante extremadamente adictivo que afecta directamente al cerebro, la cocaína ha sido llamada la droga de los ochenta y noventa por su gran popularidad y uso durante esas décadas, sin embargo, la cocaína no es una droga nueva, en realidad, es una de las drogas más antiguas, la sustancia química pura, el clorhidrato de cocaína, se ha venido usando por más de 100 años, mientras que las hojas de la cocaína se han ingendo por miles de años, básicamente hay dos formas químicas de la cocaína: el clorhidrato de sal y las cristales de cocaína ("freebase"), el clorhidrato de sal, o la forma en polvo de la cocaína, se disuelve en el agua y cuando se ingiere, puede ser usada en forma intravenosa (en la vena) o intranasal (por la nariz), el "freebase" se refiere a un compuesto que no ha sido neutralizado por ácido para producir clorhidrato de sal, la forma "freebase" de la cocaína se puede fumar, la cocaína usualmente se vende en la calle en forma de un polvo blanco, fino y cristalino que se conoce como "coke" o coca, "C", "snow" (nieve), "flake" (copo) o "blow" (golpe), los traficantes generalmente la mezclan con otras sustancias, tales como maicena, talco y/o azúcar; o con ciertas drogas como la procaina (una anestésico local de composición química parecida); o con otros estimulantes, como las anfetaminas.

METILENDOXIMETANFETAMINA (MDMA)

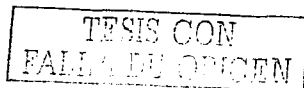
Estas sustancias se sintetizaron por vez primera en 1887, pero sus efectos estimulantes se descubrieron 40 años después, se comenzaron a utilizar en forma de inhaladores nasales como descongestionante y después como estimulantes respiratorios; hacia 1937 se usaban en el tratamiento de la narcolepsia (crisis de sueño incontrolable). Durante la segunda Guerra Mundial se les empleó mucho para combatir la fatiga de los soldados, y en los años 50 se intentó aplicarlas como antidepresivos, de los años 60 a la fecha se han manufacturado ilícitamente millones de dosis de anfetaminas para consumo ilegal, en la actualidad, el uso aceptado de las anfetaminas es para tratar la hiperactividad y trastornos de la atención en niños, la narcolepsia y en algunos casos de obesidad refractaria, este último uso, llamado anorexigénico (supresor del hambre), debe ser reservado para casos patológicos. Hace algunos años se utilizaron mucho las anfetaminas en personas que deseaban bajar de peso, se vio que no sólo era arriesgado -por el peligro de



desarrollar adicción- sino que además se presentaba taquifilaxia (tolerancia de aparición rápida), que hacía que los efectos anorexigénicos desaparecieran rápidamente.(3)

La metilendioximetanfetamina (MDMA), conocida ahora como éxtasis, originalmente fue preparada en 1914 para reducir el apetito y combatir la obesidad, como resultó poco efectiva para ello, se mantuvo en el olvido hasta la década de 1960, cuando se descubrió su capacidad para incidir en los procesos mentales, comenzó a ser utilizada por algunos siquiátras y psicólogos para tratar de ayudar a personas con desórdenes psicológicos y emocionales hasta 1985, cuando se comprobó que al combinar los efectos estimulantes de las anfetaminas con un efecto alucinógeno propio, causaba más daños que beneficios, precisamente esta última propiedad la convirtió en una droga de diseño pues permitió obtener juntos los efectos de algunos estimulantes y alucinógenos en una sustancia que, entonces, era aceptada legalmente, de esta manera surgen muchas de las actuales drogas de diseño: al no existir una prohibición expresa para la sustancia diseñada, se podía explotar e inundar el mercado con drogas "no controladas" en tanto no se modificaran las leyes para incluir a dichas sustancias. Recordemos el principio jurídico que dice que lo que no esta expresamente prohibido, está permitido, así las cosas, al estar prohibida la cocaína y no la MDMA, los yuppies de los años ochenta utilizaban esta última como sustituto de la primera sin infringir la ley, aunque el concepto de droga de síntesis expresamente diseñada para burlar la ley se está eliminando en algunos países y se les empieza a clasificar como compuestos análogos, siguen existiendo lagunas que se aprovechan para comercializar sustancias potencialmente dañinas, así sucede con ciertos productos que se venden en algunas tiendas natunatas y que se promueven como inocuos aduciendo que están hechos exclusivamente a partir de plantas, y en ese camino, se olvida que la heroína y la cocaína provienen precisamente de plantas.(3)

De acuerdo con el Secretario técnico del Consejo Nacional Contra las Adicciones (CONADIC), hay gran incidencia de consumo de drogas en jóvenes cuyas edades fluctúan entre los 6 y los 14 años de edad y se calcula que al menos 500 mil jóvenes mexicanos consumen algún tipo de droga, un estudio realizado por los centros de Integración Juvenil, señala que de 113 muchachos que acudieron a solicitar información, 112 habían probado alguna vez metanfetaminas (como el éxtasis), es una cifra alarmante, sobretodo si se considera que 51% de estos jóvenes consideró que esa droga era la que más impacto tenía en su vida, además, 36.7% la consideró su droga favorita, esto sugiere que al menos la mitad de quienes prueban las anfetaminas se vuelven adictos a alguna droga, y la tercera parte de ellos las siguen consumiendo hasta que buscan ayuda profesional para rehabilitarse, en la misma encuesta las drogas depresoras alcanzaron 68% de consumo alguna vez, aunque menos del 1% la consideraba su droga favorita, en una información preliminar acerca del aseguramiento de drogas durante 2001, la PGR informó que se aseguraron mas de 330 Kg de metanfetaminas, lo que sería suficiente para preparar más de tres millones de



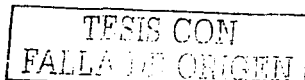
pastillas con dosis individuales, si esto fue lo que se aseguró, imaginemos las cantidades que se distribuyeron en las calles y fiestas.

Por otra parte es interesante analizar la evolución del consumo de este tipo de drogas en nuestro país, en 1988, el 3.33% de la población había probado drogas alguna vez en su vida, cifra que cinco años después, en 1993, se ubica en 3.9%, pero que de manera alarmante subió hasta 5.27%, lo que representa un aumento superior al 58% en sólo 10 años, o del 35% en solamente cinco. A ese ritmo, para el 2003 se alcanzaría una cifra de entre 6.2% y 7.1%.

En el norte del país hay más consumidores que en el sur, y los lugares con mayores índices de consumo son, en orden descendente Tijuana(14.7%), Ciudad Juárez, Guadalajara, Ciudad de México, Monterrey y Matamoros (3.62%), entre menores de edad, consumen más los niños que las niñas y en ambos casos se tiene una diferencia sensible si los menores viven en familia (4.5%) que si ya no lo hacen(28%), los estudiantes consumen menos (1.3%) que aquellos jóvenes que no estudian (4.2%), a nivel del país, esto implica que la deserción escolar (o la falta de oportunidades para continuar estudiando) provoca que el consumo de drogas se triplique, la edad mínima a la que se ha detectado consumo de drogas es de cinco años, pero esos son casos aislados: en donde se dan los patrones repetitivos de consumo es entre los 12 y los 25 años, agravándose entre los 15 y los 18, específicamente hablando de drogas de diseño, se ha detectado que el consumo de metanfetaminas aumentó, en un periodo de tres años (de 1994 a 1997) en más de 15%, mientras que el de depresores de utilidad médica (como el Rohypnol, el Ritalin) aumentó 11% en el mismo periodo.(1)

Es importante hacer señalamientos en dos vertientes: la gubernamental y la personal, en cuanto a la primera, debe destacarse que hay pocos estudios serios acerca del consumo de drogas y sus efectos entre los jóvenes mexicanos. Y, por si fuera poco, la escasa información la hace difícil de localizar, los esfuerzos del gobierno para controlar el tráfico de drogas deben estar ligados a un profundo conocimiento de la situación, mientras se siga contando con información poco actualizada la lucha estará perdida, por otra parte debe considerarse la corriente social que pugna por la legalización de las drogas como único medio de control sanitario y de tráfico.

Los principales criterios para determinar los problemas de salud relacionados con las drogas son la mortalidad entre los usuarios, por comparación con la de la población en general, y la morbilidad, es decir, la permanencia de enfermedades entre los usuarios, por comparación con la que padece la población en general. La mortalidad y la morbilidad se deben considerar como consecuencia de complejas acciones en los que influyen factores muy diversos, como son las propiedades farmacológicas y toxicológicas de la droga o drogas utilizadas, las combinaciones de estas, las disponibilidad de servicios de salud para drogadictos y la utilización de dichos servicios, los hábitos



y el estado nutricional de los usuarios, la vía de administración de las drogas, la calidad de las relaciones y la integración social de los sujetos. La vía de administración de las drogas tiene particular importancia, el uso intravenoso agrava el riesgo, puesto que las agujas y jeringas pueden estar contaminadas, la heroína, la cocaína y las anfetaminas pueden estar adulteradas con aditivos, la mortalidad suplementaria proviene principalmente de sobredosis, de la infección y de reacciones asociadas a la inyección intravenosa, que permite la acción rápida de las sustancias inyectadas y el acceso directo de microorganismos patógenos y adulterantes a la corriente sanguínea, la mortalidad es también más elevada cuando se fuma la cocaína que cuando se inhala en polvo, el riesgo adicional se debe a la rapidez de acción y a la dificultad de controlar la dosis.(6)

En lo que se refiere al ámbito personal, se necesita la plena participación de los consumidores potenciales para que efectivamente se nieguen a convertirse en adictos, precisamente por ello los traficantes enfocan sus baterías hacia los jóvenes, porque son los más susceptibles de aceptarlas, sea como forma de rechazo a lo establecido o como una nueva experiencia, en los centros nocturnos debe exigirse que se sirvan botellas cerradas tanto de bebidas alcohólicas, como de refrescos, y abrirlas en las mesas, no en la barra, y abstenerse de compartir comida, bebida y cigarros con desconocidos.

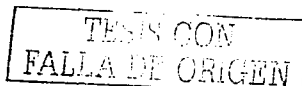
Si bien es remota la posibilidad de que alguien muera después de consumir por primera vez alguna de estas drogas el peligro existe y los efectos secundarios permanentes también, es innegable que la experiencia al consumir una droga puede resultar atractiva; sin embargo el riesgo de caer en la adicción es enorme, con consecuencias graves en la mayoría de los casos, es cierto que la curiosidad y la presión social provocan una predisposición al consumo de drogas, igual que ocurre con el alcohol y el cigarro, pero hay que preguntarse si de verdad vale la pena arriesgarse a dañar de por vida a los riñones, el corazón, el sistema nervioso, la mente; si queremos pagar el precio de vivir una vida incierta muchos años por un momento de "éxtasis", la decisión es, a fin de cuentas, personal, pero afecta muchas vidas en torno a la sociedad.(1)

3.2. CAPITULO II FARMACOLOGÍA DE LAS DROGAS

La metilendioximetanfetamina es una anfetamina que, como todas, actúa sobre el sistema nervioso central, incrementando la cantidad de neurotransmisores (sustancias que transmiten información dentro del cerebro y desde este al resto del cuerpo), entre sus efectos se encuentran el quitar el sueño, producir sensación de euforia y reducir el cansancio a la vez que generan excitación psicomotora, por lo que se les emplea en las fiestas para poder resistir por largo tiempo el ritmo de los bailes actuales, además minimiza las inhibiciones, haciendo al usuario más sociable, aunque no necesariamente más agradable, e intensifica la experiencia sexual, y también es una droga muy peligrosa. La metilendioximetanfetamina elimina la sensación de fatiga y estimula el sistema cardiovascular; como además se consume con calor y haciendo ejercicio, la temperatura corporal se eleva (hipertemia); se presenta sudoración excesiva y al perder líquido el corazón va más deprisa, por lo que inevitablemente provoca un paro cardíaco, todo se conjuga para perjudicar al usuario, porque la temperatura corporal aumenta sin que este lo perciba, lo que podría causar desde deshidratación hasta lesiones cerebrales y renal eso, como hemos visto, la muerte.

Pasado el efecto inicial se presentan síntomas secundarios, que van desde pánico y depresión hasta desecho vehemente de administrarse alguna droga, desde el punto de vista físico, existen riesgos de estado de choque al aumentar de golpe el calor corporal debido a la deshidratación; pérdida de apetito y del sueño, además de persistir las irregularidades del funcionamiento del corazón que mencionábamos.

Las anfetaminas son potentes agonistas catecolaminérgicos: actúan directamente en los receptores membranales de la adrenalina, noradrenalina y serotonina, e inhiben su recaptura por las terminales nerviosas, lo que produce un efecto prolongado a nivel de los receptores, estos efectos ocurren tanto en el SNC como en la periferia, los efectos centrales de las anfetaminas se observan en la corteza cerebral, el tallo cerebral y la formación reticular, al actuar en estas estructuras hay una activación de los mecanismos del despertar, aumento de la concentración mental, mayor actividad motora, disminución de la sensación de fatiga, elevación del estado de ánimo, inhibición del sueño y del hambre, a dosis menores se puede observar lo contrario: un efecto sedante, este efecto es particularmente importante, y de hecho terapéutico, en niños hiperactivos con problemas de atención, a quienes tranquilizan los estimulantes, mientras que los sedantes los estimulan, esta respuesta paradójica a las drogas es parte del síndrome del niño hiperquinético (antes se le llamaba "disfunción cerebral mínima"), estos niños tienen inteligencia normal o incluso superior, pero su aprendizaje es limitado en la escuela por no poder fijar la atención, es decir, se distraen demasiado, hablan y se mueven mucho, cambian frecuentemente de actividad, interrumpen continuamente a sus padres, maestros o a otros niños cuando hablan y juegan, etc. En este tipo de sujetos el empleo de las anfetaminas, o de preferencia, del

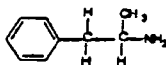


metilfenidato (Ritalin®) tiene efectos benéficos, el tratamiento farmacológico debe acompañarse de psicoterapia y no prolongarse demasiado tiempo, porque estas sustancias interfieren con el crecimiento y desarrollo del niño cuando se administran por periodos prolongados.

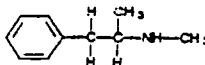
Las propiedades euforizantes de las anfetaminas parecen relacionarse más con los sistemas dopaminérgicos que con los noradrenérgicos, puesto que los bloqueadores de los primeros, como el haloperidol, interfieren con esta sensación, el efecto anorexigénico de las anfetaminas y drogas relacionadas se centra en el hipotálamo, donde se localizan los centros reguladores del hambre y la saciedad, este efecto favoreció el uso de estimulantes para el tratamiento de la obesidad, sobre todo en los años 60, existen aún varios derivados de las anfetaminas cuya publicidad indica que favorece la pérdida de peso; entre ellos encontramos la fenilpropanolamina, el dietilpropión, la fentermina, la fenmetrazina, la fendimetrazina, la fenfluramina, el mazindol, etc.; todas estas drogas son simpaticomiméticas, es decir, semejan los efectos de la estimulación del sistema nervioso simpático, cuyas terminales nerviosas liberan catecolaminas, los efectos adversos de los estimulantes son inquietud, irritabilidad, nerviosismo, euforia, falta de apetito, pérdida de peso, mareo, midriasis (dilatación pupilar), fotofobia (temor de la luz), elevación del azúcar sanguíneo (peligroso en los diabéticos), palpitaciones, taquicardia, aumento de la presión arterial, alteraciones del ritmo cardiaco, angina de pecho (vasoconstricción de las arterias coronarias), irritación gastrointestinal y diarrea, y por supuesto, tolerancia y adicción (véase la Quinta Parte). El uso prolongado de dosis elevadas de anfetaminas se asocia con la aparición de cuadros psicóticos, las anfetaminas se absorben rápidamente desde el sistema gastrointestinal y luego se desactivan en el hígado o se eliminan intactas en la orina, la importancia relativa de estos modos de eliminación depende del pH urinario, la anfetamina se metaboliza hasta convertirse en metabolitos desaminados (ácidos hipúricos y benzoicos) e hidroxilados, la metanfetamina se convierte parcialmente en anfetamina, su metabolito activo principal(1, 14)

La metilendioxi metanfetamina es metabolizada en mayor proporción hasta anfetamina, existen otros metabolitos que son metabolizados en menor proporción como 4-hidroxi anfetamina, 4-hidroxi norefedrina y norefedrina, la conversión hasta estos metabolitos es influenciada por el pH de la orina, en una orina alcalina la conversión a estos compuestos ocurre en mayor cantidad que en una orina ácida.

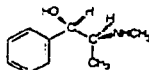
METABOLITOS DE EXCRECIÓN DE LA METILENDIOXIMETANFETAMINA



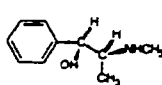
(±)-anfetamina



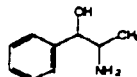
(±)-metanfetamina



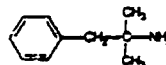
1R,2S(-)-efedrina



,2s-(+)-seudoefedrina



(±)-fenilpropilamina



fentermina

COCAINA

Muchos estudios se han realizado para entender la forma en que la cocaína produce los efectos placenteros y la razón por la que crea la adicción, los científicos han descubierto que cuando se estimulan ciertas regiones del cerebro se produce una sensación de placer, uno de los sistemas neurales que parece ser más afectado por la cocaína se origina en una región muy profunda del cerebro llamada el área ventral del tegmento (AVT), las células nerviosas que se originan en la AVT se extienden a la región del cerebro conocida como "nucleus accumbens", una de las áreas claves del cerebro relacionada con el placer por ejemplo, en estudios con animales, todo lo que produce placer, como el agua, la comida, el sexo y muchas drogas adictivas aumentan la actividad en el "nucleus accumbens".

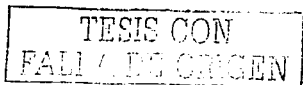
Los investigadores han descubierto que cuando se está realizando un acto de placer, las neuronas en el AVT aumentan la cantidad de secreción de la dopamina en el "nucleus accumbens", en el proceso normal de comunicación, una neurona segrega dopamina dentro de la sinapsis (pequeña abertura entre dos neuronas), donde se liga con proteínas específicas (llamadas receptores de dopamina) en la neurona adyacente y por lo tanto envía una señal a esa neurona, las drogas de abuso pueden interferir con este proceso normal de comunicación, por ejemplo, los científicos han descubierto que la cocaína bloquea la eliminación de la dopamina de la sinapsis lo que causa una acumulación de la misma, esta acumulación de dopamina causa una estimulación continua de las

neuronas receptoras, lo que probablemente produce la euforia que reportan los usuarios de la cocaína.

El abuso continuo de la cocaína a menudo crea la tolerancia, esto significa que el cerebro va a necesitar una dosis cada vez mayor y más frecuente para obtener el mismo placer que cuando comenzó el uso de la droga, de acuerdo con estudios recientes, durante períodos de abstinencia del uso de la cocaína, el recuerdo de la euforia asociado con su uso o solamente referencias a la droga, puede causar el deseo incontrolable de usarla y la reincidencia en el uso de la misma aún después de largos períodos de abstinencia.

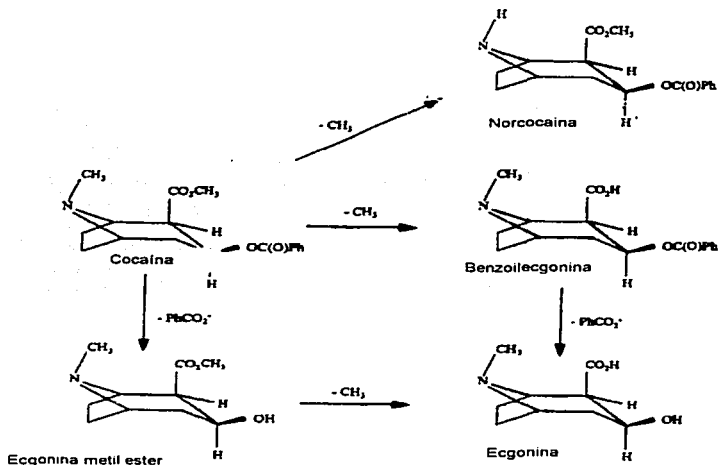
Los efectos de la cocaína se presentan casi inmediatamente después de su uso y desaparecen en cuestión de minutos u horas, los que usan la cocaína en pequeñas cantidades (hasta 100 mg) generalmente se sienten eufóricos, energéticos, conversadores y más alertos mentalmente, particularmente con relación a las sensaciones de la vista, el oído y el tacto, la cocaína también puede disminuir temporalmente los deseos de comer y dormir. Algunos usuarios sienten que la droga los ayuda a realizar algunas tareas físicas e intelectuales más rápido; sin embargo, a otros les produce el efecto opuesto, la forma en que se administra la cocaína determina el tiempo que dura el efecto inmediato de euforia, mientras más rápida es la absorción, más intenso es el "high", pero también, cuanto más rápida sea la absorción, menor es el tiempo que dura el efecto de la droga, el "high" que produce la inhalación se demora en presentarse y puede durar de 15 a 30 minutos, mientras que el que se obtiene fumando, puede durar de 5 a 10 minutos, los efectos fisiológicos de corto plazo que produce la cocaína son: contracción de los vasos sanguíneos, dilatación de las pupilas, y aumento en la temperatura corporal, en el ritmo cardíaco y en la tensión arterial, si se usan cantidades mayores (varios cientos de miligramos o más) se intensifica el "high" del usuario, pero también puede llevar a un comportamiento más extravagante, errático y violento, estos usuarios pueden experimentar temores, vértigos, espasmos musculares, paranoia y, con dosis consecutivas, una reacción tóxica muy similar al envenenamiento por anfetamina, algunos usuarios reportan que se sienten intranquilos, irritables y sufren de ansiedad, en algunas ocasiones raras, la muerte súbita puede ocurrir cuando se usa la cocaína por primera vez o subsecuentemente sin avisar, las muertes ocasionadas por la cocaína suelen ser ocasionadas por paros cardíacos o por convulsiones seguidas por un paro respiratorio(7).

Además de la toxicidad ligada al abuso de cocaína (incluyendo la necrosis del tabique nasal en inhaladores, con hemorragias graves, por la constante vasoconstricción catecolaminérgica producida por el alcaloide), se han reportado crisis de hipertensión arterial y falla cardíaca en sujetos susceptibles, además de los síntomas relacionados con ellas, la cocaína se absorbe rápidamente, especialmente si se fuma. Los patrones de velocidad de excreción varían con el modo de administración y de una persona a otra, la cocaína se metaboliza casi completamente,



principalmente en el hígado; solo el 1% se excreta intacta en la orina, la mayoría de la cocaína se elimina en forma de benzoilecgonina, que es el metabolito principal de la cocaína, también se excreta en una menor proporción en forma de ecgonina y su éster metílico. Los metabolitos son detectables en la orina hasta dos días después de usar la droga, la benzoilecgonina puede detectarse en la orina cuatro horas después de la inhalación de la cocaína, y permanece detectable en concentraciones superiores a los 1000 ng/mL durante 48 horas (3-6).

