



**Universidad Nacional Autónoma de México  
Facultad de Estudios Superiores Zaragoza**

**Obtención de anticuerpos monoclonales anti-fracción 4MT de  
*Mycobacterium tuberculosis* H 37Ra incluida en liposomas.**

**TESIS**

Para obtener el título de:

**Licenciado en **Químico  
Farmacéutico Biólogo****

**PRESENTA:**

**RAQUEL ESCOBAR ROJANO**

**SEPTIEMBRE 2006**



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.

Este trabajo fue realizado en el Laboratorio de Inmunología Aplicada del Departamento de Investigaciones Inmunológicas del InDRE con la dirección del M en C. Fernando Renato Cázares Sosa.

## DEDICATORIAS

### A Dios

Entre tus manos esta mi vida Señor . Por estar conmigo en momentos difíciles y en un momentos como este, por haber logrado alcanzar esta meta tan esperada. Le doy infinitamente las gracias.

### A mi papá

Gracias porque sin tu ejemplo, sin tu alegría sin tu amor no hubiera logrado alcanzar esta meta . Yo te amaré siempre aún después de tu muerte .

### A mi mamá

Por tu inmenso amor, por tu protección, porque siempre me has impulsado a luchar y lograr mis metas por ser mi ejemplo a seguir. Por ti este sueño hoy es realidad gracias mami.

### Alondra y Karen

A quienes amo, por quienes vivo gracias por ser tan maravillosas y por haber llegado a mi vida.

### A mi esposo

Por el apoyo, por la confianza, por tu inmenso amor, por tu tiempo gracias  
TE AMO.

### A mis hermanos

#### Claudia

Por tu apoyo, por tu cariño por ser un gran ser por ser mi hermana y porque te admiro mil gracias .

#### Juan Manuel

Por los consejos, por tu cariño y por tu apoyo mil gracias te quiero un montón

### A mis suegros

Por su ayuda incondicional, por sus consejos y por todo el cariño recibido infinitamente gracias.

## AGRADECIMIENTOS.

A mi director:

M en C Fernando Cázares Sosa

Gracias por todas tus observaciones, por tus enseñanzas y el apoyo incondicional para la realización de este trabajo, por alentarme a lograr mi meta, por ser mi gran amigo un hermano. Mil Gracias.....

Al Jefe del Departamento de Inmunología Aplicada

Dr. Alejandro Escobar Gutiérrez.

Con enorme admiración y cariño le agradezco el apoyo en la realización de este trabajo.

A la jefa de Laboratorio de Inmunología Aplicada

QFB Silvia Gonzáles Mateos.

Gracias por tu invaluable ayuda y comprensión en la elaboración de este trabajo espero seguir colaborando contigo por muchos años y se que nuestra amistad no tiene fin.

A la jefe de Laboratorio de Anticuerpos Monoclonales

M en C Yolanda Medina Flores

Yola Por tu apoyo y tus enseñanzas en este trabajo por tu gran calidad humana y por ser mi amiga infinitamente te doy las gracias.

Biol. Sergio Pasten Sánchez

Por tu apoyo y consejos en la realización de este trabajo. Te admiro

A la Biol. Lupita Granados López

Por tus palabras de aliento y apoyo por tener la fortuna de ser tu amiga gracias

A la QFB. Iliana A . Cortes Ortiz

Por tu sonrisa, por tu cariño, por nuestra amistad, por motivarme en la realización de este trabajo gracias amiga por siempre.

A la Tec. Guadalupe Torres Gómez

Por tu cariño tu apoyo y excelente amistad gracias.

A mis compañeros del laboratorio de Inmunología Especial

Dr. Salvador Fonseca Coronado

Dr. Sigifredo Pedraza Sánchez

QFB. Guadalupe Rodríguez Moreno

Tec. Bárbara Alba Villanueva

Por su apoyo y amistad que siempre me han brindado

Al laboratorio de Anticuerpos Monoclonales

Araceli, Juan Carlos, Olga, América y Edith gracias por el apoyo en la realización de este trabajo por la amistad que me han brindado.

Mi agradecimiento especial para el Comité de sinodales por el apoyo en la revisión de este documento.

QFB José Oscar González Moreno, Dra. Raquel Retana Ugalde,

QFB. Yolanda Flores Cabrera, QFB. Beatriz Elena Arellano Pimentel.