METABOLITOS DE LA COCAÍNA



MARIHUANA

Es la droga ilegal de uso más frecuente en nuestro medio, que abarca todos los estratos sociales, su consumo ha despertado todo tipo de polémicas, desde políticas hasta filosóficas, pasando por la moral y la religión, la "hierba" se ha estigmatizado o divinizado, de acuerdo con la época y las circunstancias, y sigue despertando ardientes discusiones. Independientemente de estos hechos,

el hallazgo reciente de un receptor cerebral que se combina en forma específica con uno de los principios activos de la marihuana, así como el aislamiento e identificación de una molécula endógena que interactúa con este receptor, harán que nuestra concepción sobre el funcionamiento cerebral se enriquezca considerablemente

En lo relativo a la química de la *Cannabis*, se han identificado más de 400 sustancias sintetizadas por la planta, de las cuales más de 60 son cannabinoides, los tres más abundantes son el canabinol, el canabidiol y varios derivados del tetrahidrocanabinol (THC), que representa el compuesto más activo desde el punto de vista psíquico; la combustión de la *Cannabis* produce varios cientos de compuestos adicionales, algunos de ellos iguales a los producidos por la combustión del tabaco.

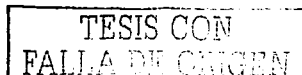
Fumado, el THC se absorbe rápidamente hacia la sangre, desde donde llega al cerebro y de allí al resto del organismo, las concentraciones plasmáticas máximas se alcanzan entre siete y 10 minutos, tiempo en el que los efectos cardiovasculares y psíquicos también aparecen, los efectos subjetivos rara vez duran más de dos a tres horas, la vida media del THC es de aproximadamente 19 horas, esta elevada, persistencia del THC se debe a su gran solubilidad en las grasas, con la consecuente tendencia a acumularse en el tejido adiposo del cuerpo, para después liberarse lentamente, esto hace difícil relacionar las alteraciones psíquicas causadas por *Cannabis*, con su presencia en los tejidos corporales, por ello, no se cuenta todavía con un método confiable para determinar fácilmente un estado de intoxicación, a menos que se cuantifiquen los niveles de THC y éstos se muestren elevados.

Utilizando experimentalmente THC puro se ha podido establecer una relación dosis-efecto en sujetos no habituados: la dosis umbral para inducir euforia discreta es de 2 mg cuando se fuma, y 5 mg cuando se ingiere; 7 mg fumados y 17mg tomados producen cambios en la percepción y en el sentido del tiempo, y una dosis de 15 mg fumados o 25 mg ingeridos, produce cambios marcados en la imagen corporal, distorsiones perceptuales, incoordinación muscular, ilusiones y hasta alucinaciones, la memoria a corto plazo se halla alterada y la capacidad para realizar tareas que requieren estados mentales múltiples o secuencias precisas de movimientos se deteriora, el balance y el equilibrio también se alteran, particularmente con los ojos cerrados, y estos efectos de incoordinación entre procesos de percepción, atención y procesamiento de la información pueden ser potencialmente peligrosos en conductores o pilotos, estos efectos de deterioro en sujetos que manejan automotores o máquinas han sido confirmados: a un grupo de 59 sujetos a los que se les permitió fumar marihuana hasta "ponerse como querían", se les practicaron pruebas de sobriedad en carreteras a cargo de oficiales de la patrulla de caminos: 94% de los sujetos no pasaron estas pruebas practicadas 90 minutos después de la intoxicación, y el 60% las reprobó a los 150 minutos de la administración, estos resultados deletéreos son mucho más importantes cuando se combinan con alcohol.

Los fumadores de marihuana reportan frecuentemente más apetito, sequedad de la boca y garganta, aumento de la frecuencia cardiaca, enrojecimiento de los ojos y mayor agudeza sensorial ("todo se siente más fuerte, más intenso"), los efectos subjetivos de la *Cannabis* son diferentes según se trate de un sujeto experimentado o de uno que no la ha probado. Se han hecho experimentos interesantes comparando ambos tipos de poblaciones, utilizando cigarros de marihuana conteniendo o no THC y otros cannabinoles, la combustión de ambos tipos de cigarros producía el mismo olor y sabor.

Los sujetos experimentados reportaban efectos subjetivos con el placebo mucho más frecuentemente que los sujetos no experimentados, al tiempo que referían menor intensidad de los efectos que los otros, esto quiere decir, por una parte, que existe un aprendizaje de los efectos de la *Cannabis* y que éste puede conducir a la evocación del estado producido por la planta aun en ausencia de ella; paradójicamente, también significa que los sujetos habituados muestran cierta tolerancia a los efectos de la *Cannabis*, es una observación frecuente la ausencia de efectos agradables en las personas que consumen *Cannabis* por primera vez, aun en el caso de fumadores de tabaco: el sujeto tiene que aprender a retener el humo, a identificar los efectos y a controlarlos y, finalmente, a interpretarlos como placenteros, en el sujeto experimentado los efectos son bastante estereotipados y pueden distinguirse varias fases, las formas de describirlas pueden variar significativamente, pues son estados subjetivos; las dosis elevadas de THC pueden producir estados tóxicos severos, con sentimientos de pánico y paranoia, de despersonalización y angustia extrema, tanto en sujetos experimentados como en los no habituados, estos estados de psicosis tóxica pueden ser más frecuentes en enfermos psiquiátricos, particularmente en esquizofrénicos, aunque se encuentren en fase estable.

Los estudios toxicológicos realizados hasta la fecha han confirmado las conclusiones de un reporte que data de 1944, preparado por la Academia de Ciencias de Nueva York, a solicitud del alcalde Vincent LaGuardia y basado en estudios de la Armada estadounidense después de análisis realizados entre sus soldados estacionados en Panamá, en 1930: Se encontró que la marihuana, a dosis efectivas, interfiere con el funcionamiento intelectual en general, la marihuana no cambia la estructura básica de la personalidad del individuo, sino que produce una sensación de auto confianza, pero expresada más en el pensamiento que en la acción, de hecho, existen pruebas de la disminución de la actividad física, aquellos que han fumado marihuana durante años no muestran deterioro físico o mental que pueda ser atribuido a la droga, también se ha mencionado un efecto negativo sobre el aparato inmunológico (disminución de la respuesta inmune) y sobre el sistema endocrino, y en madres que fumaron *Cannabis* durante el embarazo, todos ellos deben confirmarse con estudios comparativos de poblaciones, integradas por sujetos comparables.



Se ha hablado también de daño cerebral y de locura producidos por la *Cannabis*, a pesar de que se han encontrado pruebas del primero en animales (daño celular del hipocampo), éste no se ha confirmado en seres humanos, la insanidad adjudicada al uso de la marihuana ha sido injustificada, por lo que es preciso mencionar que en las condiciones habituales en las que se estudia a estos sujetos, se vuelve muy difícil distinguir los efectos de la marihuana de los del alcohol, los tranquilizantes, los solventes orgánicos y de otras drogas consumidas en forma crónica, aunadas además a condiciones de desnutrición y enfermedad, las cuales coexisten en la población vulnerable.

Otro problema ligado al uso crónico de marihuana que ha recibido mejor confirmación es el llamado síndrome amotivacional, este se ha descrito como un cuadro de apatía, aburrimiento, alteraciones del juicio, la concentración y la memoria, pérdida del interés para relacionarse con otras personas o para lograr una superación personal, en este síndrome se ha incluido también el desgano en general y la falta de cuidado en la apariencia personal, este síndrome se ha detectado en fumadores crónicos de altas dosis de marihuana y parece vinculado más a las concentraciones elevadas de THC en la sangre, las cuales persisten hasta varias semanas después de interrumpir la administración, que a la presencia de daño orgánico cerebral irreversible, pues los síntomas desaparecen eventualmente, después de un buen periodo de "lavado".

Se han buscado huellas de este daño cerebral en monos sujetos a intoxicación crónica con humo de *Cannabis* (administrado a través de una máscara), y divididos en tres grupos: uno que recibía una dosis de un cigarrillo diario, otros que sólo recibían la droga durante los fines de semana y otros que recibían el humo diariamente pero de cigarrillos de los que se había extraído el THC, el estudio duró un año, a estos monos se les entrenó para oprimir un botón a cambio de recibir pastillas de comida con sabor a plátano. Se siguió el método, llamado de reforzamiento progresivo, en el que el animal empezaba oprimiendo el botón una vez para obtener una pastilla, después dos para obtener dos pastillas, después tres veces para obtener tres pastillas, y así sucesivamente, de esta manera era sencillo cuantificar qué tanto trabajaba el animal, después de algunas semanas de intoxicación diaria, los monos empezaron a recibir menos pastillas de comida, efecto que persistió durante varios días después de haber suspendido la administración, el examen *postmortem* no reveló daños permanentes a nivel estructural o neuroquímico.

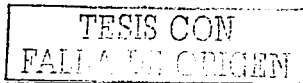
El reporte LaGuardia antes mencionado, a pesar de que hayan pasado 50 años, sigue provocando controversia, particularmente sobre si la marihuana conduce o no al abuso de otras drogas o si produce o no adicción, tanto en animales como en seres humanos se ha visto la aparición de tolerancia (los efectos de la droga se vuelven menos intensos con la administración repetida), taquicardia, disminución de la temperatura corporal y de la presión intraocular, cambios electroencefalográficos, efectos sobre el estado de ánimo y alteraciones psicomotoras, también se

ha observado síndrome de abstinencia en sujetos habituados a consumir dosis elevadas de THC durante largo tiempo, este consiste en irritabilidad, inquietud, nerviosismo, pérdida del apetito, pérdida de peso, insomnio, temblor y aumento de la temperatura corporal, en general, este síndrome es relativamente discreto, comienza algunas horas después de haber suspendido la administración y dura de cuatro a cinco días, no se ha aclarado la relación del síndrome con la conducta de búsqueda de la autoadministración de marihuana, el mecanismo de acción del THC comienza a aclararse se ha mostrado la existencia de una sustancia que se encuentra normalmente en el cerebro y que se combina en forma específica con el receptor del THC, a este "ligando endógeno se le denominó *anandamida*, palabra que proviene del sánscrito y que significa "bendición interior".

Los usos terapéuticos de la marihuana, el THC, o drogas relacionadas, se encuentra actualmente en investigación, una de las aplicaciones más prometedoras es para el control de la náusea y el vómito que acompañan frecuentemente la administración de drogas anticancerígenos, además del efecto antiemético, la THC parece estimular el apetito, pues se ha observado aumento de peso en estos pacientes, también se ha ensayado la *Cannabis* en el tratamiento del glaucoma (aumento de la presión intraocular que puede provocar la destrucción del nervio óptico y ceguera), con resultados interesantes, particularmente cuando se le utiliza como suplemento de otros fármacos.

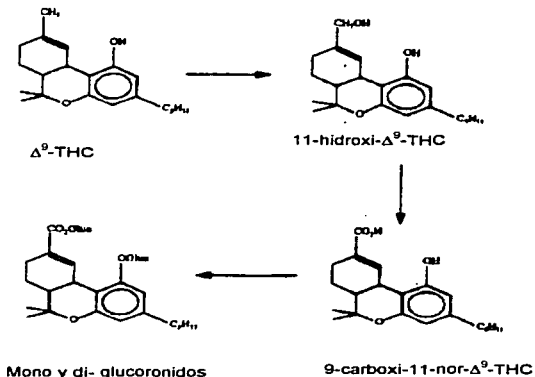
Otros usos médicos posibles de la marihuana incluyen la disminución de la espasticidad (aumento del tono muscular y de los reflejos osteotendinosos) en parapléjicos y pacientes con esclerosis múltiple, en el tratamiento de la depresión, del dolor, del alcoholismo y de la dependencia física, tanto la *Cannabis* como un derivado sintético, el *synhexyl*, se han usado con cierto éxito en Inglaterra para el tratamiento de algunos tipos de depresión. En África del Sur, algunas mujeres fuman *Cannabis* para disminuir el dolor del parto, en el laboratorio se ha observado que la *Cannabis* y algunos derivados han mostrado propiedades antiepilépticas, pero también -de acuerdo con el modelo experimental utilizado- convulsivas, es probable que se puedan encontrar derivados útiles del THC para diversos trastornos como los mencionados anteriormente, un factor necesario a identificar es si éstos producirán o no la tolerancia que se observa con la *Cannabis*; hecho que podría limitar su uso en pacientes crónicos.

El canabinoide Δ^9 -tetrahidrocanabinol (Δ^9 THC) es el ingrediente sí coactivo principal de la marihuana y el hachís, el compuesto Δ^9 THC, es absorbido rápida y eficazmente por inhalación o desde el sistema gastrointestinal (2), y es metabolizado casi completamente por las enzimas hepáticas (3), las concentraciones plasmáticas máximas de Δ^9 THC ocurren dentro de los 10 minutos después de la inhalación, y aproximadamente 1 hora después de la ingestión (2), la excreción de metabolitos urinarios y por la excreción vía fecal comienza dentro de las 72 horas de la exposición (2, 3), las concentraciones dependen de la cantidad total de THC absorbido, la



frecuencia del abuso, la velocidad de su liberación de los tejidos adiposos, y del momento cuando se obtenga la muestra en relación al uso, en los usuarios crónicos, el THC puede acumularse en los tejidos adiposos más rápidamente de lo que puede eliminarse, en consecuencia, puede detectarse en el análisis de la orina de los usuarios crónicos durante un tiempo más largo que en la orina de los usuarios ocasionales (4).

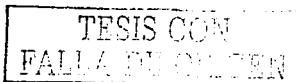
METABOLITOS DE MARIHUANA



3.3. CAPITULO III ANTICUERPOS MONOCLONALES

La tecnología de generación de células secretoras de anticuerpos monoclonales (AcM), desarrollada a partir del reporte original de Köhler y Milstein en 1975, ha revolucionado nuestras posibilidades de uso de las inmunoglobulinas en la investigación básica, las técnicas diagnósticas, la seroterapia y los procesos industriales, así un anticuerpo monoclonal (AcM) es una inmunoglobulina estable, reproducible y uniforme, con especificidad, afinidad y clase conocidas, producidas por sólo una clona de células B.

Los AcM se emplean en la purificación y caracterización de las moléculas diversas, la manipulación de la fisiología y bioquímica celulares, la definición de fenotipos y subpoblaciones celulares, el tipaje de antígenos de tejido y de grupo sanguíneo, la detección de los niveles circulantes de

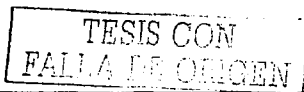


hormonas, y otros factores séricos, la demostración de daños tisulares, la detección de tóxicos, mutágenos y drogas, el estudio de la respuesta inmune y en apoyo a la fabricación de vacunas, para el diagnóstico de enfermedades infecciosas, los AcM también se ensayan para la terapia de los tumores y de procesos sépticos e inflamatorios, y se evalúan como catalizadores de reacciones químicas y bioquímicas. (5)

El sistema inmune de los mamíferos evolucionó para reconocer y destruir la variedad de patógenos (y sus variaciones antigénicas) a los que el organismo debe enfrentarse a lo largo de la vida. Los elementos básicos de este reconocimiento lo constituyen los linfocitos B y T y las células presentadoras de antígeno los dos primeros evolucionaron de forma tal que sus receptores para antígenos (inmunoglobulinas de superficie para las células B) y el receptor de las células [TCR] pueden reconocer de manera específica virtualmente cualquier molécula biológica, esta gran diversidad de receptores se generan durante el desarrollo de estas células, antes de que sufran el primer encuentro con el antígeno, una gran parte de estas especificidades jamás serán empleadas, pero se mantienen como parte del gran potencial inmune necesario para la supervivencia de la especie.

Los receptores para el antígeno localizados en la membrana de las células B y T están distribuidos de tal forma que una célula individual reconoce exclusivamente un determinante antigénico (epitope) dado, la interacción con el antígeno provoca la expansión de clones de linfocitos específicos que expresan el receptor apropiado, y da inicio la respuesta inmune, este concepto, denominado la teoría de la selección clonal y que fue propuesto originalmente para las células B, ha sido demostrado también para los linfocitos T, a pesar de las diferencias cualitativas que distinguen el reconocimiento inmune de ambas células, los TCR, por ejemplo, parecen no poder unir antígenos libres como lo hacen las células B, sino siempre asociados al sistema mayor de histocompatibilidad (MHC) en la superficie de las células presentadoras de antígeno e incluso de los propios linfocitos B, los determinantes antigénicos proteicos reconocidos por las células B y T también difieren, mientras los linfocitos B parecen identificar mayormente determinantes conformacionales bien expuestos en las moléculas, las células T se activan con proteínas desnaturalizadas o fragmentadas, de hecho, la mayoría de los epitopes T parecen ser lineales.

A partir de este momento nos encontramos en las células productoras de anticuerpos, y en la estructura y origen genético de las inmunoglobulinas. la estructura de las Igs ha sido dilucidada en los últimos 20 años, la molécula "tipo" de IgG está formada por cuatro cadenas polipeptídicas, idénticas de dos a dos (pesada [H] y ligera [L]), unidas por enlaces disulfuro, tanto las cadenas L como las H están organizadas en dominios (2 en las ligeras y 4-5 en las pesadas) con alrededor de 110 aminoácidos de extensión cada uno, cada dominio tienen una estructura conservada de "lazo" (loop) con cerca de 65 aminoácidos, que se estabiliza por enlaces disulfuro internos, el



análisis de la secuencia de aminoácidos de las Igs revela que la cadena L consiste en un dominio variable (VL) y uno constante (CL), cada uno del orden de 100 A 110 residuos, las cadenas H tienen un VH y un número variable de dominios CH que pueden incluir una región "bisagra" de unos 10-15 residuos, rica en cisteínas y prolínas, las primeras están implicadas en la formación de los enlaces disulfuro que unen las cadenas H, mientras que las segundas confieren cierta flexibilidad a la molécula completa (3)

Los dominios variables V se encuentran en la porción N-terminal de las cadenas L y H, y se conoce que a ellos esta asociado el reconocimiento antigénico, los dominios CH (al menos en los mamíferos) son responsables de las funciones efectoras de la Ig, tales como la fijación de complemento, la transferencia pla-entaria, la unión a receptores celulares etc. (3).

Un análisis detallado de los aminoácidos de la región V demuestra que en ciertas posiciones las secuencias varían más que en otras. Estas posiciones han sido denominadas regiones hipervariables, de las cuales se identifican 3 en la VL y otras tantas en la VH. se ha demostrado que en estas regiones hipervariables (también conocidas como regiones determinantes de la complementariedad o CDR) se encuentran la mayoría de los residuos que interactúan con el antígeno mediante complementariedad físico-química (puentes de hidrógeno, hidrofobicidad, enlaces electrostáticos, fuerzas de Van der Waals), la ubicación de la CDR se proyectan en forma de loops sobre la estructura formada por el plegamiento de los residuos más conservados de la propia región V, llamados en su conjunto el "marco" (framework), estos residuos constituyen alrededor del 75% de toda la región V tanto en las cadenas L como en las H).

El sitio de combinación para el antígeno está definido fundamentalmente por la estructura formada por la proyección de los seis loops (tres de cada cadena), por lo que varía en forma y tamaño entre anticuerpo y anticuerpo, se conoce que la contribución de los residuos de las CDR de la cadena H en la interacción con el antígeno es fundamental, lo que no excluye la importancia de las CDR de la cadena L en la estabilización de los enlaces débiles entre antígeno y anticuerpo, se ha demostrado que algunos antígenos de las regiones marco son importantes para una adecuada proyección espacial de los loops, e incluso pueden interactuar directamente con el antígeno (5, 8)

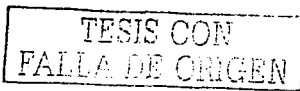
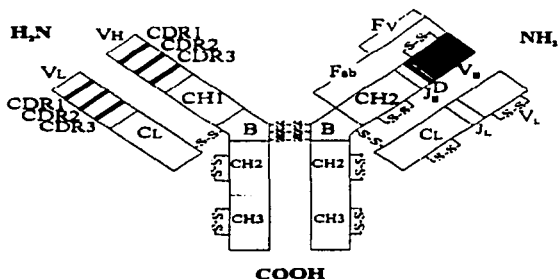


Fig. 1 REPRESENTACIÓN ESQUEMÁTICA DE UNA MOLÉCULA DE INMUNOGLOBULINA G

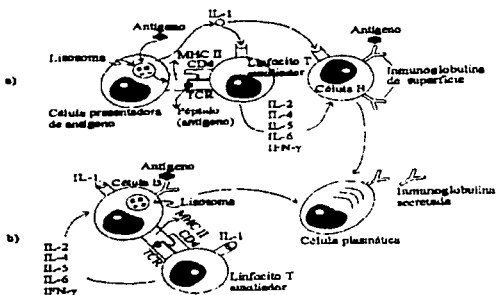


Las Igs son moléculas glicosiladas, con los carbohidratos añadidos en el segundo dominio de la región CH, esta unión se forma frecuentemente entre el grupo NH₂ de la asparagina y la N-acetilglucosamina, la glicosilación parece jugar un rol en la secreción de las Igs, y en el control de su catabolismo, las Igs que actúan como receptores en la membrana de las células B tienen sus cadenas H idénticas a las formas secretadas, excepto que su extremo carboxiterminal es más extenso y posee tres segmentos adicionales, siendo el intermedio de aproximadamente 25 aminoácidos hidrofóbicos, que pueden interactuar con la bicapa lipídica de la membrana celular, las cadenas ligeras son idénticas a las que poseen las Igs secretadas.

Hay diferentes clases y subclases de moléculas de Igs que pueden, las Igs se agrupan en 5 clases fundamentales: IgM, IgD, IgG, IgE e IgA, que están determinadas por el tipo de cadena pesada que poseen, mu, delta, gamma, épsilon y alfa, cada clase posee estructura diferente y propiedades que pueden o no coincidir, estas características incluyen: concentración en sangre, peso molecular, número de subclases, presencia de carbohidratos, grupos prostéticos, capacidad de unir complemento, localización anatómica para su secreción, transporte transplacentario, vida media y participación en la respuesta inmunológica en los organismos jóvenes o adultos

En particular, la IgG puede subdividirse en varias subclases (1-4 en el humano; 1, 2a, 2b, y 3 en el ratón; 1, 2a, y 2c en la rata), sólo existen dos tipos de cadenas L: Kappa y lambda participan en la especificidad de los anticuerpos, pero no en sus funciones

Fig. 2 ELEMENTOS CELULARES BÁSICOS EN LA RESPUESTA DE ANTICUERPOS ESPECÍFICOS



ANTICUERPOS POLICLONALES Y MONOCLONALES

En los mamíferos, los linfocitos B se originan en el hígado durante la vida fetal, pero poco tiempo después del nacimiento la médula ósea deviene el sitio fundamental de linfopoyesis, y así permanece a través de la vida adulta, en la médula, los linfocitos B surgen de una población discreta de células "madre" (stem) auto renovables, los linfocitos inmaduros permanecen en contacto con la matriz de células del estroma, que producen los factores necesarios para su división, los genes de las Igs se ensamblan durante este proceso de diferenciación, que resulta en linfocitos B "vírgenes" con las Igs de superficie, pero que no han entrado en contacto con el antígeno, estos linfocitos B vírgenes migran de la médula a los tejidos linfoides periféricos, tales como el bazo y los ganglios linfáticos, donde ocurrirá el encuentro con el antígeno y la diferenciación posterior.

En una respuesta típica se activan, proliferan y diferencian sólo los linfocitos con receptores específicos para los determinantes del antígeno, bajo la influencia de diversas citosinas producidas por células T auxiliares, parte de cada clon expandido madura hacia células plasmáticas, que producen inmunoglobulinas de tipo M específicas, con baja afinidad, durante una inmunización continua, parte de la población activa comienza a producir Ig del tipo gamma, debido a un switch de clase, otra parte se convierte en células de "memoria", las células de memoria sufren en ese

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

estadio tanto el proceso por el cual se produce el switch de clase, como la mutación somática en los genes de la Ig.

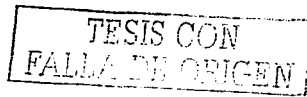
Un nuevo encuentro con el antígeno seleccionará cuáles de las mutaciones ocurridas en las células de memoria confirieron una mayor afinidad al receptor, por tanto se activan subclones de la estirpe original "favorecidos" por las mutaciones ocurridas en las regiones V, la inmunización repetida (hiperimmunización) actúa como ciclos progresivos de mutación somática de las células de memoria producidas en el inóculo anterior, y de selección de los subclones con receptores de mayor afinidad.

La respuesta de anticuerpos frente a la inmunización con un antígeno complejo está formada por los productos de un número variable y siempre cambiante de clones de linfocitos B (respuesta policlonal), los epitopes reconocidos por cada clon (es decir, por cada anticuerpo), la afinidad de los anticuerpos, y su clase, son diferentes y pueden cambiar con el curso del proceso de inmunización.

La respuesta inmunológica tiene también un fuerte componente de azar, ya que en cada enfrentamiento con el antígeno el animal empleará sólo una fracción, a veces mínima, de aquella parte de su repertorio de células B que poseen receptores específicos, por ejemplo, del repertorio teórico de anticuerpos de un ratón (50-100 millones de clones diferentes de células B), varios cientos e incluso miles pueden teóricamente reconocer los diferentes determinantes de un mismo antígeno complejo, pero de estos, sólo decenas estarán involucrados en la respuesta real al producirse la inmunización.

Todo lo anterior nos indica que en la práctica es imposible controlar la composición de las preparaciones de anticuerpos policlonales que se obtienen de animales inmunizados, estas preparaciones son heterogéneas para los anticuerpos que contienen, en términos de isotipo, afinidad y epítipo reconocido, estas preparaciones son diferentes de animal a animal inmunizado, e incluso en un mismo animal a distintos tiempos del proceso de inmunización.

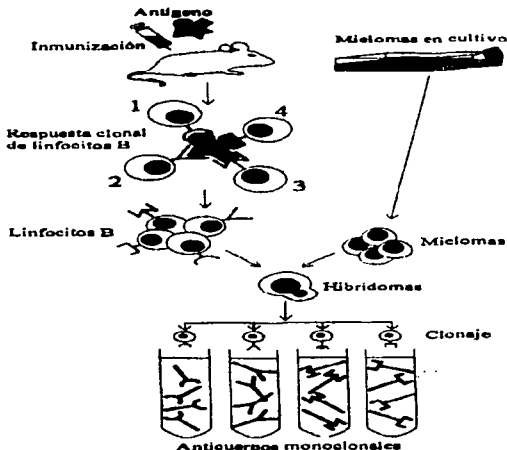
Si las inmunizaciones se producen con antígenos complejos, que comparten determinantes antigénicos con otros antígenos de diferente origen, las preparaciones policlonales pierden frecuentemente la capacidad de discriminación, debido a que una fracción de los anticuerpos producidos reaccionan contra diferentes preparaciones antigénicas, especialmente para técnicas de tipificación de microorganismos y células, las reacciones cruzadas traen ciertas limitaciones a los ensayos, empleando adsorciones apropiadas se logran reducir las reacciones cruzadas, pero ello frecuentemente a costa de una pérdida de título.



No obstante, en la inmunología se han venido empleando por muchos años las preparaciones policlonales de anticuerpos, obtenidas por inmunización repetida de conejos, cabras, ovejas y caballos, tanto por técnicas de laboratorio, como para la seroterapia pasiva, pero la heterogeneidad e irreproducibilidad de estas preparaciones limitan su empleo en el laboratorio y la clínica.

El reactivo ideal para los fines antes mencionados sería una preparación estable y reproducible de anticuerpos uniformes, con especificidad, afinidad y clase conocidas de los metabolitos que se producen en el organismo de los consumidores de drogas de abuso (Marihuana, Cocaína, Metilendioximetanfetamina), esta preparación tendría que ser elaborada a partir de las inmunoglobulinas producidas por sólo un clon de células B: un anticuerpo monoclonal.

Fig. 3. FUSION DE CÉLULAS ESPLENICAS DEL RATON INMUNIZADO CON CÉLULAS DE MIELOMA ADAPTADAS AL CULTIVO



ANTICUERPOS MONOCLONALES (AcM)

La posibilidad de obtener preparaciones específicas, repetibles, e inagotables de anticuerpos con funciones predefinidas (AcM) se hizo realidad entre 1974 y 1975, como resultado de los experimentos realizados en Cambridge, Reino Unido, por Georges Köhler y Cesar Milstein.

Como en otros muchos casos, este descubrimiento de trascendental impacto práctico derivó de un estudio más básico. Köhler y Milstein investigaban los mecanismos de control genético de la síntesis de inmunoglobulinas y pensaron que una forma experimental de comprobar sus ideas era realizar fusiones entre células productoras de anticuerpos diferentes y determinar las restricciones existentes en los híbridos para la asociación de cadenas ligeras y pesadas provenientes de diferentes orígenes.

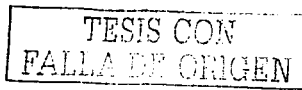
Estos investigadores aprovecharon la existencia de mielomas murinos inducidos mediante carcinogénesis química, y asequibles en forma de tumores trasplantables y líneas de cultivo, así como de la posibilidad ya demostrada de que era técnicamente posible obtener híbridos viables luego de la fusión de células en cultivo, en sus experimentos, Köhler y Milstein realizaron fusiones entre linfocitos provenientes de ratones BALB/c inmunizados con antígenos definidos, y mielomas de la estirpe MOPC21, cuyas inmunoglobulinas aberrantes eran ya bien conocidas.

Estos experimentos demostraron que era posible generar líneas híbridas (hibridomas) de crecimiento continuo en cultivo y capaces de secretar una variedad de anticuerpos, resultado de las combinaciones entre las cadenas pesadas y ligeras codificadas por cada célula parental, parte de estas combinaciones eran aquellas correspondientes a anticuerpos reactivos contra el antígeno empleado para inmunizar los ratones, los resultados indicaban también que si la fusión se producía entre linfocitos inmunes y mielomas mutantes (que hubieran perdido la capacidad de secretar sus propias inmunoglobulinas aberrantes) la única molécula producida por el hibridoma resultante sería aquella codificada por el linfocito parental.

En poco tiempo otros investigadores obtuvieron líneas de mieloma con las características deseadas, y la difusión del método y de estos mielomas provocó un rápido despegue de la tecnología.

Los hibridomas no sólo secretan los anticuerpos codificados por el genoma del linfocito parental, también conservan varias de las características propias de estos mielomas:

1. Crecen indefinidamente in Vitro, soportando la congelación indefinida y la clonación (crecimiento a partir de una sola célula inicial), esta última es esencial para garantizar el origen monoclonal de las preparaciones.



2. Inducen tumores ascíticos cuando son inoculados a animales consanguíneos como los que le dieron origen, lo cual resulta de gran utilidad para los efectos de la producción.
3. Secretan anticuerpos en grandes cantidades.

Gracias a las características de la técnica de generación de hibridomas, los AcM resultantes no sólo pueden ser seleccionados para su especificidad, sino también para aquellas funciones efectoras deseadas, o propiedades útiles para el investigador (isotipo, afinidad, capacidad de aglutinación, neutralización, captura, etc.)

Los AcM producidos por fusión celular de linfocitos y mielomas han permitido obtener la especificidad, reproducibilidad e inagotabilidad imposibles de lograr por técnicas convencionales de inmunización y preparación de antisueros, y los ha convertido rápidamente en uno de los elementos básicos para el desarrollo de la biomedicina moderna, los AcM se emplean para la definición de subpoblaciones celulares, el tipaje de antígenos de tejido y de grupo sanguíneo, el diagnóstico y tratamiento de enfermedades infecciosas y parasitarias, la detección de los niveles circulantes de hormonas y otros factores séricos, la demostración de daños tisulares, la detección de tóxicos, mutágenos y drogas, la fabricación de antivenenos, el diagnóstico, seguimiento y tratamiento de los tumores malignos, la facilitación del trasplante de órganos y tejidos, y la purificación y caracterización de moléculas diversas, recientemente se han generado AcM que catalizan reacciones enzimáticas, debido a que identifican y estabilizan los productos intermedios de estas reacciones.

HIBRIDOMAS POR FUSIÓN CELULAR

La generación de hibridomas de ratón productores de AcM es una tecnología "noble" que funciona en laboratorios con muy diverso equipamiento, condiciones y experiencia. La misma consta de una sucesión de etapas:

1. Selección de la cepa y condiciones del ratón a inmunizar
2. Definición del esquema de inmunización
3. Desarrollo de un método analítico adecuado para el tamizaje de anticuerpos específicos
4. Inmunización, titulación y selección de los animales donantes
5. Preparación del mieloma parental.
6. Fusión
7. Tamizaje de los anticuerpos y selección de los hibridomas
8. Clonación de hibridomas. Retamizaje. Cultivo y congelación de clones.
9. Caracterización inicial de anticuerpos.
10. Producción y purificación de anticuerpos para caracterización y aplicación.

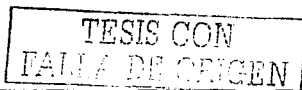
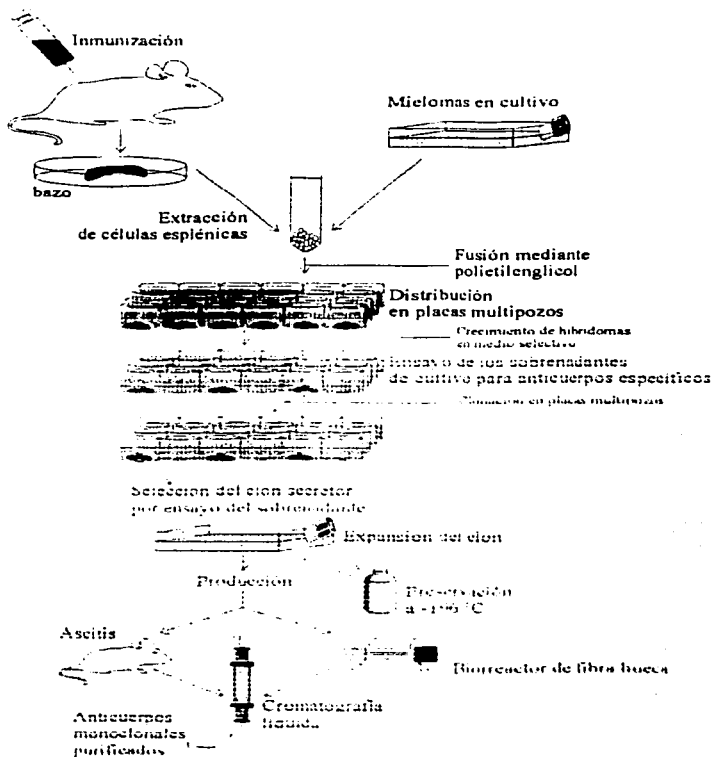


Fig. 4 ESQUEMA PARA LA OBTENCIÓN DE ANTICUERPOS MONOCLONALES



SELECCIÓN DE LA CEPA DE RATÓN

La inmensa mayoría de las líneas celulares de mieloma de ratón de que se dispone para la generación de hibridomas se originaron a partir de la cepa consanguínea BALb/c, el empleo de esta cepa de ratón para la inmunización garantiza una alta eficiencia de fusión de los linfocitos y mielomas, la total compatibilidad de antígenos de trasplante permite también el crecimiento tumoral de los hibridomas en estos animales, con fines productivos, por otra parte, esta cepa de ratón tiene, en general, una muy favorable respuesta inmunológica ante antígenos de diferente naturaleza.

Las condiciones higiénico-sanitarias de los animales, y el control de su consanguinidad, son factores no menos importantes en la selección del ratón.

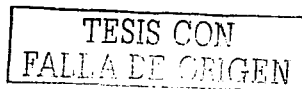
Los animales con enfermedades infecciosas y parasitarias tienen serias limitaciones de respuesta a la inmunización para muchos antígenos, tampoco son útiles para la producción posterior de los AcM, también, si la consanguinidad no es estrictamente controlada, las ventajas de compatibilidad tisular para el trasplante referidas en el párrafo anterior puede perder, no es infrecuente que después de un larga labor de obtención de hibridomas, la producción in vivo de los AcM se haga imposible debido a que los ratones inmunizados, supuestamente BALb/c no lo eran (5,8).

INMUNIZACIÓN IN VIVO.

Los protocolos para la inmunización varían ampliamente, dependiendo fundamentalmente de la naturaleza del anticuerpo empleado como inmunógeno los metabolitos [benzoilecgonina, anfetamina, ácido 11-nor- Δ^9 THC-9-carboxílico], en general siempre se realizan 3 o 4 inoculaciones con adyuvante seguidas de una última inyección en solución salina, conocida como booster (de amplificación), 3-4 días antes de la fusión.

El objetivo de esta última es reclutar a las células B de memoria hacia una nueva ronda de proliferación, ello se debe a que la formación de hibridomas viables y estables se produce preferencialmente cuando las células fusionadas están en división.

Las vías de inoculación más empleadas para la inmunización in vivo son las intraperitoneal, la subcutánea, la intravenosa y la intramuscular, en algunos casos se han realizado inmunizaciones en las almohadillas plantares de los animales, y en cadenas ganglionares, con el fin de obtener anticuerpos con propiedades determinadas.



SELECCIÓN DE MIELOMA MURINO.

Para lograr la inmortalización de las células secretoras de anticuerpos es imprescindible que la célula tumoral parental sea del mismo linaje, pues la fusión entre células con diferente ontogenia resulta frecuentemente en la pérdida de la función diferenciada, de entre las células tumorales de origen B (leucemias, linfomas y mielomas) se usan mayormente estos últimos, los mielomas son tumores originados por la transformación maligna de un clon de células B en un estadio diferenciado, lo que hace que tenga muy desarrollada la maquinaria de secreción de inmunoglobulinas.

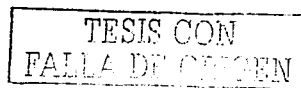
Pero el mieloma parental para las fusiones debe tener una serie de propiedades adicionales bien definidas:

1. Debe estar adaptado al crecimiento in vitro a altas y bajas densidades celulares, de forma que se garantice la proliferación de los híbridos recién formados y su clonaje eficiente.
2. Debe poseer un marcador de selección es decir una propiedad que permita que sólo los hibridomas resultantes sobrevivan luego de la fusión, los mutantes más empleados tienen una deficiencia en el gen que codifica para la enzima hipoxantina-guanina-fosforibosil-transferasa (HGPRT).
3. Deben ser mielomas que no sinteticen ni secreten Igs propias, ello garantiza que el híbrido resultante sólo produzca los anticuerpos codificados por el genoma del linfocito B parental.
4. Debe mantener el fenotipo para la alta secreción de Igs, común a los mielomas.
5. Debe preservar su capacidad para inducir tumores in vivo, en la cepa consanguínea de la cual se derivó originalmente.

Este conjunto de mielomas de ratón BALb/c y sublíneas derivadas de los mismos que poseen estas propiedades (p3/X63.Ag8.653.Sp2/0-Ag14, NSI/I, NSI/0), y están asequibles a través del intercambio entre laboratorios, o mediante, solicitudes a colecciones de células internacionales (ATCC en los EE.UU., O LA EACC en el Reino Unido).

FUSIÓN CELULAR Y SELECCIÓN DE LOS HÍBRIDOS.

Los aspectos ya mencionados (una correcta selección del animal, la inmunización efectiva, la selección de los linfocitos donantes, y una adecuada selección y preparación del mieloma parental) determinan en gran medida la eficiencia de los experimentos de fusión y la calidad y propiedades de los hibridomas resultantes, no obstante, existen otros detalles relativos al proceso de fusión en



si, y los reactivos empleados, que son complementarios a los anteriores y no pueden dejarse pasar por alto.

Los protocolos utilizados para la generación de hibridomas son muy variados.

Los pasos básicos de la técnica son:

1. Extracción quirúrgica del bazo del animal inmunizado, en condiciones estériles y cosecha de las células esplénicas (o resuspensión de los linfocitos activados in vitro; lavados repetidos en medio sin aditivos).
2. Resuspensión de las células del mieloma en cultivo y lavado repetido en medio sin aditivos.
3. Mezcla de células esplénicas y mielomas, en proporciones que van desde 1:1 a 10:1 (frecuentemente está última), centrifugación y conformación de un botón celular.
4. Dislocación del botón y adición lenta del agente fundente (polietilenglicol [PEG]). Incubación corta en agitación.
5. Dilución del botón fundido con medio de cultivo, centrifugación para eliminar el PEG.
6. Resuspensión en medio de cultivo completo selectivo y distribución en placas multipozos.

El agente fusionante más utilizado es el PEG, sustituyendo totalmente al virus Sendai, empleado en los experimentos de hibridación entre células durante la década de los 60's y en la obtención de los primeros hibridomas. Entre las características más importantes del PEG y de su empleo están:

1. Peso molecular: entre 1300 y 1400 KDa.
2. Concentración: por debajo de 30% la formación de híbridos es pobre, mientras que por encima del 50%, la toxicidad es muy alta. Se recomiendan concentraciones entre 40-50% en medio de cultivo sin suero.
3. pH: la frecuencia de fusión es muy dependiente de pH, con un número máximo de hibridomas a pH alcalino (alrededor de 8).
4. Aditivos: se ha sugerido que la adición de dimetilsulfóxido (15%v/v) produce un incremento en la eficiencia de fusión, pero la diferencia probablemente no es muy significativa.
5. Temperatura: no suele ser muy crítica, entre 20-27°C.

6. Duración de la exposición: con el tiempo de exposición al PEG aumenta la frecuencia de fusión pero también la toxicidad, en general este parámetro se ajusta a cada investigador, pero no suele pasar de los dos minutos, luego de lo cual se procede a la dilución con medio de cultivo.
7. Agitación durante la exposición: es importante para homogeneizar su acción e impedir un exceso de toxicidad para una parte de la población de células a fundir.

El medio selectivo (donde sólo crecerán los hibridomas) más empleado se deriva del sistema desarrollado por Littlefield en los años 60, y denominado HAT por contar entre sus componentes a la hipoxantina, aminopterina y la timidina, la hipoxantina y la timidina son precursores de las bases púricas y pirimidínicas respectivamente, mientras que la aminopterina es un agente bloqueador de la vía anabólica fundamental para la guanosina, denominada "vía endógena" o "síntesis de novo".

En las células de los mamíferos existen dos grandes vías para la biosíntesis de las purinas y las pirimidinas: la ya mencionada vía endógena y la "vía exógena" o de "salvación", la vía endógena es utilizada preferentemente por la célula sintetizándose el DNA a partir de los precursores internos; la vía exógena es utilizada alternativamente, empleándose precursores presentes en el medio extracelular, y las enzimas celulares específicas hipoxantina-guanina fosforibosil transferasa (HGPRT) y la timidina kinasa (TK).

Los mielomas empleados para esta técnica son mutantes deficientes para la HGPRT, de esta forma, los mielomas no fusionados son incapaces de sobrevivir en el medio de cultivo HAT, debido a la acción bloqueadora de la aminopterina sobre la síntesis de novo, los híbridos linfocito-mieloma con una adecuada complementación de ambos genomas producen la HGPRT codificada por el linfocito y sobreviven, por último, los linfocitos no fundidos no son capaces de reproducirse en cultivo debido a la ausencia de los factores celulares, solubles e insolubles, que llevan a la proliferación de estas células en el organismo (5, 8).

CLONAJE Y CONSERVACIÓN DE HIBRIDOMAS.

El clonaje (expansión de una población celular a partir de una sola célula inicial) es sin duda uno de los pasos más importantes en la tecnología de producción de AcM, por una parte garantiza que las inmunoglobulinas secretadas por el cultivo sean idénticas, al asegurar que toda la población se origine a partir de una sola célula progenitora, por otra parte el clonaje es un método práctico para descontaminar cultivos, estabilizar una población celular donde se manifieste una rápida generación de heterogeneidad, o seleccionar variantes celulares con características particulares deseadas.

Las condiciones de aislamiento en que debe ocurrir el crecimiento clonal limitan fuertemente la viabilidad celular, se conoce que el contacto celular y la transferencia de nutrientes y otros productos (cooperación) son esenciales para una adecuada proliferación de muchas células en cultivo, los medios de cultivo que hoy en día empleamos no poseen todavía todos los componentes para suplir estos factores, de lo que se desprende que no todas las células puestas en condiciones de cultivo serán capaces de crecer o clonar.

Los mielomas de ratón empleados en las fusiones han sido seleccionados para una alta eficiencia de clonaje (por ciento de cultivos exitosos, del total de células únicas sembradas) y esta propiedad es heredada por los hibridomas, de hecho, la etapa inicial de formación del hibridoma es en sí un proceso de crecimiento a una muy baja densidad, pues la cantidad de hibridomas en crecimiento por pozo sembrado luego de la fusión está entre 1 y 5 habitualmente (en una fusión típica, los 110 millones de células fusionadas se distribuyen en unos mil pozos, y la frecuencia estimada de hibridación exitosa es de 1 por cada 10^4 o 5×10^4 células fusionadas).

Para favorecer la eficiencia de clonaje de los hibridomas se añaden al medio de cultivo altos por cientos de suero bovino (15-20%) y sobrenadantes ricos en factores de crecimiento, o células "alimentadoras", estas últimas son células incapaces de proliferar in vitro pero que secretan al ambiente factores promotores de la proliferación de los hibridomas, entre las más comúnmente empleadas están los timocitos, y las propias células esplénicas o de exudado peritoneal de ratones no estimulados.

Por otro lado, se acostumbra también emplear la variante de sobrenadantes de cultivos de líneas celulares.

La técnica de clonaje para los hibridomas más empleada es la llamada dilución limitante, el principio básico de la misma es la preparación de diluciones tales a partir de una suspensión celular inicial, que la probabilidad de que dos células caigan en un mismo pozo de la placa de microtitulación al distribuir la misma se haga despreciable, es habitual emplear varias diluciones seriadas a partir de un conteo por cámara de Neubauer (por ejemplo: una fila con 10 células/pozo, cuatro filas con 1 célula/pozo y tres filas con 0.5 células por pozo), la estadística en Poisson nos indica que las células (y por tanto las colonias que de ellas se deriven) deberán seguir una distribución en los pozos de las placas que se puede describir mediante la expresión: $F_0 = e^{-u}$, donde F_0 será el número máximo de pozos positivos y u el número deseado de colonias por pozo, en nuestro caso particular, u deberá ser 1, con vistas a garantizar la monoclonalidad del anticuerpo secretado, entonces $F_0 = e^{-1}$, o sea 0.63, lo cual significa que aquellas filas sembradas con una misma dilución inicial y que posean el 63% o menos en sus pozos con colonias son las que se deberán tomar para los ensayos de los sobrenadantes con vistas a detectar el anticuerpo deseado.