No me alcanzarían las hojas de esta tesis para reconocer la invaluable ayuda y amistad que he recibido de mis amigos y compañeros del INDRE. Gracias a todos

	<b>ÍNDICE</b>	Página
	<b>ABREVIATURAS</b>	11
1	<b>RESUMEN</b>	12
2	<b>MARCO TEORICO</b>	13
2.1	<b>Patogenia de la tuberculosis.</b>	13
2.2	<b>El bacilo de <i>Mycobacterium tuberculosis</i>.</b>	14
2.3	<b>Pared celular de <i>Mycobacterium tuberculosis</i>.</b>	16
2.4	<b>Lípidos de <i>Mycobacterium tuberculosis</i>.</b>	17
2.5	<b>La fracción 4MT.</b>	18
2.6	<b>Liposomas de <i>Mycobacterium tuberculosis</i>.</b>	19
2.7	<b>Respuesta inmune a tuberculosis.</b>	20
2.7.1	<b>La respuesta inmune celular.</b>	21
2.7.2	<b>La respuesta inmune humoral.</b>	22
2.7.3	<b>Moléculas CD1.</b>	23
2.8	<b>Diagnóstico de tuberculosis.</b>	24
2.8.1	<b>Vacuna contra la tuberculosis.</b>	25
2.9	<b>Anticuerpos monoclonales.</b>	26
3	<b>PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA</b>	28
4	<b>OBJETIVO GENERAL</b>	28
5	<b>OBJETIVOS PARTICULARES</b>	28
6	<b>HIPÓTESIS</b>	29
7	<b>DISEÑO DE INVESTIGACIÓN</b>	29
7.1	<b>Tipo de estudio</b>	29
7.2	<b>Población</b>	29
7.3	<b>Criterios de selección</b>	29
7.4	<b>Variables</b>	29
7.5	<b>Diseño Estadístico</b>	29
8	<b>DIÁGRAMA DE FLUJO EXPERIMENTAL</b>	30
9	<b>MÉTODOS</b>	32
9.1	<b>Obtención de la fracción 4MT</b>	32
9.2	<b>Formación de liposomas</b>	33
9.3	<b>Cultivo y proliferación de células Ag8</b>	34
9.4	<b>Fusión celular</b>	34
9.5	<b>Clonación celular</b>	35
9.6	<b>ELISA para lípidos con la fracción 4 MT.</b>	36
9.7	<b>ELISA liposomal con L 4 MT.</b>	37
9.8	<b>ELISA para isotípos de IgG.</b>	38

9.9	<b>Purificación del anticuerpo monoclonal.</b>	39
9.10	<b>Método de Lowry.</b>	40
9.11	<b>Electroforesis en gel de poliacrilamida al 10%.</b>	41
9.12	<b>Western Blot.</b>	42
9.13	<b>Expansión de anticuerpos monoclonales.</b>	43
9.14	<b>Congelación y descongelación de células.</b>	44
10	<b>RESULTADOS</b>	45
10.1	<b>Antígeno 4MT de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> H37Ra</b>	45
10.2	<b>Formación de Liposomas con la fracción 4MT</b>	47
10.3	<b>Fusión celular</b>	49
10.4	<b>ELISA 4MT de los hibridomas fusionados.</b>	50
10.5	<b>Clonación y subclonación de hibridomas</b>	59
10.6	<b>Dilución limitante de hibridomas reactivos</b>	60
10.7	<b>Determinación de la subclase de IgG de ratón.</b>	61
10.8	<b>ELISA liposomal</b>	64
10.9	<b>Western Blot</b>	67
10.10	<b>Purificación de los anticuerpos monoclonales anti L 4MT</b>	68
10.11	<b>Electroforesis de poliacrilamida al 10%.</b>	71
11	<b>ANALISIS DE RESULTADOS</b>	72
12	<b>CONCLUSIONES</b>	76
13	<b>REFERENCIAS</b>	78
	<b>APÉNDICE</b>	85
	<b>I MATERIAL</b>	85
	<b>II SOLUCIONES</b>	86