En la práctica, es habitual que los investigadores reduzcan este número al 50% e incluso al 30%, como quiera que la clonalidad del hibridoma se asegura con dos clonajes sucesivos, la probabilidad final de que existan mezclas de dos hibridomas en una colonia es prácticamente nula, el segundo clonaje se inicia de una de las colonias del primero, que fue seleccionada como positiva al anticuerpo deseado, y con características de secreción y crecimiento adecuadas.

Los clonajes de hibridomas deben continuarse hasta que más del 90% de todas las colonias ensayadas den resultados positivos, en términos del anticuerpo específico, ello indica que la célula progenitora tuvo un grado de estabilidad aceptable en el tiempo para ese fenotipo.

Una vez seleccionado el clon final (es conveniente conservar varios hermanos del mismo clonaje como medida de precaución; para detalles), la población celular se expande en cultivo y se realizan congelaciones lo antes posible, como forma de preservar una semilla lo más cercana al origen, esta conservación se realiza por nitrógeno líquido.(2.5,8)

MIELOMAS E HIBRIDOMAS EN CULTIVO.

Las líneas de mielomas e hibridomas en cultivo están constituidas por células linfoblastóides, con características particulares, entre los que están:

1. Su carácter "inmortal" in vitro, que les permite proliferar indefinidamente, sobre la base de un adecuado suplemento de los factores necesarios en el medio de cultivo.
2. Su capacidad para crecer en suspensión, sin necesidad de "anclaje" a un sustrato sólido para proliferar.
3. La posibilidad de alcanzar altas densidades celulares en cultivo (alrededor de 5×10^5 /mL en cultivo estacionario, $1-2 \times 10^6$ /mL en frascos spinner y biorreactores, y hasta 10^9 /mL en fibra hueca)
4. Una complejidad mínima para los medios de cultivo que requieren

Los mielomas e hibridomas son líneas celulares relativamente sencillas de mantener, pero la existencia de una función asociada en estos últimos (la producción de un anticuerpo específico) hace necesario que se propicien condiciones de cultivo tales que eviten un enriquecimiento de la población con "variantes" de más rápido crecimiento, esta propiedad viene frecuentemente asociada a la pérdida de la secreción de Igs, al ser estas dos características "excluyentes" en las células B normales, la inestabilidad intrínseca de los hibridomas se debe tanto a su carácter tumoral, como al propio hecho de que son células híbridas.

Por todo ello los hibridomas deben ser cultivados atendiendo a los siguientes principios:

1. Mantener las poblaciones de crecimiento exponencial (entre las 10^3 y 5×10^5 células /mL de medio), reduciendo la posibilidad de situaciones de muy altas densidades, donde algunas células pueden tener ventajas.
2. Trabajar los cultivos lo más cercanos posibles de su origen, lo que se logra con un adecuado stock de viales criopreservados.
3. Realizar clonajes periódicos y reensayos de la producción de anticuerpos (para los hibridomas), o para las propiedades necesarias en el mieloma, en caso de que "2" no sea posible.
4. Renovar periódicamente el frasco donde se mantienen las células, con el fin de reducir las interacciones con la matriz extracelular producida por las propias células (a pesar de que los mielomas e hibridomas no son dependientes de anclaje a un sustrato, las células se adhieren a la superficie de los frascos en la mayoría de las sublíneas existentes).

Los mielomas e hibridomas proliferan in vitro describiendo una clásica cinética exponencial inicial, seguida de una meseta que corresponde a las densidades máximas posibles en el volumen dado de medio de cultivo, a morir de manera exponencial ante el agotamiento del medio.

Los medios de cultivo sintéticos tienen como componentes básicos:

1. Una mezcla de sales inorgánicas (fisiológica) cuyo objetivo es mantener el pH, la osmoticidad y una adecuada concentración de iones necesarios en el metabolismo, en el caso de los hibridomas se acostumbra añadir algún tampón orgánico (ejemplo: HEPES), especialmente para la fusión y crecimiento inicial en las placas multipozos, con vistas a amortiguar las variaciones de pH que se producen necesariamente durante las inspecciones de las mismas.
2. Una o varias fuentes de energía, habitualmente la glucosa, por sus características metabólicas, los hibridomas son grandes consumidores de estas fuentes de energía y se acostumbra adicionar al medio base glucosa hasta 4.5g/L, así como piruvato de sodio.
3. Un repertorio de aminoácidos, entre los que se encuentran los que habitualmente son esenciales para las células en cultivo. La adición de L-glutamina por encima del contenido base del medio es habitual para el cultivo de hibridomas, debido a que este aminoácido participa en la síntesis de los ácidos nucleicos. Como se sabe, el metabolismo de estos

compuestos está desviado de su vía normal durante el tiempo en que el híbridoma se mantiene con aminopterina.

4. Un repertorio de vitaminas (coenzimas), habitualmente del grupo B.

Es necesario, además, añadir una fuente de factores de crecimiento.

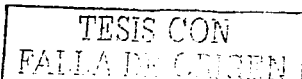
TAMIZAJE DE HIBRIDOMAS PARA ANTICUERPOS ESPECÍFICOS

La selección y desarrollo de un sistema adecuado para la identificación de los híbridomas secretores de AcM específicos es uno de los elementos más importantes en esta tecnología.

Si bien la cantidad de pozos con cultivos de híbridomas luego de la fusión varía de experimento a experimento, este número oscila entre 500 y 900 (en las 8-10 placas de 96 pocillos que se emplean habitualmente en una fusión estándar), ello implica un número igual de sobrenadantes a ensayar, en caso de que se decida trabajar con sólo una réplica por pozo, la primera característica del sistema de tamizaje es por tanto su capacidad de asimilar un gran número de muestras, a ello se suma que, una vez que se retira el sobrenadante de los cultivos, y se añade medio fresco en espera de los resultados del ensayo, las densidades celulares existentes por pozo no permiten más de 24-48 horas de espera, en caso de que el ensayo se dilatare, sería necesario hacer más frecuentes los cambios de medio, y en el caso extremo, la replicación de todos los pozos en placas nuevas, esto indica que el ensayo debe ser también rápido.

Entre las características del sistema de tamizaje deben estar también su *capacidad para detectar pequeñas concentraciones del anticuerpo específico* (los clones emergentes secretan entre 10^{-12} a 10^{-14} M del AcM) y de *ofrecer respuestas seguras con pequeñas cantidades de muestra*, pues los volúmenes de sobrenadante, metabolizado no sobrepasan los 200 μ l por pocillo.

Finalmente, el sistema de tamizaje *debe estar en correspondencia con la utilización final* a que vayan a ser destinados los AcM, esto incluye desde el propio principio del método empleado, hasta las condiciones generales del ensayo (pH fuerza iónica, forma de presentación del antígeno, etc.), si el método idóneo resulta muy engoroso para ser aplicado en el tamizaje masivo de los numerosos híbridomas resultantes de una fusión puede entonces realizarse una primera selección por un método específico más sencillo, que aunque irrelevante respecto al uso a que vayan destinados los AcM, reduce el número de muestras a estudiar, en un segundo ensayo, más acorde al uso final de los AcM, se comprobaría si los híbridomas seleccionados cumplen con las características deseadas, por ejemplo, si se requieren AcM para la identificación de antígenos de superficie celular por inmunofluorescencia, el sistema de tamizaje debe basarse en este principio, sin embargo, si el método resulta poco apropiado para los primeros ensayos debido al gran



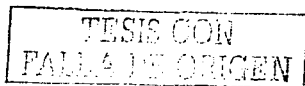
número de muestras a analizar, una alternativa es evaluar los sobre nadantes por un sistema enzimático en fase sólida y estudiar por inmunofluorescencia las muestras que resulten positivas.

¿Cuándo debe comenzar el ensayo de los sobrenadantes de cultivo?, un criterio compartido por muchos investigadores es que el análisis de los sobre nadantes debe comenzar una vez que los clones se hagan evidentes por inspección a simple vista, esto puede lograrse observando a contraluz el fondo de los pocillos de las placas de cultivo, los clones emergentes aparecen como pequeños botones opacos, generalmente cerca de las paredes de los pocillos. Visto al microscopio invertido, este crecimiento celular se corresponde con aproximadamente 1/3 del área total del pocillo, el crecimiento de los clones también puede evidenciarse por el cambio en la coloración de los sobrenadantes de cultivo, que pasan de un color rojo-naranja a un naranja-amarillo, indicando el cambio que se produce en el pH del medio de cultivo, como resultado del metabolismo celular.

Para el montaje del sistema pueden emplearse como controles positivos el suero de los animales inmunizados, o AcM de la misma especificidad, provenientes de una fusión anterior, obtenidos por donación, o adquiridos, y como controles negativos los sueros de animales preinmunes o sobrenadantes de cultivo de hibridomas secretores de AcM no relacionados.

Como hemos hecho mención anteriormente, el ensayo de tamizaje debe estar *listo antes de comenzar la fusión*, constituye un error, lamentablemente demasiado frecuente, acometer una fusión sin antes tener un sistema totalmente establecido para la selección de los hibridomas secretores de AcM específicos, la importancia de este aspecto es tal que nunca sobrárá repetirlo, son innumerables los casos de laboratorios que han perdido gran parte de los hibridomas recién desarrollados por insuficiencias del sistema de tamizaje, debe tenerse en cuenta que no es posible acometer este trabajo en momentos en que ya existen híbridos en crecimiento, y los fallos en el sistema de tamizaje conducirán a la difícil situación de mantener casi mil cultivos (pocillos) independientes, la toma de medidas "heroicas", tales como la congelación de las células en las propias placas de fusión, son inapropiadas, si se tiene en cuenta que, por su dificultad técnica, pueden conducir muy frecuentemente a la pérdida una alta proporción de los cultivos.

Otro aspecto general a considerar en el tamizaje de AcM es el hecho de que para la gran mayoría de sus aplicaciones *se requiere que los AcM tengan alta afinidad*, es posible realizar procedimientos relativamente sencillos para, desde las primeras etapas, dirigir la selección hacia AcM con estas características, si en el sistema de tamizaje se emplean altas concentraciones del antígeno, el número de hibridomas que se selecciona es mayor, pero pueden incluirse aquellos que secretan AcM de baja afinidad, si por el contrario se emplean concentraciones bajas de



antígeno, disminuye el número de muestras positivas, pero las seleccionadas se corresponden por lo general con hibridomas secretores de AcM de mayor afinidad.

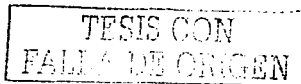
Una posible estrategia es realizar los primeros ensayos con mayores concentraciones del antígeno y "releccionar" de entre las muestras positivas aquellas que contienen anticuerpos de mayor afinidad empleando un segundo ensayo con menores concentraciones de antígeno (por ejemplo 1/10 de la concentración de la empleada inicialmente), otra posibilidad es diluir los sobrenadantes de cultivo a ensayar (por lo general 1:2 o 1:5), lo que reduce el número de muestras positivas, pero lleva a la selección de una mayor proporción de hibridomas secretores de AcM de mayor afinidad.

La naturaleza y calidad del antígeno pueden influir también en la afinidad de los AcM seleccionados, el empleo de biomoléculas de estructura altamente repetitiva en el procedimiento de tamizaje puede conducir a la selección de AcM por avidéz, más que por afinidad, debido al efecto multiplicador de la señal, en el caso de los péptidos, debido a su menor peso molecular, la concentración molar de los epítomos representados es muy superior a como estos se presentan en la proteína natural y por la misma razón de avidéz antes mencionada, la tendencia puede ser la de seleccionar AcM de baja afinidad.

En términos prácticos, los anticuerpos de menor afinidad son generalmente de la clase IgM, los AcM de clase IgM tienden a dar reacciones cruzadas con antígenos no relacionados, y es por ello que han resultado de poca utilidad en la mayoría de las aplicaciones diagnósticas, una forma de evitar la selección de AcM de esta clase es emplear en el sistema de tamizaje anticuerpos específicos anticadena pesada gamma de ratón, sin reactividad cruzada con cadena mu.

Abordaremos aspectos relativos a métodos de tamizaje para la especificidad de los AcM, esta distinción es necesaria debido a que en no pocos casos es muy necesario ensayar de manera simultánea para la función de los anticuerpos, los sistemas para ensayar las propiedades de los AcM (capacidad de aglutinar, de neutralizar, de capturar en solución, etc.) deben tener un diseño particular, que en ocasiones puede combinarse con las metodologías más generales aquí descritas.

Los inmunoensayos en fase sólida son los métodos más empleados para el tamizaje de los sobrenadantes de cultivo de los hibridomas debido a que permiten el análisis de gran número de muestras en corto tiempo y pueden emplearse tanto para antígenos solubles como para antígenos complejos (bacterias, parásitos, células completas, membranas celulares, etc.), a continuación se describen algunos de los más utilizados: el radioinmunoensayo (RIA), la inmunofluorescencia (IF), y los ensayos inmunoenzimáticos (EIA), se hacen al final algunas consideraciones sobre el empleo del Western blot en el tamizaje, para casos muy específicos. (2, 5, 8)



ENSAYOS INMUNOENZIMÁTICOS EN FASE SÓLIDA (ELISA)

El empleo de ensayos inmunoenzimáticos (EIA) para la detección de la reacción antígeno-anticuerpo ha crecido vertiginosamente a partir del reporte de Engvall y Perlman en 1971. Cuando los sistemas tienen como base un soporte sólido, los mismos son conocidos como ELISA, a partir de sus siglas en inglés (*enzyme-linked immunosorbent assay*).

Los sistemas tipo ELISA resultan excelentes para el tamizaje primario de AcM y sin lugar a dudas son los más utilizados, son métodos relativamente sencillos, de alta sensibilidad y especificidad, con posibilidad de ser automatizados y pueden ser realizados en laboratorios sin grandes recursos técnicos.

Dentro de los factores que han propiciado la expansión de estos métodos se encuentran:

1. El desarrollo de la industria del plástico, que generó materiales con características de adsorción definidas y reproducibles.
2. La caracterización y desarrollo de métodos de purificación de las enzimas que se emplean como marcadores.
3. El desarrollo de métodos sencillos y confiables de conjugación de anticuerpos a las enzimas marcadoras.

Los ensayos inmunoenzimáticos se dividen en dos grandes grupos: homogéneos y heterogéneos.

SISTEMAS HOMOGÉNEOS

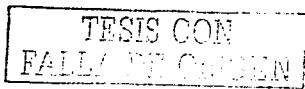
En estos sistemas un hapteno o antígeno particular se une a una enzima que la actividad de esta es alterada (aumentada o disminuida) por la forma de dicho hapteno o antígeno a un anticuerpo específico, el empleo de los sistemas homogéneos estuvo restringido hasta hace pocos años a la detección y cuantificación de sustancias de bajo peso molecular, pero comienzan a usarse cada vez más para moléculas mayores debido a la sencillez de la técnica y a su corto tiempo de realización (un solo paso).

SISTEMAS HETEROGÉNEOS

En estos sistemas se separa la reacción propiamente inmunológica de la reacción enzimática. Son los más comunes y es a ellos a los que nos referiremos en detalle.

El fundamento metodológico de los sistemas tipo ELISA para el tamizaje de AcM es el siguiente:

- a) El antígeno es fijado al soporte sólido.



- b) Se bloquean los posibles sitios libres del soporte.
- c) Se incuba con los sobrenadantes de hibridomas.
- d) Se añade el segundo anticuerpo (anti-inmunoglobulina de ratón) conjugado a una enzima marcadora.
- e) Se revela la reacción con un sustrato apropiado.

Este protocolo básico puede tener múltiples variantes

NATURALEZA DEL SOPORTE SÓLIDO

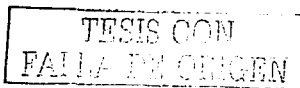
Los más empleados son las placas de microtitulación de 96 pocillos, de cloruro de polivinilo (PVC) o poliestireno (PE), aunque también se ha empleado papel de nitrocelulosa, perlas de poliestireno, etc., el empleo de uno u otro material puede estar en dependencia de la disponibilidad del antígeno y de su capacidad particular de adsorción, los fabricantes de soportes y placas para EIA ofrecen varias calidades, relativas principalmente a la capacidad de adsorción de proteína que posee el polímero en cuestión (2, 5).

FIJACIÓN DEL ANTÍGENO

Las proteínas solubles, los ácidos nucleicos y los carbohidratos pueden ser adsorbidos pasivamente al soporte sólido, se han descrito ensayos en fase sólida para antígenos particulados tales como cromosomas, virus, parásitos y células totales, existen dos formas básicas de unir estas partículas a una placa de ELISA: (a) aplicar la suspensión y permitir el secado, y (b) aplicar la suspensión, centrifugar y eliminar el sobrenadante.

Para la selección de AcM contra componentes externos de la membrana celular (por ejemplo, de una bacteria), es necesario utilizar células intactas (vivas) para evitar el reconocimiento de estructuras intracelulares, para seleccionar AcM contra una proteína intracelular (como por ejemplo, el producto de un oncogén) es preferible lograr algún grado de purificación de la proteína.

Debido a que las fuerzas que intervienen en la unión de los antígenos al plástico son de tipo no covalente (fundamentalmente hidrofóbicas), una parte del material se pierde durante los procesos de lavado, sin embargo, utilizando concentraciones apropiadas de antígeno, y varios ciclos de lavado entre los distintos pasos de la técnica, se obtienen resultados reproducibles, para placas de microtitulación, si el antígeno es una proteína pura, pueden emplearse para el recubrimiento unos 100 μ L/pozo de una solución con 1-10 μ g del antígeno/mL. El pH del tampón para el recubrimiento de las placas puede variar de antígeno a antígeno. El más empleado es el tampón bicarbonato de sodio 50 mM, pH=9.6. Algunos antígenos se unen mejor a la superficie sólida a pH neutro.



BLOQUEO DE LOS SITIOS LIBRES EN EL SOPORTE SÓLIDO

Los sobrenadantes de cultivo tienen un alto contenido en proteínas irrelevantes, provenientes del suero bovino utilizado en la preparación del medio de cultivo, así como producto de la actividad residual de las células linfoides no fundidas, y del detrito que se forma por la muerte celular, el bloqueo de los sitios libres en el soporte sólido es por tanto necesario sólo para algunos antígenos, y en especial si en el tamizaje se emplea la nitrocelulosa, debido a su alta capacidad para adsorber proteínas, entre la sustancias más empleadas como agentes bloqueantes se encuentran la albúmina sérica bovina (BSA), la leche desgrasada, la gelatina y el Tween 20.

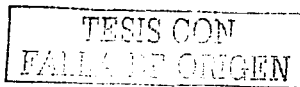
CONSERVACIÓN DEL SOPORTE SÓLIDO RECUBIERTO CON EL ANTÍGENO

La mayoría de las placas de ELISA recubiertas con el antígeno pueden ser conservadas a 4° C durante varias semanas, es común dejar las placas con la solución de bloqueo y azida sódica al 0.02% para evitar contaminación bacteriana, debido a que la azida sódica inhibe la acción de la peroxidasa, el empleo de esta enzima como marcador en el segundo anticuerpo presupone la remoción completa de la azida mediante lavados, los antígenos unidos a nitrocelulosa son estables durante meses a 4° C.

INCUBACIÓN CON LOS SOBRENADANTES DE CULTIVO

Los hibridomas pueden ensayarse a partir del momento en que las colonias se detectan a simple vista, por inspección del fondo de las placas de cultivo contra una fuente de luz, sin embargo, es preferible inspeccionar al microscopio los pozos y comenzar el ensayo cuando se observa un crecimiento que cubre aproximadamente 2/3 de la superficie, en el caso en que se desea seleccionar AcM de alta afinidad desde etapas tempranas, pueden ensayarse los pozos con crecimientos inferiores al mencionado (por ejemplo, cuando cubran 1/3 del área total), alternativamente, es posible utilizar los sobrenadantes diluidos, con lo que se limita la selección AcM de baja afinidad .

Para los estudios en placas de ELISA es suficiente el ensayo de 100µL de los sobrenadantes de cultivo, Si el antígeno es escaso es posible utilizar placas de ultramicrotitulación (o de Terasaki) para las cuales son suficientes 10-20 µL por pozo, por lo general la incubación se realiza durante una hora a 37° C o toda la noche a 4° C (también puede realizarse a temperatura ambiente), la decisión de la temperatura a utilizar puede estar en dependencia de las condiciones en que los AcM van a ser utilizados posteriormente, ya que se ha reportado que la afinidad de algunos AcM varía con la temperatura, naturaleza del segundo anticuerpo (anti-ratón/enzima).



Los AcM específicos presentes en los sobrenadantes de los hibridomas, atrapados en la fase sólida debido a su unión con el antígeno, son detectados por un segundo anticuerpo (comúnmente policlonal) capaz de reconocer una o varias clases de Igs de ratón, covalentemente unido a una enzima, ello permite que, en presencia del sustrato apropiado y en algunos casos, de un cromógeno, la reacción se revele, si se desean AcM de una determinada clase, por ejemplo, IgG, entonces debe emplearse un anticuerpo policlonal específico para la cadena pesada correspondiente. La mayoría de los anticuerpos policlonales usados para estos fines provienen de conejo, carnero o chivo y se pueden obtener comercialmente conjugados a diferentes enzimas.

Las enzimas mayormente empleadas en estos conjugados son la peroxidasa, la fosfatasa alcalina y la beta galactosidasa, en ese orden, para la peroxidasa existen varios cromógenos que, unidos a su sustrato (peróxido de hidrógeno) y en un tampón apropiado, producen reacciones coloreadas intensas fácilmente medibles espectrofotométricamente. El cromógeno más usado es la orotifenilendiamina (OPD) que produce un color amarillo intenso, que cambia a naranja al detener la reacción enzimática con una solución de ácido sulfúrico. En los últimos años, debido a la potencial capacidad mutagénica y cancerígena de la OPD, este compuesto se ha ido sustituyendo progresivamente por el TMB (3,3',5,5"-tetra-metil bencidina) y el ABTS (2,2'azino di (3 etilbenzotiazolin) sulfonato).

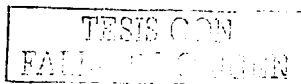
Para la enzima fosfatasa alcalina los principales sustratos son el pNPP (paranitro fenilfosfato), que produce un color amarillo y el 4-MU-P (4-metilumbeliferil fosfato), que es un sustrato fluorescente. Para la beta galactosidasa el sustrato ONPG (o-nitrofenil-D-galactopiranosido), da reacciones coloreadas y el sustrato 4-MU-GAL (4-metilumbeliferil-D-galactopiranosido) es fluorogénico.

En los sistemas "semisecos" horizontales la transferencia es rápida. Estos utilizan por lo general electrodos de grafito y el tampón de transferencia está contenido en papeles de filtro saturados. Es posible realizar varias transferencias a la vez, colocando cada gel sobre un pedazo de nitrocelulosa y separándolos entre sí con papel filtro.⁴⁰ Son sistemas más económicos y los resultados de la transferencia se tienen en unas pocas horas.

Una vez transferidos los antígenos al soporte, su presencia se pone en evidencia mediante una primera incubación con anticuerpos específicos, seguida de segundos anticuerpos marcados con enzimas, radioisótopos o fluorocromos.

PURIFICACIÓN DE AcM

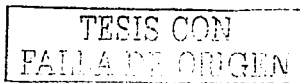
El nivel de pureza de un AcM está determinada en primera instancia por el uso a que esté destinado. Para procedimientos de rutina en el laboratorio no siempre es necesario purificar los AcM. Estos pueden ser empleados directamente como sobrenadante de cultivo o ascitis diluido



para evidenciar la presencia de un determinado antígeno. También en la inmunohistoquímica y la aglutinación se emplean con éxito preparaciones comerciales no puras de AcM.

Sin embargo, para la mayoría de las aplicaciones de los AcM se requiere un determinado nivel de pureza. Sin que ello constituya un dogma es generalmente aceptado que la pureza de un AcM para uso diagnóstico *in vitro* puede estar entre el 70 y 80%. No obstante, algunos procedimientos diagnósticos requieren purezas superiores, al igual que su empleo como ligando en procedimientos de inmunoadfinidad en condiciones de laboratorio. Para su empleo *in vivo* (diagnóstico o terapéutico) y como ligandos para la inmunopurificación de inyectables, la pureza de los AcM tiene que estar muy por encima del 90%, además de cumplir con otros requisitos adicionales de calidad.

Además del uso a que esté destinado, el otro elemento a tener en cuenta al diseñar un esquema de purificación de los AcM es el material de partida. Este puede ser el sobrenadante de cultivos convencionales o el líquido ascítico provocado durante el crecimiento tumoral de los hibridomas en los animales. Ambos tipos de muestras se diferencian tanto en la concentración de los AcM como en la naturaleza de los contaminantes. En el caso de los sobrenadantes de cultivo, las concentraciones del AcM específico están en el orden de las decenas de microgramos por mililitros, aproximadamente 100 veces menos que las concentraciones encontradas comúnmente en el líquido ascítico (que son del orden de los miligramos por mililitro). Los principales contaminantes en el sobrenadante de cultivos convencionales son: el agua (los AcM están muy diluidos) y las proteínas del suero utilizado como suplemento del medio de cultivo. En los casos en los cuales se emplea suero fetal bovino (SFB) o neonato (SBN, sin ingerir calostro), los contaminantes fundamentales son la albúmina y la transferrina bovinas. Para un medio suplementado con 10% de SFB o SBN la concentración de albúmina puede llegar a 4 mg/mL, contra 20-100 µg/mL para el AcM. Si se emplean otras fuentes de suero aparecen como contaminantes importantes las inmunoglobulinas (Igs) de la especie, mucho más difíciles de separar del AcM. Las Igs bovinas también están presentes en el SFB y SBN, pero en mucho menor cantidad. Es por ello que para las producciones de AcM a gran escala mediante sistemas de cultivo se han desarrollado medios libres de suero o proteína, que simplifican y abaratan la purificación (*downstream*). En el caso del fluido ascítico, los principales contaminantes provienen de las proteínas séricas del ratón, y muy en particular de la albúmina. Sin embargo, las más difíciles de eliminar son las Igs irrelevantes que aparecen en el ascitis como resultado de la respuesta inmunológica monoclonal del animal, en concentraciones uno o dos órdenes de magnitud por debajo del AcM. Debido a la alta concentración de AcM, su fácil obtención y su relativamente bajo costo de producción, el ascitis constituye un buen material de partida para la mayoría de las producciones no terapéuticas de AcM.



Un esquema típico para la purificación de un AcM consta básicamente de tres etapas: (a) preparación de la muestra, (b) método de purificación principal y (c) método de purificación adicional.

El objetivo de la preparación de la muestra es colocar la misma en condiciones apropiadas para el método de purificación que se va a emplear. En el caso de que el material de partida sea el sobrenadante de cultivo, la preparación de la muestra puede consistir en disminuir el volumen inicial de la muestra, para facilitar y acortar el tiempo de purificación. Esta disminución de volumen (o lo que es lo mismo, la concentración de la muestra) puede realizarse por ultra filtración, diálisis contra soluciones concentradas de alta capacidad higroscópica (por ejemplo, sacarosa al 60%, polietilenglicol o polivinilpirrolidona al 50%, etc.) o precipitando las inmunoglobulinas mediante sales.

En el caso de que el material de partida sea el fluido ascítico, la preparación de las muestras incluye su clarificación, o sea, la eliminación de residuos de fibrina, sustancias grasas (que pueden aparecer como resultado de la irritación de la cavidad peritoneal de los animales con aceite mineral o Pristane), células, restos de componentes celulares y otros residuos sólidos. Este procedimiento puede realizarse mediante centrifugación de las muestras a alta velocidad (>10 000 rpm) o mediante filtración por membrana de 0.45 μm .

Tanto para los sobrenadantes de cultivo como para el fluido ascítico, la preparación de la muestra contempla por lo general un cambio de tampón para colocarla en condiciones de pH y fuerza iónica compatibles con el paso posterior de purificación. Este cambio de tampón puede realizarse por diálisis, proceso que puede tomar un tiempo largo, o por filtración por Sephadex G-25, procedimiento rápido y muy eficiente.

La purificación principal de la muestra se realiza fundamentalmente mediante un método cromatográfico y tiene como objetivo separar el AcM de sus contaminantes mayoritarios. En dependencia del uso del AcM y de la eficiencia del método cromatográfico empleado, en ocasiones este paso proporciona AcM con suficiente pureza. Si se requiere una pureza superior, como es el caso de los AcM para uso *in vivo*, este paso principal de purificación debe complementarse con uno o más pasos adicionales (*polishing steps*), que por lo general incluyen métodos cromatográficos basados en principios diferentes al del método principal. Al aumentar el número de pasos de purificación aumenta la calidad y pureza del AcM, pero disminuye el rendimiento.

Los procedimientos comúnmente empleados para la purificación de AcM son:

Precipitación salina

Purificación por cromatografía de intercambio iónico

Cromatografía de intercambio iónico
Cromatografía de filtración en gel
Cromatografía de afinidad
Cromatografía de adsorción por hidroxilapatita

CRITERIO DE PUREZA DE UN AcM

Con independencia del método utilizado para la purificación, se acostumbra a determinar el grado de pureza de los AcM mediante la electroforesis en geles de poliacrilamida, en presencia de dodecilsulfato de sodio (SDS-PAGE). El SDS desnaturaliza las proteínas y les confiere una carga neta superficial negativa, en estas condiciones las proteínas migran dentro del gel con una velocidad inversamente proporcional a su tamaño y pueden ser separadas. Las concentraciones de acrilamida más empleadas están entre el 10 y el 12%, para AcM de clase IgG, si la electroforesis se realiza en condiciones de reducción (en presencia de 2-mercaptoetanol o ditiotritol), se obtiene una banda correspondiente a la cadena pesada de aproximadamente 55 kDa y otra para la cadena ligera de aproximadamente 23 kDa. En condiciones de no reducción debe obtenerse una banda única a la altura de los 150 kDa. Para una estimación exacta de la pureza del AcM debe realizarse una densitometría al gel de electroforesis.

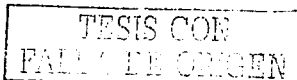
CARACTERIZACIÓN DE AcM

La caracterización total de un AcM es un largo y complejo procedimiento que depende del uso al que esté destinado. No obstante, su (a) clase, (b) subclase, (e) afinidad, así como (d) la discriminación de su reconocimiento, respecto a otros AcM que identifican el mismo antígeno, forman parte de lo que pudiéramos denominar la caracterización inmunquímica elemental.

Estos aspectos complementan la caracterización de hibridoma *in vitro e in vivo* (su Td en cultivo, su T₁₀₀ en animales, la concentración de AcM producida en cultivo y en el ascitis, y la estabilidad del hibridoma en el tiempo, etc.), aspectos ya mencionados anteriormente.

Existe un nivel adicional de caracterización inmunquímica, muy relacionado con el uso del AcM, por ejemplo: (e) si el AcM es capaz de reaccionar con "contaminantes" presentes en el sistema donde se va a emplear (reacciones cruzadas reales) y (f) si el AcM mantiene su capacidad de reconocimiento del antígeno en el método en el cual será utilizado, por ejemplo, cuando se une a un soporte sólido para la captura (sistemas tipo ELISA o RIA), o a una matriz cromatográfica para proceder de inmunopurificación, o luego de conjugado a una enzima o fluorocromo.

Finalmente, la caracterización de un AcM debe incluir algún criterio inmunquímico de su monoclonalidad. Las técnicas de clonaje, aunque muy eficientes si se realizan adecuadamente y de manera repetida, deben ser complementadas con el uso del isoelectroenfoco. Un AcM



aparece en un gel de isoelectroenfoque como un conjunto discreto de 3-5 bandas que forman una "agrupación" en una zona específica de pH. La presencia de más de una banda se debe al hecho de que no todos los anticuerpos secretados por un mismo hibridoma poseen exactamente el mismo grado de glicosilación. La aparición de más de una agrupación de bandas en zonas de diferente pH es indicativa de que la preparación contiene más de un AcM, el estudio de isoelectroenfoque debe realizarse a partir de AcM purificados de medio de cultivo sin suero, para evitar contaminaciones de inmunoglobulinas foráneas.

DETERMINACIÓN DE LA CLASE Y SUBCLASE

Existen en estos momentos reactivos comerciales de calidad para la determinación de la clase y subclase de Igs de ratón, de rata y humanas. Esta determinación debe realizarse siempre a partir de los sobrenadantes de cultivo de los hibridomas y no de fluidos ascíticos, para evitar la presencia de Igs endógenas del ratón. Para estos fines se han descrito técnicas de aglutinación, electroforesis, tipo ELISA, y de inmunoprecipitación en gel, las dos últimas son las más empleadas.

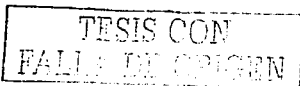
ELISA

Existen distintas variantes de ELISA mediante las cuales puede determinarse la subclase de los AcM, en una de ellas las placas de microtitulación se recubren con el antígeno y luego se incuban con los sobrenadantes de cultivo, posteriormente se añaden anticuerpos policlonales antisubclase de Igs de ratón, conjugados a una enzima marcadora, y se termina con un sustrato apropiado, en caso de que no se posean los anticuerpos antisubclase conjugados puede añadirse un paso más al ELISA, con anticuerpos policlonales conjugados, dirigidos contra las inmunoglobulinas de la especie en la que se fabricaron los anticuerpos específicos de clase y subclase, una tercera posibilidad es comenzar el ELISA recubriendo las placas con anticuerpos anti-inmunoglobulinas totales de ratón, sobre las que se incuban las muestras de sobrenadante, al final se añaden los anticuerpos antisubclases conjugados y se revela la reacción con el sustrato.

INMUNOPRECIPITACIÓN EN GEL

Es probablemente el método más antiguo y sencillo para determinar la subclase de los AcM, sin embargo con respecto al ELISA presenta al menos dos inconvenientes:

1. Es menos sensible, por lo que se requieren cantidades relativamente mayores de los anticuerpos clasificadores y del AcM en cultivo (los sobrenadantes deben ser concentrados entre 5 y 10 veces);
2. Demora entre uno y dos días para tener el resultado final.



Se lleva a cabo en láminas de cristal en las que se deposita una capa de agar sobre la que se abren pocillos, con un patrón de seis en círculo, alrededor de un pocillo central, el fundamento de este método consiste en enfrentar los anticuerpos antisubclase de Igs de ratón con los sobrenadantes de los AcM en un medio semisólido, al cabo de 24 - 48 horas se formarán líneas de precipitación que permiten conocer la subclase a la cual pertenece el AcM

Además de estos procedimientos ya "clásicos", recientemente han aparecido en el mercado juegos de reactivos (*kits*) de alta sensibilidad para el isotipaje de AcM mediante evaluación visual, constan estos de tiras reactivas de nitrocelulosa recubiertas con anticuerpos anti-subclase de IgG de ratón en forma de líneas o *spots*, la tira se incuba con la muestra de un sobrenadante de cultivo y luego con anticuerpos anti-Igs totales de ratón, conjugados a coloideos coloreados (partículas de látex, oro, etc.), la subclase a que pertenece el AcM e incluso el tipo de cadena ligera se determina por simple inspección visual. (5, 8)

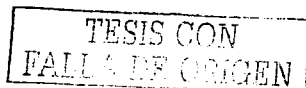
INMUNIZACIÓN *IN VIVO* PARA AcM DE RATÓN

Los esquemas que a continuación se detallan han sido empleados con éxito para la obtención de AcM de ratón pero deben interpretarse sólo como lineamientos generales y tienen que ser adaptados a las particularidades del inmunógeno, la mayoría de los esquemas se diseñan para obtener respuestas secundarias (tipo IgG) de alta afinidad, para ello se emplean bajas concentraciones del antígeno y esquemas de inmunización largos (tres o más dosis).

A pesar de que se considera que los animales con los mayores títulos de anticuerpos son los que más hibridomas específicos darán, no siempre esto se cumple exactamente, aunque poco frecuentes, hay ocasiones en las que los animales hiperinmunizados pueden no responder con un adecuado reclutamiento de células de memoria a la dosis de amplificación (*booster*) que se da pocos días antes de la fusión, dando como consecuencia una baja eficiencia de producción de hibridomas.

Las proteínas solubles de alto peso molecular y los antígenos celulares son buenos inmunógenos, los péptidos sintéticos, debido a su menor peso molecular, son pobres inmunógenos, por lo que es necesario acoplarlos a una proteína portadora (*carrier*) para una adecuada respuesta de anticuerpos específicos en el animal, las proteínas *carrier* más empleadas son la BSA (seroalbúmina bovina) y la KLH (*keyhole limpet hemocyanin*).

Cuando se trata de antígenos T-independientes, como carbohidratos, lipopolisacáridos, etc., es poco frecuente obtener finalmente hibridomas que secreten anticuerpos de tipo IgG.



ESQUEMAS DE INMUNIZACIÓN

A) *Proteínas solubles (rango 6 000-300 000 de peso molecular)*

Día 0. Prepare entre 5 y 50 μg del antígeno (benzoilecgonina, anfetamina y (ácido 11-nor- Δ^9 -THC-9-carboxílico) en solución salina tamponada con fosfatos (PBS), mezclado con adyuvante completo de Freund (FCA) en proporción 1:1 (v/v) para un volumen total de 400-500 μL . La mezcla se agita bien con un agitador rotatorio vertical, o empleando un equipo vortex, también es común preparar esta emulsión empleando dos jeringuillas unidas por las puntas mediante una conexión plástica, y pasando repetidamente la mezcla de una jeringuilla a otra, para comprobar la completa homogeneidad del inmunógeno, puede dejar caer una pequeña gota en un tubo de ensayo con agua destilada, si la misma no se dispersa con facilidad la preparación es adecuada, realice varias inoculaciones subcutáneas (s.c.) en puntos múltiples del lomo del animal.

Día 7. Proceda como en el día 0, pero con adyuvante incompleto de Freund

Días 14 o 21. Proceda como en el día 7.

Días 21 o 28. Extraiga sangre, obtenga suero y evalúe los títulos de anticuerpos específicos. Seleccione los animales con valores por encima de 1:4000 para el siguiente paso.

Día 35. Dé al(los) animal(es) una inmunización intraperitoneal (i.p.) con 50 μg del antígeno en PBS.

Día 38. Realice la fusión.

En este esquema se pueden introducir al menos 3 variantes:

1. *Boosters* i.p. idénticos los días 35, 36 y 37, para fundir el día 38 (ello puede ser conveniente para asegurar un buen grado de estimulación pre-fusión en animales con título medio).
2. Dividir las inoculaciones del esquema en inyecciones s.c. e i.p. con esta variante pueden aparecer adherencias en el bazo, que hacen difícil su extracción, así como una estimulación muy fuerte de las células del estroma y monocitos de este órgano, que llegan a cubrir la superficie de crecimiento de los pozos después de la fusión y pueden afectar a los hibridomas inipientes.
3. Para algunas proteínas con alta capacidad inmunogénica, dar la inmunización del día 0 y luego de un mes de reposo, *boosters* como se recomienda en (1).

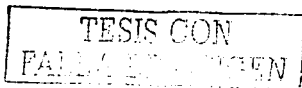
Observaciones

1. La evaluación del título de anticuerpos específicos en el suero de los animales debe realizarse por el mismo procedimiento que se empleará en el tamizaje primario de los hibridomas, este procedimiento debe estar completamente establecido antes de proceder a realizar la fusión.
2. Para esta evaluación extraiga sangre del animal por la vena de la cola o a través del plexo retroorbital.
3. Se ha visto que con células intactas el *booster* e.v. final es muy conveniente, pero debe tenerse la destreza suficiente para no matar al animal por embolismo, para la inoculación endovenosa a través de la vena caudal del ratón es conveniente fabricar un dispositivo de inmovilización del animal, con una "cámara" de retención (por ejemplo, un pedazo de tubería plástica, con un extremo cerrado por un ventanal), de dimensiones tales que se restrinja al máximo el movimiento del ratón y la cola quede libre por el extremo abierto, la retención del ratón en el plano horizontal se puede hacer con la ayuda de calzos de algodón, la vena caudal (central) se visualiza preferiblemente con el ratón sobre su dorso, su dilatación se puede provocar mediante frotamiento con xilol, o sometiendo la cola a calor.
4. Para la inoculación e.v. por el plexo retroorbital, la cabeza del animal debe ser sujeta sobre un lado con ayuda de los dedos y sobre una superficie plana, de esta forma se produce una cierta protrusión del globo ocular, y se pone en evidencia el plexo retroorbital, por la zona del lagrimal. Con una aguja fina se perfora el borde hasta una profundidad de 1-2 mm llegándose al plexo.
5. Si emplea células bacterianas, o parásitos, es conveniente inactivar las preparaciones previamente.

INMUNIZACIÓN DE LOS ANIMALES

Puede emplearse un esquema de inmunización similar al descrito para proteínas solubles.

En el proceso de determinación del título de anticuerpos específicos en el suero del animal y luego, en el tamizaje inicial de los AcM, hay que tener en cuenta que uno de los principales problemas de la inmunización con péptidos es la frecuencia con que se obtienen anticuerpos que no reconocen a la proteína original, también es frecuente que se obtengan anticuerpos de baja afinidad, con predominancia de la clase IgM, por ello, el sistema de tamizaje debe contemplar todas estas posibilidades.



HIBRIDIZACIÓN CELULAR MEDIANTE FUSIÓN

Los elementos recogidos en esta practica permiten una gran repetibilidad en los experimentos de fusión, y en la conservación posterior de los hibridomas.

Es muy conveniente preensayar el medio de cultivo y los aditivos con otros cultivos de hibridomas o el propio mieloma, y separar los lotes en cantidad suficiente para el trabajo que se realizará, desde el momento de la fusión, hasta la congelación de los primeros hibridomas (unas 3-4 semanas), disponer de lotes preensayados de polietilenglicol y otros elementos para el medio selectivo es también clave para el resultado de la fusión, debido a que existen fabricantes que producen estos componentes con una garantía de calidad, el costo más elevado de esta opción se compensa con la seguridad y repetibilidad del trabajo.

Equipos y reactivos

1. gabinete de flujo laminar, incubadora de CO₂, microscopio invertido, microscopio óptico.
2. centrifuga, baño de agua a 37° C.
3. polietilenglicol (PEG, Sigma, 1300-1600 P7777), hipoxantina, timidina, aminopterina (HAT 50x, Sigma, H0262)
4. hipoxantina, timidina (HT 50x, Sigma H0137), dimetilsulfóxido (DMSO), alcohol al 70%.
5. medios de cultivo y aditivos

Materiales

1. guantes de cirugía
2. instrumental quirúrgico, placas petri
3. tubos de centrifuga de 50 mL.
4. jeringuillas de 5- 10 mL.
5. agujas No. 21 y 23.
6. material básico de cultivo.
7. placas de cultivo de 96 pozos.
8. pipetas de 1, 5 y 10 mL estériles.
9. pipeta automática variable de 8 o 12 canales (50-300 µL).
10. puntas desechables estériles.

Soluciones Básicas

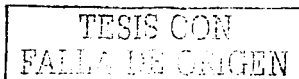
PEG: Se emplea de manera rutinaria con buenos resultados el PEG 1300-1600 (preensayado) de Sigma. El mismo se derrite en baño de María a unos 50-60° C, se diluye hasta 42-43% final (v/v) con medio de cultivo del tipo Eagle Modificado por Dulbecco (DMEM) sin suero, a 45° C, y se distribuye a razón de 0.5 mL por vial. El pH final debe quedar ligeramente alcalino (7.5 - 8.0), por lo que los viales deben mantenerse unos 10 minutos sin cerrar en el gabinete de flujo laminar, hasta que la solución de PEG adquiera una coloración rojizo-violeta. Esta solución de PEG puede mantenerse a 4° C por lo menos hasta 6 meses.

Stock HT: La solución HT 50X de Sigma viene lista para el uso, en forma líquida, y se conserva congelada hasta su empleo (a partir de ese momento no es conveniente recongelar, sino mantener a 4° C). Si esta solución se desea fabricar a partir de componentes individuales, prepare un stock 100x de HT (10 mM de hipoxantina y 1.6 mM de timidina) como sigue: se disuelven 136.1 mg de hipoxantina y 37.8 mg de timidina en 100 mL de agua destilada y desionizada y se permite la disolución a 50-60° C durante aproximadamente 1 hora. Se esteriliza por filtración a través de 0.2 μ m y se envasa en alícuotas, almacenándose a -20° C.

Stock HAT: La solución HAT 50X de Sigma viene lista para el uso, en forma líquida, y se conserva congelada, hasta su empleo (a partir de ese momento no es conveniente recongelar, sino mantener a 4° C). Si se desea fabricar a partir de componentes individuales, puede prepararse un stock de aminopterina 100X (4 x 10⁵ M): disuelva 0.9 mg de aminopterina en 50 mL de agua destilada y desionizada. Si no se disuelve fácilmente, añada algunas gotas de NaOH 1 N. Esterilice por filtración a través de 0.2 μ m y envase en alícuotas, almacenándolas a -20° C. Proteja de la luz. Para preparar el HAT emplee la mezcla de las soluciones HT y A.

Medio de lavado (ML): se puede emplear cualquier medio de cultivo o solución balanceada de sales, suplementados con doble concentración de los antibióticos empleados de rutina en el laboratorio (80 μ g/mL de gentamicina, o 200 U-200 μ g/mL de penicilina-estreptomicina). Generalmente se utilizan alrededor de 200 μ L de este medio para una fusión.