<b>ÍNDICE DE GRÁFICAS, FIGURAS Y TABLAS</b>	Pagina
<b>Figura 1</b> <i>Mycobacterium tuberculosis</i> . a) Clasificación de <i>M. tuberculosis</i> y b) Morfología de bacilos por microscopía electrónica de barrido.	15
<b>Figura 2</b> Pared celular de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> .	16
<b>Tabla 1</b> Lípidos de diferentes especies de <i>Mycobacterium</i> .	17
<b>Figura 3</b> Liposoma de 4MT.	19
<b>Figura 4</b> ELISA para lípidos 4 MT.	36
<b>Figura 5</b> ELISA liposomal con L 4MT	37
<b>Figura 6</b> ELISA para isotipos IgG.	38
<b>Figura 7</b> Cultivo de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> H 377 Ra de 5 semanas en medio Sautón.	45
<b>Tabla 2</b> Concentración del antígeno 4MT por vial	46
<b>Tabla 3</b> Cinética de anticuerpos IgG policlonal. En sueros de ratón Balb/C inmunizados con 100 µL de Liposomas L 4MT , medida por ELISA Liposomal.	47
<b>Gráfica 1</b> Cinética de respuesta inmune humoral mediada por anticuerpos IgG en suero de ratón Balb/C.	48
<b>Figura 8</b> Cultivo de hibridomas productoras de anticuerpos monoclonales anti L 4MT.	49
<b>Figura 9</b> ELISA para lípidos.	50
<b>Tabla 4</b> Monitoreo en la placa 1 por ELISA para lípidos 4MT.	51
<b>Tabla 5</b> Monitoreo en la placa 2 por ELISA para lípidos 4MT.	52
<b>Tabla 6</b> Monitoreo en la placa 3 por ELISA para lípidos 4MT de hibridomas positivos.	53
<b>Tabla 7</b> Monitoreo en la placa 4 por ELISA para lípidos 4MT de hibridomas positivos.	54
<b>Tabla 8</b> Monitoreo en la placa 5 por ELISA para lípidos 4MT de hibridomas.	55
<b>Tabla 9</b> Monitoreo de la placa 6 por ELISA para lípidos 4MT de hibridomas.	56
<b>Gráfica 2</b> ELISA para lípidos 4MT de hibridomas positivos de la placa 1.	57
<b>Tabla 10</b> Hibridomas fusionados y positivos en ELISA de las seis placas.	58
<b>Tabla 11</b> Hibridomas clonados de tres placas.	58
<b>Tabla 12</b> Clonación de seis hibridomas con absorbancia mayor a 1.000 por ELISA 4 MT.	59
<b>Gráfica 3</b> Clonas productoras de AcM IgG anti 4 MT.	60

<b>Tabla 13</b> ELISA para determinar subclase de IgG anti 4 MT producida por las clonas obtenidas en sobrenadante de cultivo.	61
<b>Gráfica 4</b> Clonas productoras de AcM IgG3 anti 4 MT por ELISA	62
<b>Gráfica 5</b> ELISA Isotipos de IgG de ratón	63
<b>Tabla 14</b> Clonas productoras de antierpo IgG monoclonal anti L 4MT en ELISA liposomal.	64
<b>Gráfica 6</b> ELISA liposomal con clonas productoras de AcMo IgG3 anti L4MT.	64
<b>Gráfica 7</b> ELISA liposomal anticuerpos IgG3 anti L4MT.	65
<b>Tabla 15</b> Análisis estadístico (Wilcolxon) del ELISA liposomal para muestras pareadas.	66
<b>Figura 10</b> Western blot de sobrenadantes y purificados de clonas Productoras de AcM IgG3 anti 4 MT.	67
<b>Tabla 16</b> Fracciones eluidas por afinidad del AcM 4F7B3E11	68
<b>Gráfica 8</b> Purificación del AcMo 4F7B3E11 por cromatografía de afinidad con Proteína G.	69
<b>Tabla 17</b> Concentración de proteínas de los AcMos por el método de Lowry.	69
<b>Figura 11</b> Western blot con AcMo IgG3 anti 4MT purificados mediante cromatografía de afinidad.	70
<b>Figura 12</b> Gel de acrilamida al 10 %.	71

## ABREVIATURAS

Albúmina Sérica Bovina	BSA
Anticuerpo Monoclonal	AcMo
Bacilo de Callmette-Güerin	BCG
Bacilos Acido Alcohol Resistente	BAAR
Derivado protéico purificado	PPD
Fracción lipídica de Mycobacterium tuberculosis H 37 Ra	4 MT
Hipoxantina,Aminopterina	HT
Hipoxantina,Aminopterina,Timidina.	HAT
Inmunoensayo enzimático	ELISA
Inmunoglobulina G	IgG
Inmunoglobulina G subclase 1	IgG1
Inmunoglobulina G subclase 2a	IgG2a
Inmunoglobulina G subclase 2b	IgG2b
Inmunoglobulina G subclase 3	IgG3
Línea celular de ratón Balb/C	Ag8
Liposomas de 4MT	L 4MT
Liposomas de Fosfatidil colina	L PC
Marcador de pesos moleculares de proteínas	MPM
Medio de cultivo celular	RPMI 1640
Polietilenglicol	PEG
Ratones de cepa singénica	Balb/C
Solución Salina Reguladora de Fosfatos	PBS
Suero Fetal Bovino	SFB

## 1 RESUMEN

En México la tuberculosis es un problema de salud pública por las condiciones de país subdesarrollado, pobreza extrema, hacinamiento y desnutrición de la población entre otras. En el laboratorio de Inmunología Aplicada existe la necesidad de contar con un diagnóstico oportuno y confiable, usando anticuerpos monoclonales.