Medio de cultivo (MC): Varios tipos de medio han sido empleados con éxito para el cultivo de hibridomas, entre ellos: RPMI 1640, DMEM, el DMEM modificado por Iscove, y la mezcla 1:1 de DMEM y Ham F12, todos estos comerciales. Estos medios son suplementados con varios aditivos y suero. El suero puede ser bovino (de varias calidades: fetal, neonato, donante), de caballo, o de conejo, y es común inactivarlo 30 minutos a 56° C antes de su uso. El suero debe ser siempre preensayado para evaluar su capacidad de promover el crecimiento de mielomas e hibridomas (ver inciso E). Se han empleado con éxito las siguientes formulaciones de medio:



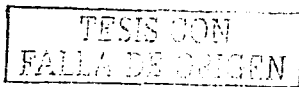
- a) RPMI-1640, suplementado con 1 g/L de CO_3HNa , 15 mM de HEPES, 5×10^2 M de 2-mercaptoetanol, 1 mM de piruvato de sodio, 2 mM de L-glutamina, 100 μg -100 U/mL de estreptomycin-penicilina o 40 μg /mL de gentamicina y 8-10% de suero fetal bovino.
- b) DMEM, suplementado con 18 mM de HEPES, 26 mM de CO_3HNa y el resto de los componentes ya descritos para (a).

Medios HAT y HT: La composición de estos medios es exactamente igual a la de los descritos arriba, pero adicionando el por ciento correspondiente de los stocks de HAT o HT. El medio selectivo HAT debe ser ensayado 3-4 días antes de realizar la fusión, para detectar toxicidad y efectividad. Para ello se siembran por duplicado células del mieloma murino y de cualquier hibridoma establecido, en el medio de cultivo de mantenimiento (es decir, sin la adición de H, T y A) y en el medio HAT. A las 48-72 horas las células del mieloma deben haber muerto en el medio HAT, mientras que el hibridoma debe haber sobrevivido; en este último caso el crecimiento puede no ser muy vigoroso o comparable con el del control sin HAT, pues se ha observado que una vez que los hibridomas se mantienen en medio libre de HAT, la adición de aminopterina puede provocar cierta toxicidad inicial reversible.

Procedimiento

A) Preparación de, las células esplénicas

1. Antes de proceder al sacrificio del ratón BALB/c seleccionado por su título de anticuerpos, realice una extracción de sangre (mediante, punción cardiaca o a través del plexo retroorbital,) con vistas a obtener un suero policlonal que servirá de control positivo en el tamizaje posterior de los hibridomas obtenidos.
2. Sacrifique el animal por dislocación cervical y sumérjalo en alcohol al 70%. Páselo al área de trabajo estéril y proceda a extraer el bazo empleando tres juegos de tijeras y pinzas estériles.
3. fije las extremidades del animal mediante agujas, con el abdomen del ratón hacia la mesa y ligeramente recostado sobre el lado derecho.
4. limpie con alcohol al 70% todo el lado izquierdo del animal.
5. con el primer juego de instrumentos tome la piel, aproximadamente a 1 cm de la zona subcostal y haga una incisión superficial perpendicular al eje del animal. Decole hasta visualizar el bazo a través de la pared muscular.

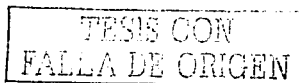


6. lave el campo con etanol al 70% y empleando otro juego de instrumentos, corte la pared para exponer el bazo, que aparece como un órgano elongado y rojo oscuro, sobre el estómago. Con el tercer juego de instrumentos, libere el bazo, cuidando no perforar el estómago.
7. sumerja el bazo recién extraído en un tubo de centrifuga de 50 mL, que contenga 25 mL de ML.
8. Con unos fórceps estériles, coloque el bazo sobre una malla metálica de 60 mesh y libere las células presionando con el émbolo de una jeringuilla plástica estéril y hacia una placa de petri, goteando continuamente con ML. La liberación de los linfocitos se puede realizar también mediante la perfusión del bazo con ML; para ello, haga un pequeño corte en uno de los extremos del órgano y perfunda por el otro con ayuda de una aguja No. 21 o 23.
9. Transfiera la suspensión celular desde la placa petri a un nuevo tubo de centrifuga de 50 mL y pipetee repetidamente esta suspensión (6-7 veces) hasta disociar los grumos celulares. Elimine los fragmentos restantes dejándolos decantar durante 3 minutos. Recupere el sobrenadante.
10. Complete el sobrenadante hasta 50 mL con ML y centrifugue 10 minutos a temperatura ambiente y 1 100 rpm en una centrifuga de mesa.
11. Deseche el sobrenadante y resuspenda el botón con 25 mL de ML.
12. Complete hasta 50 mL con ML y centrifugue como se recomienda antes.

B) Preparación de, las células de mieloma

La línea celular de mieloma murino que se empleará como pareja de fusión (por ejemplo, P3/X63-Ag8-653, Sp2/O-Ag14, NSI/I, etc.) debe haberse mantenido en crecimiento exponencial en su medio habitual (entre 2 y 5 x 10⁵ células/mL). En dependencia de la cepa de mieloma, es normal encontrar células viables en suspensión y adheridas a la superficie del frasco. Para su cosecha:

1. Se recogen las células que hayan crecido en suspensión por decantación en un tubo de centrifuga de 50 mL. Mediante pipeteo fuerte de ML contra la superficie del frasco de cultivo (describiendo un movimiento en abanico) se desprenden las células que permanecieron adheridas, y se mezclan con las anteriores. También es posible cosechar las células adherentes mediante un golpe único de la mano en el canto del frasco.
2. La suspensión celular se centrifuga a 1 000 rpm durante 10 minutos a temperatura ambiente.



3. Se decanta el sobrenadante, se resuspenden las células en ML, se hace una dilución 1:10 con tripán azul y se cuenta en cámara de Neubauer. Un frasco de 75 cm², con 30 mL de medio y células en crecimiento exponencial, puede producir unos 10-15 x 10⁶ mielomas.

C) *Fusión celular*

1. Mezcle en un mismo tubo de centrifuga de 50 mL los linfocitos y mielomas en proporción 10:1. Complete hasta 50 mL con ML y centrifugue a 1000 rpm durante 10 minutos a temperatura ambiente. La proporción de 10:1 recomendada es la más empleada, aunque hay autores que utilizan 5:1 y 2: 1.
2. Se decanta muy bien el sobrenadante y proceda a disgregar totalmente el botón celular con golpes ligeros contra la superficie de trabajo.
3. Añada 0.5 mL de PEG, al 42% (suficiente para una mezcla de 10⁸ células esplénicas y 10⁷ mielomas) precalentado a 37° C, gota a gota, durante 1 minuto agitando el tubo de centrifuga para lograr una mezcla adecuada. Puede emplear para ello la mano o un vortex a muy baja velocidad.
4. Adicione 5 mL de ML precalentado, durante 3 minutos y manteniendo la agitación, para seguir con 15 mL más de ML en el próximo minuto.
5. Centrifugue a 1 000 rpm y 1 0 minutos a temperatura ambiente.
6. Elimine el sobrenadante cuidadosamente, añada suficiente medio HAT como para hacer una suspensión de 5 x 10⁵ células por mL, y resuspenda suavemente el botón celular mediante pipeteo. En este momento se añaden las células alimentadoras necesarias en el menor volumen posible y se siembra a razón de 10⁵ células fundidas por pozo (200 µL/pozo) en placas de cultivo de 96 pozos. Las células se incuban a 37° C en atmósfera húmeda con 5% de CO₂.

Observaciones

1. Una fusión corriente se realiza con unas 1.1 x 10⁸ células totales, que se distribuyen en 10 placas de 96 pozos. El crecimiento de células híbridas puede observarse, en dependencia del mieloma parental, entre 4 y 7 días después de realizada la fusión.
2. Es conveniente incluir en una de las placas una hilera con una suspensión del mieloma a la misma densidad celular (10⁴ células/pozo) para chequear el medio selectivo HAT.

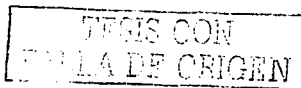
D) Mantenimiento de, los cultivos de hibridomas en la placa original

El mantenimiento de los cultivos se lleva a cabo mediante la remoción de una proporción variable del medio de cultivo seguida de la adición de igual volumen de medio fresco. Este cambio de medio persigue dos propósitos fundamentales: primeramente, la remoción de los productos de desecho y la reposición de nutrientes; en segundo lugar, la dilución gradual de cualquier anticuerpo secretado por las células linfoides normales (no fundidas) que se mantienen vivas durante algunos días, aunque tales anticuerpos se encuentran a concentraciones relativamente bajas.

El primer cambio de medio (50%) puede hacerse luego a los 3-4 días de realizada la fusión, mientras que el mantenimiento posterior dependerá de la velocidad del crecimiento celular. A medida que la densidad celular vaya aumentando, el pH del medio se tomará más ácido, y serán necesarios cambios de medio cada vez más frecuentes. Cuando las células cubren entre 1/2 y 2/3 de la superficie de cultivo, se deben comenzar los ensayos de los sobrenadantes para la detección de anticuerpos específicos.

Debe tenerse en cuenta que para continuar con la expansión y/o el clonaje, los sobrenadantes deben haber sido ensayados para su positividad en no menos de dos pruebas independientes. Es conveniente hacer una "réplica" de los cultivos que resulten positivos de los primeros ensayos de anticuerpos, en otra placa de microtitulación, ya que en este momento los híbridos están a alta densidad en los pozos originales, por lo que deben manipularse frecuentemente y hay un mayor riesgo de contaminación. Las réplicas se hacen a menor densidad celular resuspendiendo suavemente el pozo con una pipeta de 100 μ L, transfiriendo 10-20 μ L a una nueva placa y completando hasta 200 μ L con medio fresco HAT. El medio HAT debe eliminarse mediante dilución progresiva con medio HT, luego de 10- 15 días de realizada la fusión. El medio HT debe continuar empleándose durante algún tiempo antes de pasar a utilizar el medio de cultivo usual (sin aditivos de selección), de nuevo por dilución progresiva en cada cambio habitual. Esto se debe a que la constante de inhibición (K_i) de la aminopterina para la dihidrofolato reductasa es menor que 10^9 M, mientras que la concentración de este agente bloqueador en el medio de cultivo es de 4×10^7 M, por lo que es necesario disminuir varias veces su concentración en el medio para que la enzima se reactive. Por otra parte, la aminopterina es metabolizada muy lentamente, por lo que es necesario cambios frecuentes de medio para lograr su total eliminación, y la adición de hipoxantina y timidina durante varios días.

Por último, una vez que han sido seleccionados los cultivos de hibridomas secretores de anticuerpos específicos, es posible pasar a los procedimientos de clonaje a partir del pozo original, o de la réplica (siempre que se demuestre que ésta conserva la misma actividad).



Simultáneamente es conveniente expandir el pozo original o la réplica a un pozo de una placa de 24 cavidades, y una vez cubierta la superficie de crecimiento, a frascos de 25 cm². Siga siempre la regla de no diluir las células por debajo de unas 10⁵ células/mL al expandir. Es conveniente conservar mediante la congelación las células del pozo original, del clon final seleccionado como importante, y de uno de sus "hermanos" en el segundo clonaje .

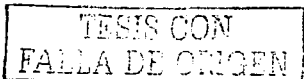
CLONAJE DE HIBRIDOMAS

El paso que asegura el carácter monoespecífico de las inmunoglobulinas secretadas por un cultivo de hibridomas es su clonaje, es decir, la creación de una población celular a partir de una célula única inicial. La importancia de este paso es tal que es rutinario clonar repetidamente (2-3 veces) un hibridoma, antes de considerar los anticuerpos producidos como monoclonales. En parte, esto último se debe a que ninguno de los métodos convencionales de clonaje pueden asegurar totalmente, en un solo experimento, que la población celular se haya derivado de una única célula, por lo que la repetición del procedimiento aumenta la probabilidad de que esto sea así.

Se describirá el método más empleado para el clonaje de hibridomas: (A) la dilución limitante

Reactivos, materiales y equipamiento

1. baño de termostato a 42° C
2. placas de microtitulación de 96 pozos, para cultivo
3. placas Petri de 60 x 15 mm.
4. medio de cultivo completo (MC; medio RPMI 1640, suplementado con 1 g/L de NaHCO³, 3 g/L de HEPES, 2 mM de L-glutamina, 1 mM de piruvato de sodio, 0.05 mM de 2-mercaptoetanol, 15-20% de suero fetal bovino, 40 µg/mL de gentamicina), y sobrenadantes o células alimentadoras. (3-5% de sobrenadante de células endoteliales de cordón umbilical humano, o 5- 10% de sobrenadante de la línea J774A. 1 de macrófagos de ratón, o 10⁶ células esplénicas obtenidas de un ratón BALB/c no inmunizado/mL)
5. cámara contadora de Neubauer
6. solución de tripán azul
7. bacto agar Difco.
8. tubos de vidrio tipo Kahn o similares de plástico.
9. pipetas Pasteur o automáticas variables de 50-300 µL.
10. microscopio óptico e invertido, incubadoras de CO₂, gabinete de flujo laminar



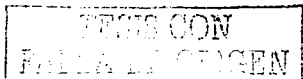
Procedimiento

Dilución limitante

1. Resuspenda el hibridoma de interés a partir del pozo original, o de su cultivo de expansión, y estime la concentración mediante conteo en cámara de Neubaer. Considere en el conteo sólo células con buena viabilidad, estimada por tripan azul.
2. Prepare las siguientes tres diluciones de la suspensión original: (a) 50 células/mL de MC, (b) 5 células/mL de MC y (c) 2.5 células/mL de MC.
3. Siembre 200 μ L de la suspensión (a) en la primera hilera de 12 pozos de la placa de microtitulación, 200 μ L de (b) en las siguientes cuatro hileras y 200 μ L (c) en las siguientes tres hileras. Incube por 2-3 semanas a 37° C y 5% CO₂. Emplee como mínimo una placa de microtitulación para cada hibridoma a clonar. A partir de las 48-72 horas añada MC a cada pozo para compensar la pérdida de volumen por evaporación(si emplea células esplénicas como "capa alimentadora" No es necesario añadir más células).
4. Ensaye los sobrenadantes para anticuerpos específicos solo en aquellas filas diluciones donde el número de pozos con crecimiento de hibridomas sea inferior al 63% del total de pozos sembrados. Excluya del ensayo aquellos pozos con más de una colonia (que posean tamaños semejantes).

Observaciones

1. La base teórica del clonaje por dilución limitante se basa en la distribución de Poisson, de esta forma, si el 37% de los pozos no muestran crecimiento de colonias, entonces es alta la probabilidad de que los que sí lo presentan se deriven de células únicas, este principio teórico se debe adaptar al hecho práctico de que el cultivo original positivo no debe perderse, por lo que el investigador puede realizar el primer clonaje con un criterio menos estricto, para una vez rescatados e identificados los pozos positivos, ejecutar clonajes más rigurosos, de hecho, por esta razón es que se incluye en el clonaje una hilera donde se siembran 10 células por pozo y de la cual, de resultar negativos el resto de los pozos sembrados a menor densidad, se puede partir para un posterior clonaje, luego de comprobada la presencia de anticuerpos específicos en el sobrenadante.
2. Los experimentos de clonaje sucesivos deben continuarse hasta que más del 90% de los pozos den positividad al anticuerpo deseado, de esta forma se asegura que la célula parental tiene suficiente estabilidad para esta propiedad.



CRIOPRESERVACIÓN DE MIELOMAS E HIBRIDOMAS

El desarrollo de procedimientos efectivos para la criopreservación de células de mamíferos permitió sin dudas el avance ulterior de la tecnología de cultivo celular. La congelación no sólo permite la conservación y el empleo de líneas celulares con crecimiento limitado en cultivo, sino que ha sido determinante también para la preservación de las líneas celulares con propagación infinita en cultivo (*infinite life-span in culture*). En estas últimas, la generación de sublíneas por selección progresiva y la contaminación por microorganismos hacen imposible en la práctica mantener un mismo cultivo indefinidamente.

Los mielomas e hibridomas tienen teóricamente capacidad de propagación infinita en cultivo. No obstante, hemos argumentado el por qué la criopreservación es imprescindible para mantener la homogeneidad de comportamiento de ambas poblaciones celulares. La preservación de las células es óptima y por muchos años a -196°C (nitrógeno líquido). A -70°C es posible mantener "bancos" celulares durante aproximadamente un año y más, sin pérdidas importantes de la viabilidad y la vitalidad.

Desde el punto de vista de los procedimientos de congelación, los mielomas e hibridomas son células "nobles", que soportan un rango importante de variación en las condiciones de la técnica. Los parámetros más importantes son la composición del medio de congelación, con un crioprotector que impida que el agua se cristalice en el interior de las células (habitualmente dimetilsulfóxido), un alto porcentaje de suero en el medio que aporte proteínas con efecto "protector", y el descenso gradual de la temperatura, a no más de 1°C por minuto, hasta alcanzar alrededor de -40°C . A partir de ese momento, los cambios de temperatura bruscos no parecen influir en la viabilidad y vitalidad celular, por lo que los viales pueden ser transferidos directamente a nitrógeno líquido. En la criopreservación, que incluye la descongelación posterior de las células, se puede producir una selección de variantes celulares más resistentes al procedimiento. Es por ello que la atención a la viabilidad inicial y al descongelar, es muy importante.

Reactivos, materiales y equipamiento

1. suero bovino preensayado (fetal, sin calostro o donante, inactivado a 56°C por una hora)
2. dimetilsulfóxido de calidad para cultivo (DMSO)
3. medio de cultivo habitual de mantenimiento
4. viales plásticos de criopreservación, rotulables, de 2 mL
5. caja de poliespuma (poliuretano expandido) con paredes de 1.5 cm de grosor
6. congelador de -70°C , tanques con nitrógeno líquido

7. gabinete de flujo laminar, microscopios óptico e invertido

Procedimiento

(A) Congelación

1. Suspensa en condiciones de esterilidad las células del hibridoma o mieloma (o las recién obtenidas del ascitis tumoral) en medio de mantenimiento fresco y centrifugue a 1 000 rpm por 5 minutos. Calcule la viabilidad por tripán azul y no trabaje células con menos del 95% de viabilidad. Resuspenda el botón a concentraciones entre 1 y 10×10^6 células/mL en medio de cultivo a 4°C , que contiene 20-30% de suero bovino preensayado y 10% de DMSO. Alternativamente, prepare la suspensión celular sin DMSO, y añada éste lentamente, gota a gota, y con agitación constante.
2. Trabajando en el gabinete de flujo laminar, deposite 1-1.5 mL de suspensión en cada vial debidamente rotulado (sobre baño de hielo) y guarde a -70°C en la caja de poliespuma. Luego de 24 horas, pase los viales directamente a nitrógeno líquido.

(B) Descongelación

1. Transfiera el vial desde el congelador de -70°C o el nitrógeno líquido a un beaker con agua estéril a 37°C .
2. Una vez descongelado su contenido, diluya hasta 20 mL con medio de mantenimiento (con 20% de suero), y centrifugue a 800-900 rpm por 5 minutos para eliminar el DMSO. Mientras centrifuga, calcule y registre la viabilidad por conteo de tripán azul. Siembre en frascos adecuados al número de células originalmente congeladas, a razón de no más de 2×10^5 ni menos de 10^5 células/mL. A partir de las 24 horas realice cambios de medio con el medio de mantenimiento habitual (con 20% de suero), para eliminar los restos de células muertas. Reduzca el suero a 10% a partir de los dos-tres días en cultivo.

Observaciones

1. En estas condiciones, la viabilidad al descongelar debe ser superior al 80%. Este parámetro y el progreso ulterior del cultivo (vitalidad) no están directamente relacionados, por lo que es muy importante examinar dos veces al día las células descongeladas en las primeras 48 horas, y diariamente, a partir del tercer día.
2. Para algunos hibridomas es preferible emplear 90% de suero y 10% de DMSO.

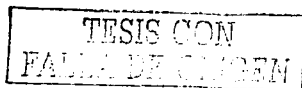
3. Las dimensiones de la "caja de congelación" son poco importantes, siempre que las paredes tengan el grosor recomendado, y el espacio libre sin viales no sea muy grande. Existen equipos sofisticados que permiten controlar la congelación celular, pero la mayoría de los laboratorios emplean contenedores de poliespuma (poliuretano), o simplemente envuelven los viales en varias capas de algodón de uso común. Las cajas de congelación de confección artesanal permiten una mejor reproducibilidad.
4. Al congelar un lote de viales para bancos celulares debe anotarse la viabilidad inicial y ensayar la calidad del lote descongelando una muestra.
5. Si el hibridoma tiene problemas en su recuperación y proviene de una congelación única temprana, puede ser conveniente pasar las células recién descongeladas a placas de microtitulación de 96 pocillos.
6. Las congelaciones a partir de células provenientes directamente del ascitis recién cosechado deben ser "reactivadas" en cultivo antes de su reinoculación al animal. No en todas las ocasiones es posible realizar el trasplante directo a los ratones, a partir de células congeladas por el método descrito.
7. En condiciones extremas es posible congelar los hibridomas recién obtenidos en la misma placa original. Para ello se elimina la mayor cantidad de medio posible, y se añade medio de congelación, las placas se sitúan en la caja de congelación a -70°C . Para descongelar, las placas sitúan a temperatura ambiente y se hace un cambio de medio al descongelarse, y otro a las 4 horas.

TAMIZAJE DE AcM POR ELISA

Los métodos inmunoenzimáticos en fase sólida (ELISA) son de los más utilizados para la detección de la presencia de anticuerpos específicos en el sobrenadante de cultivo de hibridomas, debido a su alta sensibilidad, especificidad y posibilidad de análisis de un gran número de muestras de manera relativamente sencilla.

En esta practica veremos dos variantes muy empleadas en el tamizaje de los sobrenadantes:

1. Sistema ELISA donde el antígeno (Ag) se fija directamente a pocillos de una placa de microtitulación, generalmente de poliestireno (PE) o cloruro de polivinilo (PVC), y posteriormente se añaden los sobrenadantes de los hibridomas a probar.
2. Sistema ELISA tipo *sándwich*, donde en un primer paso se recubre la fase sólida con una preparación policlonal de anticuerpos contra el Ag (producidos en una especie diferente al



ratón), posteriormente se añade el Ag y luego los sobrenadantes de los cultivos de hibridomas.

La variante (A) es sencilla y útil, pero debe tenerse en cuenta que la unión e interacción del antígeno con la superficie sólida puede "enmascarar" algunos determinantes antigénicos, o por el contrario, "crear" otros que no están representados en el antígeno en su forma soluble.

En el primer caso se puede producir la no detección y por lo tanto la pérdida de algunos anticuerpos específicos, en el segundo caso se produciría la selección de anticuerpos que luego no serían útiles para la detección del antígeno en solución.

En ambas variantes se adicionan anticuerpos anti-inmunoglobulinas de ratón, conjugados con peroxidasa u otra enzima marcadora, luego de la muestra, y por último se procede al revelado de la reacción añadiendo un sustrato apropiado.

Materiales, reactivos y equipamiento

1. Placas o tiras de microtitulación para ensayos inmunoenzimáticos (EIA), de PE o PVC (Nunc, Costar, Greiner, Falcon, Labssystem, Dynatech, etc.)
2. tampón de recubrimiento (TR): 1.5 g Na_2CO_3 ; 2.93 g NaHCO_3 ; 0.2 g de NaN_3 ; en un litro de agua destilada, pH=9.6
3. solución de lavado (SL): PBS-Tween 20 al 0.05%; 8.0 g NaCl; 0.2 g KH_2PO_4 ; 1.28 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$; 0.2 g KCl; 0.5 n-d de Tween-20; para un litro de agua destilada, pH=7.4. Es posible utilizar como SL H_2O -Tween 20 al 0.05%
4. solución de bloqueo: PBS con 1% BSA o 1% de leche desgrasada
5. tampón sustrato (TS): 24,3 mL de ácido cítrico 0.1 M (19.2 g/l) + 25.7 mL de fosfato de sodio 0.2 M (28.4 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{l}$), pH=5
6. solución de sustrato: disolver inmediatamente antes de su uso, 4 mg de ortofenilendiamina (OPD), en 10 mL de TS y añadir 5 μL de peróxido de hidrógeno al 30%
7. solución de detención: ácido sulfúrico 2.5 M
8. lector de placas de ELISA con filtro de 492 nm
9. pipetas multicanales variables de 50-250 μL y accesorios

Procedimiento

Variante (A)

1. Recubra una placa (o tiras) de PE o PVC depositando 100 μ L por pozo de una solución con una concentración del antígeno (Ag) entre 1-10 mg/mL, en TR. Incube en cámara húmeda durante la noche a 4° C o 3 horas a 37° C.
2. Lave la placa tres veces con la SL, el lavado puede realizarse con un lavador automático (tres cielos de 200 μ L) o manualmente, empleando para ello una pipeta multicanal o simplemente un frasco lavador.
3. Bloquee los posibles sitios libres en los pocillos añadiendo 150 μ L/pozo de la solución de bloqueo e incubando 1 hora a 37° C en cámara húmeda.
4. Lave 3 veces como en 2.
5. Añada 100 μ L por pozo de cada sobrenadante de los cultivos de hibridomas e incube durante 1-2 horas a 37° C o toda la noche a 4° C.
6. Lave cinco veces como en 2
7. Añada 70-100 μ L/pozo del conjugado anti-inmunoglobulinas de ratón/peroxidasa e incube durante 1 hora a 37° C.
8. Lave cinco veces como en 2.
9. Añada 100 μ L/pozo de la solución de sustrato y espere el desarrollo de color (amarillo) durante 20-30 minutos.
10. Detenga la reacción añadiendo 50 μ L/pozo de la solución de detención.
11. Determine la absorbancia empleando un lector de placas/tiras de ELISA con filtro de 492 nm.

En cada serie de determinaciones deben incluirse controles:

Controles positivos (a seleccionar):

- a) Sobrenadante de hibridomas secretores de AcM específicos.
- b) Suero del animal inmunizado, adecuadamente diluido.
- e) Anticuerpos específicos purificados o en forma de líquido ascítico.

Controles negativos (sugeridos):

- a) Sobrenadantes de hibridomas no relacionados.
- b) Suero del animal preinmune.
- e) Medio de cultivo.

Observaciones

1. La selección de la concentración del Ag está en dependencia de la disponibilidad y de la pureza de la preparación que se tenga para determinar las condiciones óptimas debe hacerse un estudio previo con distintas concentraciones del Ag y diluciones seriadas del suero del animal inmunizado que se utilizó en la fusión, el cual servirá como control positivo en el ELISA.
2. En algunos casos se recomienda emplear los sobrenadantes diluidos 1:2-1:5 para evitar problemas de fondo y para la selección de anticuerpos de alta afinidad.
3. Puede utilizarse un conjugado anti-IgG de ratón-peroxidasa, específico para cadena pesada gamma, si solo desean seleccionarse AcMs de esta clase y no de clase IgM.
4. En algunos casos es conveniente recubrir tiras con Ags diferentes al empleado en la inmunización, este tipo de control permite identificar aquellos hibridomas secretores de inmunoglobulinas de tipo IgM "pegajosas" con amplia reactividad cruzada, que no son infrecuentes en el marco de una fusión.

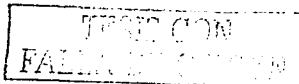
Variante (B)

1. Recubra tiras o placas de microtitulación de PE añadiendo 100 μ L/pozo de una solución de anticuerpos policlonales contra el Ag en cuestión, a una concentración de 10 μ g/mL en TR durante toda la noche a 4° C o 3 horas a 37° C.
2. Bloquee como para la variante (A).
3. Adicione la solución del Ag a una concentración establecida, en PBS, e incube durante 2 horas a 37° C.

A partir de aquí el proceso sigue igual que para la variante (A).

DETERMINACIÓN DE CLASE Y SUBCLASE DE AcM

En el proceso de caracterización de un AcM uno de los aspectos fundamentales es conocer la clase y subclase (o sea, el isotipo de la Ig), esta determinación se realiza en etapas tempranas del desarrollo de un AcM, pues frecuentemente es relevante para su empleo final.



Con el conocimiento de clase y subclase también se simplifica la purificación, especialmente cuando se emplea la cromatografía de afinidad por proteína A, donde existe un claro patrón de pH para la elusión de, las diferentes subclases de la IgG de ratón

La isotipificación de los AcM *debe realizarse siempre* a partir del último sobrenadante de cultivo y no a partir de fluido ascítico, pues en este último caso aparecen como contaminantes las inmunoglobulinas endógenas del animal en el cual se produjo el fluido ascítico.

Se describirá la técnica desarrollada por Ouchterlony y Niessen para la determinación de la clase y subclase de un AcM, mediante la inmunoprecipitación en gel de agar así como el empleo de una técnica ELISA, con estos fines.

B) ELISA

Este ELISA contempla varios pasos (a) recubrimiento del soporte sólido con el antígeno, (b) incubación con los sobrenadantes de cultivo, (c) incubación con los antisueros anti-subclase de Ig de ratón, (d) incubación con un antisuero anti-Ig de la especie empleada en (e) marcado enzimáticamente (e) revelado de la reacción con sustrato apropiado.

Otra posibilidad es reducir las tiras de los anticuerpos específicos anti-subclase de Ig de ratón, luego añadir los sobrenadantes de los hibridomas y posteriormente anticuerpos anti Igs totales de ratón (que reconozcan todas las subclases) marcados enzimáticamente. El revelado de la reacción se realiza como en el procedimiento anterior.

Reactivos, equipamiento y materiales

Placas de ELISA de microtitulación

Solución de antígeno

Soluciones tampón de recubrimiento, sustrato, lavado y detención utilizadas y descritas anteriormente.

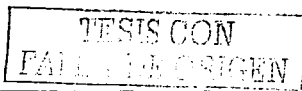
Antisuero de conejo anti-subclases de Ig de ratón

Antisuero anti-Ig de conejo-peroxidasa

Lector de placa de ELISA con filtro de 492 nm

Procedimiento

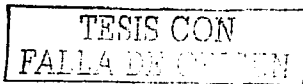
1. Recubra una placa de microtitulación con el antígeno en las mismas condiciones que fueron establecidas para el tamizaje de los hibridomas.



2. Bloquee cada pozo con 150 μ L de PBS con BSA o leche desgrasada al 1% durante una hora a 37° C.
3. Lave la placa tres veces con PBS/Tween 0.05%.
4. Añada 50-100 μ L de los sobrenadantes de hibridomas e incube 2 horas a temperatura ambiente o toda la noche a 4° C. Utilice para cada sobrenadante una columna de la placa de titulación.
5. Lave la placa como en 3.
6. Añada 50-100 μ L de los antisueros anti-subclases de Ig de ratón en conejo e incube por una hora a temperatura ambiente. Utilice para cada antisubclase una fila de la placa de microtitulación (tantos pocillos como sobrenadantes de hibridomas a analizar).
7. Lave como en 3.
8. Añada 50-100 μ L del antisuero anti-Ig de conejo marcado con peroxidasa. Incube una hora a temperatura ambiente.
9. Lave 5 veces como en 3.
10. Añada la solución de sustrato e incube 20-30 minutos a temperatura ambiente.
11. Detenga la reacción con 50 μ L de la solución de detención.
12. Determine la subclase de los AcMs por simple inspección y/o empleando un lector de placas con filtro de 492 nm.

Observaciones

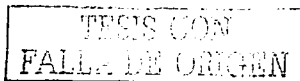
1. Esta técnica es más sensible que la de inmunoprecipitación en agar y más apropiada cuando se trata de ensayar un gran número de sobrenadantes de hibridomas. Tampoco requiere sobrenadantes concentrados.
2. Debido a que los anticuerpos anti-subclase tienden a dar una débil reacción cruzada con otras clases, a veces es necesario hacer diluciones seriadas de los sobrenadantes a estudiar.
3. Existen en el mercado kits comerciales para el isotipaje de anticuerpos monoclonales basados en látex coloreados u otros marcadores que son de fácil realización y poseen una adecuada especificidad y sensibilidad, pero resultan relativamente caros.



3.4 CAPITULO IV FUNDAMENTO Y TÉCNICAS DE LAS PRUEBAS ORIENTADORAS PARA DETERMINACIÓN DE CONSUMO DE DROGAS.

COCAÍNA

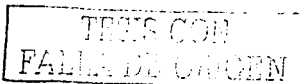
El análisis del metabolito de la cocaína es un inmunoanálisis enzimático homogéneo destinado para usarse en el análisis cualitativo y semicuantitativo de la benzoilecgonina metabolito de la cocaína en la orina humana, este análisis empleada un valor límite de 150 ng/mL o 300 ng/mL para distinguir las muestras positivas de las negativas, el análisis del metabolito de la cocaína proporciona un resultado analítico que es preliminar solamente, debe usarse un método químico alternativo más específico para obtener un resultado analítico de confirmación, el método de confirmación preferido es la cromatografía de gas acoplada a la espectrofotometría de masa, se dispone también de otros métodos químicos de confirmación, deben aplicarse las consideraciones clínicas apropiadas y un criterio profesional ante cualquier resultado de pruebas de fármacos de abuso, en particular cuando se utilicen resultados positivos preliminares, el análisis del metabolito de la cocaína Emit[®] d.a.u. TM detecta la benzoilecgonina, que es el metabolito principal de la cocaína, en la orina humana, no se han obtenido resultados positivos en muestras que contienen otros compuestos sin relación estructural con la benzoilecgonina, las concentraciones límite para distinguir entre muestras positivas y negativas son 150 ng/mL y 300 ng/mL, la concentración límite recomendada por NIDA es 300 ng/mL, es una técnica de inmunoanálisis enzimático homogéneo utilizada para analizar ciertos compuestos en orina humana (10), el análisis se basa en la competencia entre la droga en la muestra y la droga marcada con la enzima glucosa-6-fosfatodeshidrogenasa (G6P-DH) por los lugares de unión del anticuerpo, la actividad disminuye cuando la enzima se une al anticuerpo, y así la concentración de droga en la muestra puede medirse sobre la base de la actividad enzimática, la enzima activa transforma la nicotinamida-adenin dinucleótido (NAD) en NADH, lo que causa un cambio en la absorbancia que puede medirse espectrofotométricamente, la G6P-DH sérica endógena no interfiere porque la coenzima funciona sólo con la enzima bacteriana (de Leuconostoc mesenteroides) que se emplea en el análisis, los anticuerpos ovinos reactivos hacia la benzoilecgonina, glucosa-6-fosfato, nicotinamida-adenin dinucleótido, para el análisis de las muestras se deben encontrar a temperatura ambiente entre 18-25° C. las muestras muy turbias deben centrifugarse y luego utilizarse el sobrenadante para el análisis, no es necesario ajustar el pH de las muestras de orina que tengan un pH dentro de la gamma normal (5-8), Debe sospecharse que hubo alteración si el pH esta fuera de los límites normales, las muestras de orina deben tratarse y eliminarse como si fueran potencialmente infecciosas, a nivel del límite de 300 ng/mL, una muestra que produzca un cambio en la absorbancia, con un valor igual o mayor que el de calibrador se considera positiva y dicha muestra contiene benzoilecgonina, a nivel del límite de 300 ng/mL, una muestra que produzca un cambio en la absorbancia, con un valor menor que el de calibrador se considera negativa y dicha



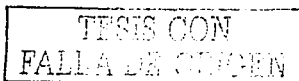
muestra no contiene benzoilecgonina o la benzoilecgonina esta presente en cantidades inferiores al nivel detectable con este ensayo, con el análisis del metabolito de la cocaína es posible hacer determinaciones semicuantitativas de cocaína, si se desea estimar las concentraciones relativas de los metabolitos se grafica una curva estándar de los diferentes calibradores contra sus respectivas concentraciones de benzoilecgonina, luego se comparan los valores de Absorbancia para las muestras positivas contra esta curva estándar, no hay ningún inmunoanálisis capaz de producir una respuesta única en presencia de todos los componentes en una mezcla, y a la vez sea capaz de proporcionar concentraciones cuantitativas confiables para cada componente cualquier interpretación de estos resultados debe tomar en cuenta que las concentraciones en la orina pueden variar mucho de acuerdo con la cantidad de líquidos ingeridos y otras variables biológicas, este análisis está diseñado para usarse solamente en orina humana, un resultado positivo del análisis indica sólo la presencia de cocaína o de sus metabolitos y no indica ni mide el grado de intoxicación. el análisis del metabolito de la cocaína, detecta a la benzoilecgonina que es el metabolito principal de la cocaína, en la orina, las concentraciones de cocaína y benzoilecgonina que equivalen al limite de 150 ng/mL son 40 y 8µl/mL respectivamente, las concentraciones de cocaína y benzoilecgonina que equivalen al limite de 300 ng/mL son 100 y 20µl/mL respectivamente estas concentraciones son mucho mayores que las que se encuentran en la orina de las personas que usan cocaína no se han observado resultados positivos en muestras que contengan otros compuestos sin relación estructural con la benzoilecgonina.

ANFETAMINAS

El análisis monoclonal de anfetamina/metanfetamina Emit[®]d.a.u. TM es un inmunoanálisis enzimático homogéneo destinado a usarse en el análisis cualitativo y semicuantitativo de anfetamina en orina humana, este análisis utiliza un nivel limite de 1000 ng/mL para distinguir las muestras positivas de las negativas, el análisis monoclonal de anfetamina/ metanfetamina Emit[®] d.a.u. proporciona solamente un resultado analítico preliminar, para obtener un resultado analítico confirmado se debe usar otro método químico más específico, el método de confirmación preferido(1) es la cromatografía acoplada a espectrofotometría de masas (GC/MS), también se dispone de otros métodos químicos para la confirmación, se deben aplicar las consideraciones clínicas apropiadas y el criterio profesional para interpretar los resultados de ensayos de fármacos sujetos a abuso, especialmente cuando se utilizan resultados positivos preliminares, las anfetaminas aparecen en la orina 3 horas después de su administración a través de cualquier vía (3), y se pueden detectar con el análisis Emit hasta 24 a 48 horas después de la última dosis (1), el análisis monoclonal de anfetamina/metanfetamina Emit d.a.u. utiliza un valor limite de 1000 ng/mL de d-metanfetamina, que coincide con la concentración recomendada por las pautas del National Institute on Drugs Abuse (NIDA, Instituto Nacional para Drogas de Abuso) para exámenes de



anfetaminas, el análisis detecta también d-anfetamina, D,L-anfetamina, metilendioxianfetamina (MDA) y metilendioximetanfetamina (MDMA), este análisis contiene anticuerpos monoclonales, es menos susceptible a las interferencias por compuestos similares a las anfetaminas que los análisis que contienen anticuerpos policlonales, aunque la posibilidad de interferencias es menor con este análisis, es posible que, como ocurre con todo inmunoanálisis, existan compuestos que interfieran, por esto se recomienda siempre la confirmación de los resultados positivos preliminares, entre los métodos utilizados en el pasado para detectar anfetaminas en los fluidos biológicos se encuentran la cromatografía en capa fina, la cromatografía de gases, la fluorometría, la microcristalografía, los inmunoanálisis enzimáticos y los radioinmunoanálisis (4), aunque es posible que otras técnicas confirmatorias sean adecuadas para el análisis de algunas drogas de abuso, la GC/MS se acepta generalmente como una técnica de confirmación válida para todas las drogas, ya que permite resultados de máxima confiabilidad, el análisis Emit es una técnica de inmunoanálisis enzimático homogéneo, utilizada para analizar ciertos compuestos en orina humana (5), el análisis se basa en la competencia entre la droga presente en la muestra y la droga marcada con la enzima glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6P-DH) por los lugares de conjugación de los anticuerpos, la actividad de la enzima disminuye al conjugarse esta con el anticuerpo, de modo que la concentración de la droga puede medirse en la muestra sobre la base de la actividad enzimática, la enzima activa convierte la nicotinamida adenin dinucleótido (NAD) A NADH, causando un cambio en la absorbancia que puede medirse espectrofotométricamente, la G6P-DH sérica endógena no interfiere porque la coenzima funciona sólo con la enzima bacteriana (de Leuconostoc mesenteroides) que se emplea en el análisis, para el análisis de las muestras se deben encontrar a temperatura ambiente entre 18-25° C, las muestras muy turbias deben centrifugarse y luego utilizarse el sobrenadante para el análisis, no es necesario ajustar el pH de las muestras de orina que tengan un pH dentro de la gamma normal (5-8), debe sospecharse que hubo alteración si el pH esta fuera de los límites normales, las muestras de orina deben tratarse y eliminarse como si fueran potencialmente infecciosas, una muestra que produzca un cambio en la absorbancia, con un valor igual o mayor que el de calibrador se considera positiva y dicha muestra contiene anfetamina, metilendioximetanfetamina, una muestra que produzca un cambio en la absorbancia, con un valor menor que el de calibrador se considera negativa y dicha muestra no contiene anfetamina y/o metilendioximetanfetamina o esta presente en cantidades inferiores al nivel detectable con este ensayo, con el análisis monoclonal de la anfetamina y/o metilendioximetanfetamina es posible hacer determinaciones semicuantitativas, si se desea estimar las concentraciones relativas se grafica una curva estándar de los diferentes calibradores contra sus respectivas concentraciones de anfetamina y/o metilendioximetanfetamina, luego se comparan los valores de Absorbancia para las muestras positivas contra esta curva estándar. No hay ningún inmunoanálisis capaz de producir una respuesta única en presencia de todos los componentes en una mezcla, y a la vez sea capaz de proporcionar concentraciones cuantitativas confiables para



cada componente, cualquier interpretación de estos resultados debe tomar en cuenta que las concentraciones en la orina pueden variar mucho de acuerdo con la cantidad de líquidos ingeridos y otras variables biológicas, este análisis está diseñado para usarse solamente en orina humana, un resultado positivo del análisis indica sólo la presencia de anfetamina y/o metilendioximetanfetamina y no indica ni mide el grado de intoxicación, ciertas dosis terapéuticas de otras drogas pueden dar resultados positivos con este análisis.

MARIHUANA

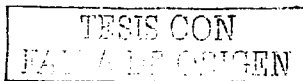
El análisis de Canabinoide, es un inmunoanálisis enzimático homogéneo diseñado para usarse en el análisis cualitativo y semicuantitativo de canabinoides en la orina humana, este utiliza un nivel límite de 50 ng/mL para diferenciar las muestras positivas de las negativas, el análisis del canabinoide de 50 ng Emit d.a.u. proporciona un resultado de ensayo analítico que es preliminar solamente, se debe usar otro método químico más específico (1) si se desea confirmar el resultado analítico. El método confirmatorio preferido (1) es por cromatografía de gases acoplada a espectrofotometría de masas (GC/MD). También se dispone de otros métodos químicos para la confirmación, se deben aplicar las consideraciones clínicas apropiadas y el buen juicio profesional a los resultados de pruebas de drogas de abuso, especialmente cuando se utilizan resultados positivos preliminares.

El Análisis de Canabinoide Emit[®]d.a.u. TM detecta el ácido 11-nor- Δ^9 -THC-9-carboxílico que es el metabolito principal del Δ^9 -THC, en la orina humana y otros metabolitos del Δ^9 -THC. el nivel límite para diferenciar las muestras positivas y negativas es de 50 ng/mL, no se han obtenido resultados positivos a partir de muestras que contenían otros compuestos sin relación estructural con los canabinoides.

Los métodos utilizados en el pasado para detectar canabinoides en los fluidos biológicos incluyen los radioinmunoanálisis, la cromatografía de gases/espectrofotometría de masa, la cromatografía de gases y el inmunoanálisis enzimático (2, 3).

Aunque sea posible que otras técnicas confirmatorias sean adecuadas para el análisis de algunas drogas de abuso, la GC/MS se acepta generalmente como una técnica de confirmación válida para todas las drogas, ya que permite resultados de máxima confiabilidad (1).

El análisis Emit es una técnica de inmunoanálisis enzimático homogéneo utilizada para analizar ciertos compuestos específicos en la orina humana (5). El análisis se basa en la competencia entre la droga en la muestra y la droga marcada con la enzima glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6P-DH) para los lugares de unión del anticuerpo. La actividad disminuye cuando la enzima se une al anticuerpo, y así la concentración de la droga en la muestra puede medirse sobre la base de la

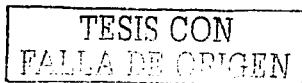


actividad enzimática. La enzima activa transforma la nicotinamida-adenín dinucleótido (NAD) A NADH, lo que causa un cambio en la absorbancia que puede medirse espectrofotométricamente. La G6P-DH sérica endógena no interfiere porque la coenzima funciona sólo con la enzima bacteriana (de *Leuconostoc mesenteroides*) que se emplea en el análisis

Para el análisis de las muestras se deben encontrar a temperatura ambiente entre 18-25° C, las muestras muy turbias deben centrifugarse y luego utilizarse el sobrenadante para el análisis, no es necesario ajustar el pH de las muestras de orina que tengan un pH dentro de la gamma normal (5-8), debe sospecharse que hubo alteración si el pH esta fuera de los límites normales, las muestras de orina deben tratarse y eliminarse como si fueran potencialmente infecciosas, una muestra que produzca un cambio en la absorbancia, con un valor igual o mayor que el de calibrador se considera positiva y dicha muestra contiene cannabinoides.

una muestra que produzca un cambio en la absorbancia, con un valor menor que el de calibrador se considera negativa y dicha muestra no contiene cannabinoides o están presente en cantidades inferiores al nivel detectable con este ensayo, con el análisis de cannabinoides posible hacer determinaciones semicuantitativas de cannabinoides, si se desea estimar las concentraciones relativas de los metabolitos se grafica una curva estándar de los diferentes calibradores contra sus respectivas concentraciones de cannabinoides, luego se comparan los valores de Absorbancia para las muestras positivas contra esta curva estándar. No hay ningún inmunoanálisis capaz de producir una respuesta única en presencia de todos los componentes en una mezcla, y a la vez sea capaz de proporcionar concentraciones cuantitativas confiables para cada componente. Cualquier interpretación de estos resultados debe tomar en cuenta que las concentraciones en la orina pueden variar mucho de acuerdo con la cantidad de líquidos ingeridos y otras variables biológicas.

Este análisis está diseñado para usarse solamente en orina humana, un resultado positivo del análisis indica sólo la presencia de cannabinoides o de sus metabolitos y no indica ni mide el grado de intoxicación, en todos los casos, si la prueba de orientación resultare positiva, es necesario la realización de pruebas confirmatorias por un método más sensible y cuantitativo, debe tenerse en cuenta de manera fundamental, que los resultados obtenidos no tienen valor médico-legal, si no son cumplidos requisitos tales como la verificación de la cadena de custodia de la muestra, la existencia de una muestra adicional para la realización de la contraprueba, y la confirmación por métodos de referencia de los resultados positivos obtenidos en pruebas de orientación, entre otras medidas.