Se obtuvieron anticuerpos monoclonales (AcMo) en ratones Balb/C anti liposomas 4MT (L4MT), formados de lípidos de *Mycobacterium tuberculosis* H37Ra. Para arreglar los lípidos y exponer los epítomos involucrados en la respuesta inmune mediada por anticuerpos IgG.

Mediante ELISA para lípidos se evaluaron anticuerpos policlonales en el suero del ratón a fin de obtener el bazo.

Con el bazo del ratón y la línea celular Ag 8 se realizó la fusión obteniéndose 25 hibridomas productores de AcMo clase IgG subclase 3 (IgG3) de ratón Balb/C anti 4 MT y anti L 4MT.

Mediante Western Blot en papel de nitrocelulosa se analizaron los sobrenadantes colocando como antígeno 4 MT, siete fueron positivos.

De los sobrenadantes positivos a ELISA liposomal L4MT se purificaron los anticuerpos por afinidad utilizando columna acoplada a proteína G. Los purificados se cuantificó la concentración de AcMo por Lowry.

Se analizó la pureza de 4 AcMo mediante electroforesis en geles de poliacrilamida al 10% observándose las cadenas pesadas y ligeras de los anticuerpos IgG de ratón.

Con los anticuerpos monoclonales detectar antígenos que permitan determinar casos de tuberculosis donde el aislamiento es escaso o nulo.

## **2 MARCO TEÓRICO**

La tuberculosis es una enfermedad infecciosa importante en el mundo, se estima que un tercio de la población se encuentra infectada con bacilos de *M. tuberculosis*. Pero las personas no desarrollan la enfermedad se calcula que cada año aparecen 8 millones de nuevos casos en el mundo. En México esta enfermedad se ha convertido en un problema de salud pública con un diagnóstico difícil, tardado y en ocasiones sin aislamiento bacteriano (1,2).

### **2.1 Patogenia de la tuberculosis**

La tuberculosis se transmite de persona a persona por vía respiratoria, cuando una persona infectada tose y esparce en el aire microgotas de micobacterias. Aunque el bacilo puede invadir casi cualquier parte del cuerpo; el órgano más afectado es el pulmón por lo que se estima que cerca del 85% de los casos de tuberculosis, son pulmonares y el 15% restante, se disemina a otros órganos y sistemas. La infección puede ocurrir en sistema nervioso central, en el sistema linfático, en sistema genitourinario en huesos, articulaciones y en casos más graves puede presentarse una tuberculosis diseminada como la miliar.

Los pacientes con tuberculosis pulmonar presentan como síntomas generales: tos con esputo, fiebre, fatiga y pérdida de peso. Las lesiones pulmonares son progresivas e incluyen neumonía intersticial, infiltración mononuclear, granulomas mononucleares, lesiones caseosas, lesiones semilíquidas y cavernas que destruyen el parénquima pulmonar y son causa de insuficiencia respiratoria. Para un mejor control de la infección puede prevenirse por medio de técnicas disponibles que en forma confiable y oportuna permiten la confirmación de casos sospechosos que incluyen quimioprofilaxis, investigación de contactos vacunación con Bacilo de Callmette-Güerin (BCG). La vacuna BCG no previene la infección por *M. tuberculosis* pero disminuye el riesgo de diseminación hematógena temprana especialmente en niños (2, 3).

## **2.2 El bacilo de *Mycobacterium tuberculosis*.**

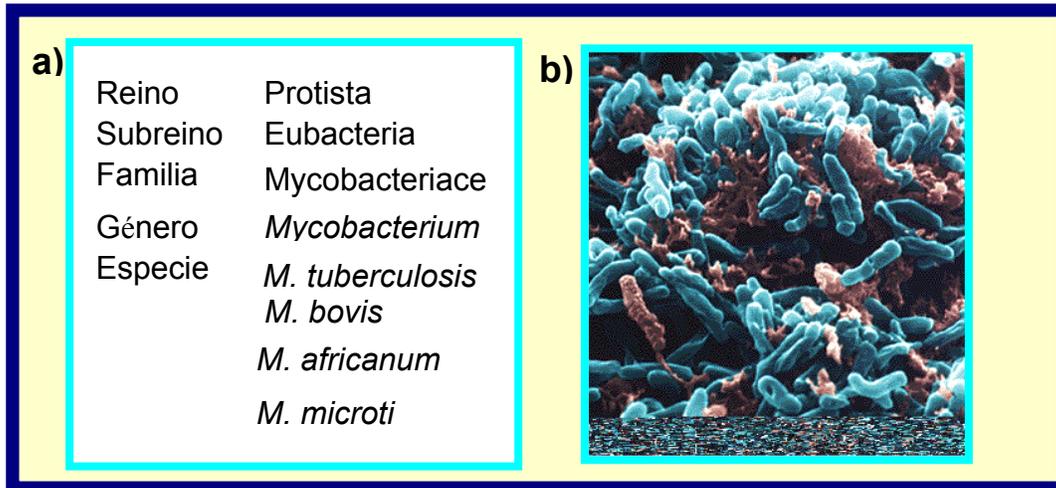
Son bacterias de forma bacilar gram positivos aunque no se tiñen adecuadamente en tinción de gram. Se utiliza para la identificación la coloración acidorresistente (BAAR) con fucsina, para demostrar a los microorganismos por microscopia su tamaño es de 2 a 4.5  $\mu\text{m}$ , son no ramificados, inmóviles, no esporulan, aerobios. Se dividen en un periodo de 24 a 48 horas bajo condiciones óptimas.

El género *Mycobacterium* es el único de la familia Mycobacteriaceae, contiene a especies que son parásitos obligados, lo mismo que saprofitos y diversas formas intermedias; el crecimiento óptimo de la bacteria ocurre a una presión óptima de  $\text{O}_2$  de 140 mmHg Por esta razón crecen mejor en la parte del cuerpo con una alta concentración de oxígeno como el pulmón.

El bacilo tuberculoso tiene las siguientes características biológicas:

- El bacilo se transmite de persona a persona
- No tiene toxinas conocidas así que puede permanecer dentro de los macrófagos alveolares por largos períodos.
- Es aerobio por lo que el crecimiento del bacilo depende de la tensión parcial de oxígeno del órgano o la lesión en donde se encuentre
- Es una bacteria de multiplicación lenta por lo que tiende a causar una enfermedad crónica.
- La virulencia es variable
- Tiene muchos determinantes antigénicos capaces de despertar gran variedad de respuestas inmunológicas en el huésped (1, 4, 5).

La especie *M. tuberculosis* es el más importante del género por causar la enfermedad en humanos. Se considera que las especies *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. africanum* y *M. microti* forman el complejo tuberculosis (figura 1). Las otras micobacterias se conocen como micobacterias no tuberculosas o también como *micobacterias atípicas*.



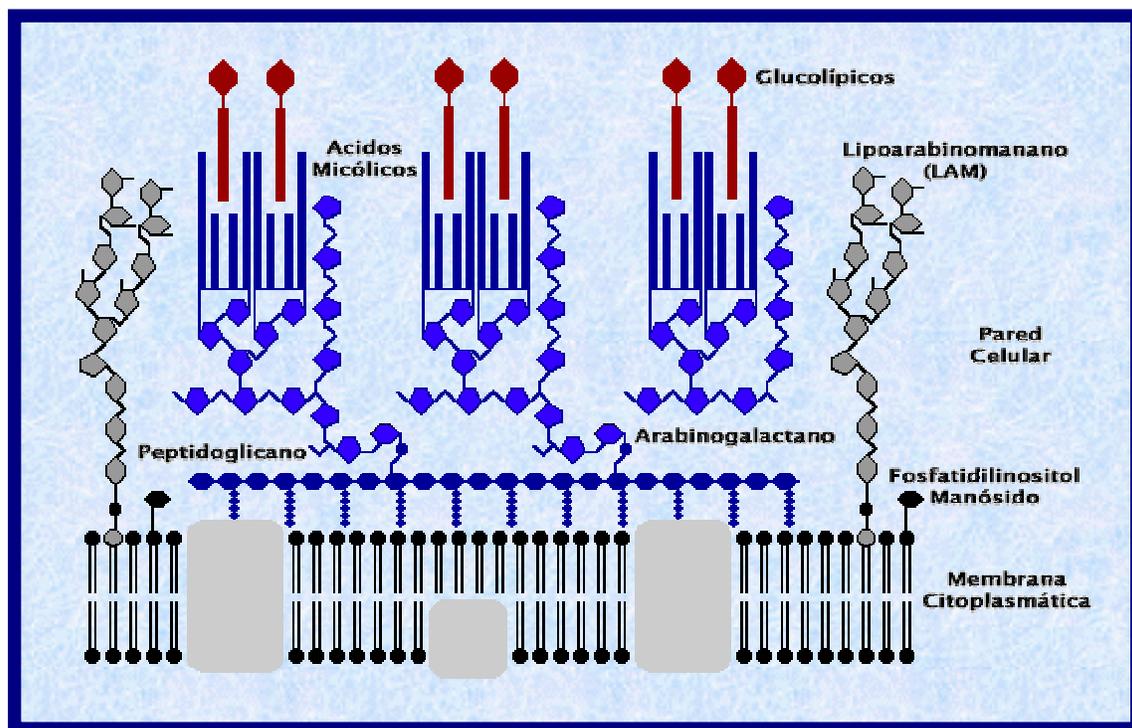
**Figura 1 *Mycobacterium tuberculosis*.** a) Clasificación de *M. tuberculosis* y b) Morfología de bacilos por microscopía electrónica de barrido (6).

### 2.3 Pared celular de *Mycobacterium tuberculosis*

La pared celular de *Mycobacterium tuberculosis* es muy compleja, posee una pared dos veces más gruesa que la de los bacilos gram negativos, difícil de romper. De ello depende entre muchas otras propiedades el que sea alcohol ácido resistente de ahí el nombre de bacilo-ácido-alcohol-resistente (BAAR).

El bacilo de tuberculosis es un verdadero mosaico antigénico constituido por proteínas asociadas a la pared celular, otras proteínas citoplasmáticas y otros secretados, los cuales son captados por el macrófago y serían los principales inductores de la respuesta inmune.

Tomando un especial interés el estudio de otras moléculas presentes en las micobacterias, peptidoglicanos y moléculas de arabinogalactanos, unidas por enlaces covalentes y cubiertos por lípidos libres y lipopeptidos.



**Figura 2** Pared celular de *Mycobacterium tuberculosis* (6).

El esqueleto del peptidoglicano es relativamente uniforme en todas las especies micobacterianas y representan el elemento fundamental de la pared celular los puentes intrapeptidos de las cadenas de péptidoglicano confieren una rigidez al esqueleto estructural. Los ácidos micólicos están unidos a estas cadenas por enlaces covalentes con la D-arabinosa y la D-galactosa estos ácidos son los principales de la pared celular micobacteriana.

Los lípidos contienen ceras, micósidos específicos de especie (glucolípidos y glucopeptidos), el factor cordón (6,6 –dimicolato de trealosa) que se asocia al alineamiento en paralelo de las filas de bacilo como formando cordones.

#### 2.4 Lípidos de *Mycobacterium tuberculosis*

Los lípidos de las micobacterias son compuestos que predomina presentándose solos o formando complejos con aminoácidos azúcares o ambos llegan a constituir hasta un 60% de la pared celular y un 40% del peso seco de la bacteria. Actualmente es importante el estudio de estas moléculas no sólo por saber de sus características químicas sino por las alteraciones que provocan el huésped (7,8).

(+) PRESENTE    (-) AUSENTE    (\*) NO ESTUDIADO

Molécula	<i>bovis</i>	<i>marinum</i>	<i>kansasii</i>	<i>leprae</i>	<i>tuberculosis</i>	<i>avium</i>	<i>lepraemurium</i>
Ácidos micólicos	+	+	+	+	+	+	+
Factor cuerda	+	+	+	+	+	+	+
Sulfátido	-	+	+	+	H37Ra	+	+
Glicolípido fenólico	+	+	+	+	Canetti	-	+
Peptoglicolípidos	-	+	-	-	-	-	-
Lipooligosacáridos	*	+	+	-	+	*	*
Lipoarabinomana	*	*	*	+	+	*	*

**Tabla 1** Lípidos de diferentes especies de *Mycobacterium* 8).

## **2.5 La fracción 4MT.**

Es un complejo de lípidos superficiales de la pared de *Mycobacterium tuberculosis*, originalmente, la fracción 4MT se identificó como un componente del ESMTB Ra mediante western blot como una banda de alrededor de 4kDa en el Laboratorio de Inmunología Aplicada del InDRE. Esta fracción es reconocida por anticuerpos de la clase IgG de sueros de pacientes con tuberculosis.

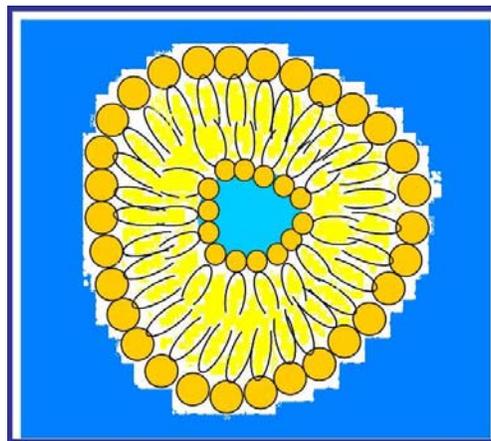
El antígeno utilizado en esta tesis (4MT) se obtiene a partir de bacilos *Mycobacterium tuberculosis* H37Ra por la extracción de lípidos con solventes orgánicos, cloroformo-metanol en proporción 1:2. Se analiza el patrón electroforético en geles de poliacrilamida al 18% y se tiñe con Sudán negro observando una banda de aproximadamente 4 kDa que corresponde a la fracción 4MT de carácter lipídico.

La fracción 4MT está compuesta por una mezcla de lípidos que se disuelven en cloroformo y al ser separados en cromatografía en capa fina, se identifican 6 componentes: lípidos neutros revelados con bismuto, con ninhidrina se revelan tres componentes lipopeptidos y con molibdato un componente con grupo fosfato un fosfolípido. Al identificar azúcares con alfa naftol, los seis componentes contienen glicolípidos (6,9).

## 2.6 Liposomas de *Mycobacterium tuberculosis*.

Los liposomas son estructuras vesiculares cerradas obtenidas en el laboratorio formadas por lípidos de *M. tuberculosis*. Estos en general son de conformación cilíndrica, cónica y de cono invertido, cuya estabilidad y permeabilidad dependen de su composición. Se clasifican, dependiendo del número de bicapas lipídicas que contienen, en unilamelares (LUL) y multilamelares (LML) estos últimos miden de 1 a 5  $\mu\text{m}$  de diámetro.

Generalmente, los liposomas multilamelares se forman por agitación mecánica de una película muy fina de lípidos a la que se adiciona la solución acuosa con las moléculas que se van a encapsular; estas moléculas quedan atrapadas en los espacios acuosos si son polares o se insertan en la bicapa lipídica si son hidrofóbicas (6,10,11).



**Figura 3** Liposoma de 4MT(6).

## **2.7 Respuesta inmune a tuberculosis.**

La respuesta inmune frente a la infección con *M. tuberculosis* es variable y depende tanto de las características genéticas del individuo (se ha asociado a HLA-DR2 con mayor riesgo de progresión de infección pulmonar avanzada, y a un efecto de protección por un gen ligado a HLA-DR11), como la edad, estado nutricional y del ambiente epidemiológico que lo rodea (12).

El pulmón es el principal órgano blanco para el bacilo y su principal vía de entrada es la inhalación de micro gotas con bacilos. Las gotas grandes son removidas por mecanismos bronquiales no específicos, la adhesión a los tejidos es fácil por las condiciones estériles en el interior del pulmón. Los bacilos son fagocitados por los macrófagos alveolares y son destruidos por enzimas proteolíticas y radicales tóxicos de oxígeno. Si estos mecanismos son insuficientes, la infección local persiste y se liberan nuevos bacilos. Por medio de factores quimiotácticos, muchos monocitos sanguíneos entran al sitio, se transforman en macrófagos inmaduros que ingieren a los bacilos liberados y se establece una simbiosis en la cual no hay daño mutuo ya que los macrófagos no han sido activados. Aquí pueden entrar en acción las células NK, activadas por IL-12 producida por macrófagos, que pueden lisar directamente células infectadas o producir IFN- $\gamma$  que activa macrófagos en forma inespecífica(2, 13).

### **2.7.1 La respuesta inmune celular**

La inmunidad y la patogénesis de la tuberculosis están en su mayoría controlada por la respuesta celular. Los linfocitos T con cadenas  $\gamma\delta$  (5% del total de la población linfocitaria) reconocen proteínas de choque térmico y antígeno de micobacterias. Los linfocitos T con cadena  $\alpha\beta$  constituyen el 95% de los linfocitos T, están ampliamente distribuidos en el organismo y comprenden dos grandes subpoblaciones: CD4+ y CD8+. Los linfocitos CD4+ se conocen como cooperadores y por efecto de la estimulación antigénica y de citocinas pueden diferenciarse en células Th1 (dependientes de IL-12 e IL-18) que producen citocinas proinflamatorias, células Th2 (dependientes de IL-4) secretoras de citocinas cooperadoras y células Th3 con funciones reguladoras. Los linfocitos CD8+ son citotóxicos y en condiciones similares a las CD4+ dan lugar a células Tc1 y Tc2. Hay linfocitos T $\alpha\beta$  CD4-, CD8- que se han observado principalmente en individuos PPD positivos y muestran proliferación con ácido micólico. Son citotóxicos para células CD1b+ y representan un elemento más de protección ante micobacterias.

El mecanismo más efectivo de eliminación de bacilos es la activación de macrófagos por las citocinas provenientes de linfocitos Th1, principalmente interferón- $\gamma$ . También las células infectadas pueden ser destruidas por T CD8+. En cuanto a las células Th2, las citocinas que producen contribuyen a la inducción de una buena respuesta mediada por anticuerpos que no es protectora, pero puede servir como indicadora de infección (2,14).

### **2.7.2 La respuesta inmune humoral**

La respuesta de IgM está dirigida principalmente a polisacáridos no específicos del agente son los anticuerpos que aparecen primero aunque sus títulos altos no indican la presencia o ausencia de la enfermedad. Los anticuerpos IgG son indicadores de enfermedad o de contacto con *M.tuberculosis*.

Por lo que la mayor parte de la población tiene anticuerpos IgG contra antígenos antibacterianos en niveles bajos. La tuberculosis es la causa más frecuente de muerte mundialmente se estima que produce cerca de 7% de todas las defunciones la mayor parte en adultos jóvenes; por tanto el costo que cobra la tuberculosis en términos tanto económicos como humanos es enorme. La aparición de la epidemia por VIH no sólo ha incrementado el problema de la tuberculosis, además ha planteado interrogantes sobre la insuficiencia de los métodos actuales de diagnóstico, tratamiento y prevención. Por lo tanto la creciente elevación en el número de casos de tuberculosis se ha incrementado con los casos no reportados y lo tardado de los métodos de laboratorio.

Por lo que el problema global de la tuberculosis se deberá de afrontar de una manera más adecuada (6,15).

### 2.7.3 Moléculas CD1

Las moléculas CD1 tienen afinidad por epítopos de naturaleza lipídica y los de naturaleza peptídicos. El acoplamiento entre las de CD1 y los epítopos lipídico ocurre en el citoplasma de las células presentadoras de antígenos y los complejos CD1-lípido son llevados a las superficies de las células así como son llevados los complejos antigénicos donde participan las moléculas MHC de clase I. Las células T que reconocen a los antígenos asociados a CD1b son linfocitos T-CD4 y T-CD8+ estas células al activarse adquieren capacidad de destruir macrófagos infectados con microorganismos intracelulares.

Un mecanismo de escape de *M. tuberculosis* que involucra la regulación negativa de la molécula presentadora de antígeno CD1 en la superficie de las células presentadoras de antígeno y esta pérdida de CD1 está asociada con una completa inhibición de la capacidad de las células infectadas para la presentación de antígeno lipídico y glicolípidos de *M. tuberculosis* a las células T en CD1.

Para que esté mecanismo se lleve a cabo se requiere de disminuir los niveles de RNA mensajero que codifican para el receptor CD1, por lo que *M.tuberculosis* persiste intracelularmente en macrófago y células dendríticas. (2,6,4).

## 2.8 Diagnóstico de tuberculosis.

Para el diagnóstico de la tuberculosis, además de la historia clínica del paciente y los datos epidemiológicos, es necesario identificar a los bacilos de *M. tuberculosis*. Ya sea por métodos directos como la baciloscopía, el cultivo en medio de Lowenstein Jensen y Reacción en cadena de la polimerasa (PCR), o por métodos de diagnóstico indirectos como el Radioinmunoensayo, la Inmunofluorescencia y el ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay).

La baciloscopía es un método utilizado en casos de tuberculosis pulmonar, en donde hay suficiente cantidad de bacilos por lo menos se necesitan de 5000 bacilos por mililitro no así en casos de tuberculosis extrapulmonar por la escasez de bacilos; en particular la baciloscopía como diagnóstico en niños enfermos se complica porque son incapaces de expectorar. En esta técnica los bacilos ácido alcohol resistentes se tiñen por la tinción de Ziehl Neelsen y lo que se observa son bacilos curvos, rojos de 2  $\mu\text{m}$  a 4.5  $\mu\text{m}$  indicando la presencia de micobacterias los resultados positivos no es una prueba afirmativa para *M.tuberculosis* porque otras bacterias pueden también causar la enfermedad pulmonar.

En el cultivo se hace el aislamiento del bacilo a partir expectoración, lavado gástrico, líquido cefalorraquídeo, líquido pleural, orina y en biopsias sembrando en Lowenstein Jensen donde se pueden detectar hasta 10 bacterias por mL en la muestra clínica ya digerida y concentrada. La prueba de PPD es un derivado protéico purificado del medio de cultivo en donde crecen las micobacterias la dosis que se aplica es una décima de mL por vía intradérmica en la cara antero externa del brazo izquierdo se realiza la lectura de induración a las 72 horas induración de 10 mm indica positivo a PPD (7,16,17).

Las técnicas directas son de baja sensibilidad cercana al 50% para la baciloscopía y para el cultivo alrededor del 20%. Además el tiempo que tarda un cultivo para la detección de tuberculosis es muy largo entre seis y diez semanas (17).

El ELISA es utilizada ampliamente en la detección de antígenos y anticuerpos los métodos serológicos para el diagnóstico de tuberculosis son de fácil realización, económicos y la obtención de resultados es rápida presentan alta sensibilidad 82% y especificidad 95%(6).

### **2.8.1 Vacuna contra la tuberculosis.**

En México, dentro del cuadro básico de vacunación