4. Planteamiento del problema

Para la detección de drogas de abuso se plantean dos etapas las pruebas orientadoras (cualitativas) y las pruebas confirmativas (cuantitativas), las primeras son generalmente pruebas de tipo inmunoenzimático que detectan a la droga de manera genérica, y las segundas son técnicas de confirmación muy sensibles y de gran especificidad (cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas GC/MS) (4). Sin embargo, existe la posibilidad de llevar a cabo un diagnóstico más rápido y específico del consumo de drogas mediante técnicas inmunológicas de anticuerpos monoclonales en la identificación de metabolitos de drogas de abuso.

El presente trabajo propone que se utilice ELISA en lugar de EMIT para la detección de drogas de abuso y sus respectivos metabolitos para que mediante el uso de anticuerpos monoclonales se obtenga un reactivo de diagnóstico para determinar drogas de abuso y sus respectivos metabolitos en la población mexicana, ya que actualmente algunas de las pruebas orientadoras que se utilizan son de tipo inmunoenzimático y se trata de anticuerpos policlonales o monoclonales que utiliza la técnica de EMIT y el resultado se mide con base a la actividad enzimática no siendo específica para un tipo de metabolito. En la presente monografía se expone una técnica inmunoenzimática utilizando ELISA para obtención de anticuerpos monoclonales para el diagnóstico de drogas de abuso y sus respectivos metabolitos de drogas de abuso. Por lo antes descrito se plantearon los siguientes objetivos

5. Objetivos

1. Proponer un método para obtención de anticuerpos monoclonales que sean útiles para la detección de drogas de abuso y sus respectivos metabolitos en la población mexicana.
2. Describir las principales técnicas de laboratorio utilizadas como pruebas de tamiz para detectar drogas de abuso en fluidos biológicos.
3. Describir ventajas y desventajas de EMIT (técnica que actualmente se utiliza en los laboratorios forenses) y la propuesta.

6. Propuesta de métodos

PRODUCCIÓN DE ANTICUERPOS MONOCLONALES: ANTI- BENZOILECGONINA, ANTI ANFETAMINA Y ANTI-ÁCIDO 11-NOR- Δ^9 -THC-9-CARBOXILICO.

MATERIAL BIOLÓGICO.

Benzoilecgonina, anfetamina, ácido 11-nor- Δ^9 -THC-9-carboxílico aislados y purificados de muestras de pacientes drogodependientes.

Los metabolitos antes mencionados se aislarán y purificarán a partir de muestras de pacientes (Orina) por Cromatografía de exclusión de peso molecular, en el caso de que aun en la separación no estén puros los metabolitos se procederá a utilizar el HPLC.

La identificación de los metabolitos se hará mediante electroforesis en geles de poliacrilamida Dodecil Sulfato de sodio(SDS-PAGE) al 10%, utilizándose como referencia un estándar, así como marcadores de peso molecular. Estas muestras se correrán en cada uno de las fracciones obtenidas de la separación de la orina. Esto con el fin de determinar la pureza del Ag (Metabolitos de la droga).

Para la producción de anticuerpos monoclonales, se utilizarán ratones hembra BALB/c, los cuales serán inmunizados, mediante el siguiente esquema:

Solo se describirá el procedimiento para el metabolito de la cocaína (Benzoilecgonina) para la anfetamina y el ácido 11-nor- Δ^9 -THC-9-carboxílico se procederá de la misma forma.

Cuadro 1 CALENDARIO DE INMUNIZACIÓN PARA EL ESQUEMA 1

DÍA DE INMUNIZACION	CONCENTRACIÓN DE METABOLITO (μ g) POR RATON	VIA DE ADMINISTRACION
0	50 μ g de Benzoilecgonina en 250 μ L de PBS.	Intraperitoneal
11	50 μ g de Benzoilecgonina en 250 μ L de PBS	Intrapentoneal
30	50 μ g de Benzoilecgonina en 250 μ L de PBS	Intraperitoneal
50	50 μ g de Benzoilecgonina en 100 μ L de PBS	Intravenosa

Esquema de inmunización 2: Inmunización con Anfetamina 50 μ g/250 μ L de PBS

Esquema de inmunización 3: inmunización con ácido 11-nor- Δ^9 -THC-9-carboxílico 50 μ g/250 μ L de PBS.

En cada una de las inmunizaciones se tomarán muestras sanguíneas de los ratones y el suero será probado para detectar los títulos de anticuerpos por ELISA, cuando se obtenga un título de anticuerpos mayor a 1:4000 y la absorbancia sea igual a 490 nm, los esplenocitos del ratón inmunizado serán fusionados con células de mieloma murino a una relación 5:1 usando polietilenglicol (PEG) como agente fusionante, las células fusionadas serán distribuidas en 96 placas, diez días después de la fusión, los sobrenadantes del cultivo se cosecharán para determinar la presencia de anticuerpos hacia el antígeno por ELISA indirecto, los hibridomas positivos serán clonados, diez días más tarde los sobrenadantes donde se desarrollarán los hibridomas serán probados por ELISA, y los hibridomas positivos serán subclonados para posteriormente ser purificados o inducir líquido de ascitis.

ELISA para la determinación de anticuerpos

1. El antígeno se diluye con la solución amortiguadora de carbonatos pH 9.6 (sol.1) para tener una concentración en el rango de 0.1 a 10 $\mu\text{g/mL}$, dependiendo de la pureza del antígeno y su antigenicidad (esto debe probarse empíricamente). Se sensibilizan los pozos de poliestireno con un volumen de 100 μL de la solución de antígeno.
2. Se incuba la placa de ELISA a 4° C durante toda la noche.
3. Se elimina la solución vertiendo el contenido de los pozos y se seca el exceso sobre una gasa.
4. La placa se lava 3 veces con 200 μL /pozo con la solución salina de fosfatos y Tween 20 (amortiguador de lavado, sol. 3), durante 5 min. cada lavado; entre cada uno se sigue el paso 3.
5. Agregar a la placa 200 μL /pozo la leche descremada al 5% (solución de bloqueo I, sol. 4) ó albúmina sérica bovina (BSA) al 1% (solución de bloqueo II, sol. 5) en PBS-Tween (sol. 3) e incubar durante 30 minutos a 37° C.
6. Repetir los pasos 3 y 4.
7. Hacer una dilución adecuada del suero (probada previamente) en PBS-Tween (sol. 3) Usualmente la dilución óptima está entre 1:500 y 1:4000.
8. Cada suero diluido se agrega en volumen de 100 μL /pozo y se incuba 2 horas a 37° C.
9. Se repiten los pasos 3 y 4.
10. En cada pozo se colocan 100 μL del conjugado (por ejemplo anti-gamma globulina total de ratón-peroxidasa, o anti-IgG humana-fosfatasa alcalina) a una dilución previamente titulada en PBS-Tween (sol. 3).
11. Se incuba a 37° C durante 2 horas, y se procede como en los pasos 3 y 4.
12. En cada pozo se colocan 100 μL de la solución de cromógeno/sustrato correspondiente (ver soluciones 6 y 7 en el apéndice para conjugados de peroxidasa y fosfatasa respectivamente).

13. Dejar incubar (en el caso de peroxidasa en la oscuridad) durante 30 min.
14. Detener la reacción enzimática, añadiendo 100 μL /pozo de ácido sulfúrico 2N (sol. 8) para peroxidasa e hidróxido de sodio 1N (sol. 9) para fosfatasa.
15. Leer la absorbancia en un lector de ELISA a 490 nm para peroxidasa/orto-fenilendiamina y a 405 nm para fosfatasa/p-nitrofenilfosfato.

ELISA para la captura de antígenos

1. En este caso se acopla primero un anticuerpo de captura. Se diluye en la solución amortiguadora de boratos (sol. 10) a una concentración previamente determinada. Cuando se emplean anticuerpos muy homogéneos o monoclonales, suelen usarse concentraciones del orden de ng/mL ; para mezclas de anticuerpos el rango está dentro de los $\mu\text{g/mL}$. Se sensibilizan los pozos de poliestireno (para estos ensayos se recomienda el uso de pozos de alta adherencia, o "high binding") con un volumen de 100 μL /pozo de la solución de anticuerpo.
2. Se deja la placa de ELISA a 4° C durante toda la noche.
3. Se elimina la solución vertiendo el contenido de los pozos y se seca el exceso sobre una gasa.
4. La placa se lava 3 veces con 200 μL /pozo con el amortiguador de lavado (sol. 3)m durante 5 min cada lavado; entre cada uno se sigue el paso 3.
5. Se agregan 200 μL /pozo de la solución de bloqueo seleccionada (sol 4 ó 5) preparada en amortiguador de lavado (sol. 3) y se incuba durante 30 minutos a 37° C.
6. Se repiten los paso 3 y 4.
7. Se hacen varias diluciones de la muestra problema que contiene el antígeno en amortiguador de lavado (sol. 3). Usualmente las diluciones son bajas, de 1:1 a 1:50.
8. Se prepara una curva de calibración con antígeno a concentraciones crecientes para ser usada como marco de referencia; si no se conoce la concentración aproximada del antígeno en la muestra problema, la curva de calibración se prepara de 0 a 100 $\mu\text{g/mL}$ en escala exponencial (0.001, 0.01, 0.1, 1.0 etc.).
9. Se agregan 100 μL /pozo de las muestras y los diferentes puntos de la curva, se incuba 2 horas a 37° C. y se repiten los pasos 3 y 4.
10. En cada pozo se colocan 100 μL del conjugado, en este caso otro anticuerpo específico para el antígeno que se busca, previamente acoplado a una marca directa (por ejemplo peroxidasa) o indirecta (por ejemplo biotina) disuelto en PBS-Tween (sol. 3) a una concentración previamente determinada.
11. Se incuba a 37° C durante 2 horas y se procede como en los pasos 3 y 4.

12. Si se utiliza una marca directa se sigue con el paso 13. En caso de utilizar una marca indirecta o un segundo anticuerpo, antes de pasar al paso 13 se hace la dilución adecuada del conjugado (por ejemplo un anti-IgG-peroxidasa, o avidina-peroxidasa para el caso de conjugados de biotina) en sol. 3, se incuba otras 2 horas a 37° C y se repiten los pasos 3 Y 4.
13. En cada pozo se colocan 100 µL de la solución de sustrato correspondiente.
14. Se deja incubar (para peroxidasa en la oscuridad) durante 30 minutos.
15. Se detiene la reacción enzimática, añadiendo 100 µL/ pozo de ácido sulfúrico 2N (sol 8) para peroxidasa e hidróxido de sodio 2N (sol. 9) para fosfatasa.
16. Se lee la absorbancia en un lector de ELISA a 490 nm para peroxidasa/orto-fenilendiamina y a 405 nm para fosfatasa/p-nitrofenilfosfato.

7. Ventajas y desventajas de las técnicas

TÉCNICA UTILIZADA ACTUALMENTE EN EL AMBITO FORENSE EMIT	ANTICUERPOS MONOCLONALES
La temperatura debe encontrarse al realizar el diagnóstico entre 18-25° C	No se requiere de una temperatura en especial
Se determina solo en orina humana	Se puede determinar en suero, saliva o cualquier fluido biológico.
El análisis proporciona un resultado de ensayo analítico que es preliminar solamente	El análisis proporciona un resultado analítico confiable y puede tratarse como definitivo.
El pH de la muestra debe estar dentro de la gamma normal (5-8).	El pH de la muestra puede encontrarse en cualquier rango.

8. Análisis

Considerando que la información sobre drogas en nuestro país es muy escasa y sólo se puede obtener de fuentes existentes en estudios epidemiológicos especiales, se tuvo que obtener y ordenar el tipo de información adecuada, por lo que se hizo indispensable seleccionar los datos disponibles sobre el abuso de drogas que indirectamente revelan su importancia en la sociedad

mexicana. Las tasas de detención por violencia, robo pueden estar relacionadas con frecuencia por intoxicaciones, esto es algo que de un modo u otro, afecta a todo el mundo, por consiguiente el diagnóstico en pacientes consumidores, es un problema de índole legal, lo que hace necesario tener un diagnóstico más rápido y eficiente, actualmente se utiliza para las pruebas orientadoras cualitativas la técnica de EMIT para la determinación de drogas en la población mexicana y esta consiste en marcar la droga con una enzima y cuando esta droga es marcada se comporta como un anticuerpo específico y por tanto hay una reducción en la actividad enzimática, si hay una muestra libre de droga esta competirá con la droga marcada con la enzima por los sitios de anticuerpos específicos, por lo que la actividad enzimática residual se relaciona directamente a la concentración de la droga presente en la muestra de orina que es el único fluido biológico en el que se determinan este tipo de pruebas y el resultado es la acción catalítica de la enzima en el sustrato, aunque ofrece grandes ventajas, la técnica de ELISA es más sensible por esto se hizo la propuesta de utilizar esta técnica para diagnóstico, una consideración primordial al elegir esta técnica es que ha demostrado en otros casos ser útil para el fin que se persigue, esto quizá puede desprenderse de la experiencia en otro tipo de diagnóstico y de sus resultados obtenidos, y según la información los anticuerpos monoclonales de la obtención a pequeña escala se llega a una más grande además ofrece la ventaja que se pueden determinar los metabolitos en suero, saliva, sangre o donde quiera que se encuentren estos metabolitos sin tener que ajustar a un determinado pH. Ambas técnicas pertenecen al grupo de las EIA (Inmunoensayos de la enzima) y tienen un estado de vida larga ya que son muy estables.

9. Conclusión.

El análisis de la información obtenida mediante la revisión bibliográfica permite sacar la siguiente conclusión:

La posibilidad de utilizar la técnica de anticuerpos monoclonales para el diagnóstico de pacientes consumidores de drogas de abuso, ofrece más ventajas que las técnicas que se utilizan actualmente en los laboratorios forenses, se pueden obtener más económicamente, ya que el problema social crece haciéndose necesario abaratar los costos, especialmente cuando escasean los recursos económicos, debiéndose adoptar estrategias para mejorar día a día, a cuya aplicación tenga acceso la comunidad en general por lo que:

- Se puede usar la técnica inmunoenzimática ELISA para la detección de los metabolitos de drogas de abuso, en cualquier fluido biológico (suero, orina, saliva).

- Esta técnica no requieren de reactivos ni de equipo sofisticado, por lo que se puede realizar en cualquier laboratorio.
- El cultivo de anticuerpos es muy estable por tiempo indefinido.

10. Perspectivas

El desarrollo de una técnica inmunoenzimática permitirá detectar cantidades de metabolitos más pequeñas de drogas de abuso que la que detecta EMIT. Para que esta técnica no sea sólo una técnica orientadora

Se probarían los AcM con muestras obtenidas de pacientes positivos a cada tipo de droga en cuestión, para determinar si el monoclonal tiene utilidad como método de diagnóstico.

Análisis del uso de anticuerpos monoclonales como método de diagnóstico.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

11. APÉNDICE SOLUCIONES

Solución 1. Amortiguador de Carbonatos I, 0.15M pH 9.6

Pesar 3.18 g de carbonato de sodio (Na_2CO_3) más 5.86 g de bicarbonato de sodio (NaHCO_3)

Disolver los carbonatos en 800 mL de agua bidestilada

Ajustar el pH a 9.6

Aforar a 1000 mL

Mantener a 4° C

Solución 2 Solución salina de fosfatos 0.01M, NaCl 0.15M, pH 7.2 (PBS)

Medir 800 mL de agua destilada

Agregar 100 mL de *PB 10x y 8.75 g de NaCl

Disolver las sales y ajustar el pH a 7.2

Aforar a 1000 mL con agua bidestilada

Guardar a 4° C

***PB 10x** 2.62 g de ($\text{NaH}_2\text{HPO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$) fosfato de sodio monobásico monohidratado mas 11.5 g de (Na_2HPO_4) Fosfato de sodio dibásico anhidro. Disolver en 200 mL de agua bidestilada (calentar un poco hasta disolver los cristales) y aforar a 1000 mL con agua bidestilada.

Solución 3 Amortiguador de lavado (PBS-TWEEN 20, 0.05%)

A un litro de PBS pH 7.2 (sol 2)

Añadir 500 μL de Tween 20

Guardar a 4° C

Solución 4. Solución de bloqueo I (leche descremada al 5%)

Pesar 5 g de leche descremada en polvo

Disolver en 100 mL de PBS-Tween (sol 4)

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Guardar a -20° C

Solución 5. Solución de bloqueo II (albúmina sérica bovina al 1% en PBS-Tween 20)

Diluir 1 mL de BSA al 25% en 24 mL de PBS-Tween (sol 4)

Mantener a -20° C

Solución 6. Solución de cromógeno/sustrato (ELISA) para peroxidasa

Pesar 4 mg de orto-fenilendiamina

Añadir 5 mL de ácido cítrico 0.1M y 5 mL de citrato de sodio 0.1M

Adicionar $4\mu\text{L}$ de H_2O_2 al 30%

NOTA: La solución se prepara inmediatamente antes de usarla y se mantiene en la oscuridad antes y durante su uso.

Solución 7. Solución de cromógeno/sustrato (ELISA) para fosfatasa. Para una placa de 96 pozos:

Disolver 2 tabletas de p-nitrofenil-fosfato en 7.5 mL del amortiguador de dietanolamina

Agregar 2.5 mL de agua calidad cultivo celular

*Amortiguador de dietanolamina:

Medir 10 mL de dietanolamina y aforar a 100 mL con agua bidestilada

Tomar 97 mL de la solución anterior y adicionar 800 mL de agua bidestilada

Adicionar 2 g de nitrato de sodio (NaNO_3)

Solución 8. Solución de ácido sulfúrico 2N

Tomar 98.08 mL de ácido sulfúrico (H_2SO_4)

Añadir cuidadosamente a 850 mL de agua bidestilada. Aforar a 1000 mL

Solución 9. Solución de hidróxido de sodio 1N

Pesar 40 g de hidróxido de sodio (NaOH)

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Disolver cuidadosamente en 850 mL de agua bidestilada. Aforar a 1000 mL.

Solución 10. Solución de boratos, pH 8.0

Disolver 6.18 g de ácido bórico, 9.54 g de tetraborato de sodio y 4.38 g de cloruro de sodio en 800 mL de agua bidestilada

Ajustar el pH a 8.0

Aforar a 1000 mL.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

12. Referencias

1. Gossop M y Grant m. Prevención y control del abuso de drogas, Organización Mundial de la Salud, Ginebra 1990.
2. Procuraduría General de Justicia del Distrito Federal Instituto de Formación Profesional, Química Legal, 1997 Serie Criminalística 23 -37.
3. Ruiz L B. Drogas de diseño, Revista de divulgación de la Ciencia de la Universidad Nacional Autónoma de México, Sep 2002 Año 4 No. 46.
4. Montiel Sosa Juventino. Criminalística Tomo 1, Limusa S.A. de C.V. México, D.F., 2000: 211-233.
5. López M. Vacunar contra la adicción. Pretenden frenar la acción de la cocaína antes de que ésta llegue al cerebro. 2002: 1-5.
6. Hamilton HE et al: Cocaine and benzoylcgonina excretion in humans. J Forensic Sci Sas 1977; 22:697-707.
7. Ellenhorn MJ. Barceloux DG. Medical toxicology. New York, Elsevier Science Publishing Company, Inc 1988. 675-682.
8. Baselt R. Disposition of toxic drugs and chemicals in man. edition 3. Chicago. IL year Book Medical Publishet Inc, 1990: 780-783.
9. Carpio J. Mata O. Medina E. Ruiz A. Zavala A. Manual de técnicas modernas de inmunología. México "Indre", México 2000:15-41.
10. Berger P Ciaranello R. Elliot G. Phycho-Pharmacology from theory practice. Nueva York, Edited by new york, 1977: 334-339.
11. Henderson GL Mechanisms of drug incorporation into hair. Forensic Science International(1993) 63: 19-29.
12. Gorodetcky CW. Detection of drugs of abuse in biological fluids, in Martin WR(ed): drug Addiction I. New York, Springer-Verlag, 1977, pp 319-409.
13. Cassani M. Spiehler Analytical requirements, perspectives and limits of immunological methods for drugs in hair. Forensic Sciences International(1993) 63: 175-184.

14. Gavilondo Cowley Jorge . Anticuerpos Monoclonales Teoría y Práctica, Editorial Elfos Scientiae, La Habana, 1995: 22-185.
15. Dower SK. Ozato K. And Segal D M. The interaction of monoclonal antibodies with MHC class I antigens on mouse spleen cells I Analysis of the mechanism of binding. J. Immunology (1984) 132, 751-758.
16. Engvall E. Enzyme immunoassay ELISA and EMIT. Methods Enzymology (1980) 70 : 419-438.
17. Engvall E. Pesce A. Quantitative Enzyme Immunoassay. Scand J. Immunology, (1978): 8-17
18. Falkenberg F W. Weichert H. Krane M. In vitro production of monoclonal antibodies in high concentration in a new and easy to handle modular fermenter. J Immunology Methods 1995 179: 13-29.
19. Fazekas de St. Groth. Producción de monoclonal antibodies: strategy and tactis. J. Immunology Methods 1980 35, 1-21.
20. Galfre G. and Milstein C. Preparation of monoclonal antibodies: strategies and procedures. Methods Enzymol 1981 73: 3-46.
21. Henry JB. Clinical diagnosis and management by laboratory methods. Philadelphia, WB Saunders Co, 1991: 866.
22. James W. G Monoclonal Antibodies. Principles and Practice third edition U.S Edition published by academic press inc San Diego, Ca 1993.
23. Kim I. Kelly, Pharm. D, 1988 The Accuracy and Reliability of Test for Drugs of Abuse in Urine Samples 8: 263 -275.
24. Kubo K. Isemura T. Electrophoretic behaviour of micellar and monomeric sodium dodecyl sulfate in polyacrylamide gel electrophoresis with reference to tose of SDS-protein complexes. Anal Biochem 1979 123: 180-192.
25. Lester M. Kelly Y. Kim, . Beatrice Y.T. Perotti, and Leslie Z. Benet Effect of cannabinal pretreatment on the Kinetics of Tetrahydrocannabinol Metabolites in mouse Brain. (1995) 23, 8 05: 825-830.

26. Lindgren JE: Guide to the analysis of cocaine and its metabolites in biological material. J Ethnopharmacol 1981; 3:337-351.
27. Ouchterlony O, Niessen L A. Handbook of Exp. Immunology, Blackwell Sci. Pub. 1978 :196.
28. Pearman K: Cocaine, A review. J. Laryngol Otol 1979;93:1191-1199.
29. Towbin, H: Electrophoretic transfer of proteins from polyacrilamide gels to nitrocellulose sheets.Procedure and some applications. Pro. Nat. Acad. Sci. (1979) 76:430-435.
30. Urine Testing for Drugs of Abuse. National Institute on Drug Abuse (NIDA) Research Monografic 73, 1986.
31. Van Dyke C et al: Urinary excretion of immunologically reactive metabolite after intranasal administration of cocaine as followed by enzyme immunoassay. Clinical Chemical 1977; 23:241-244.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN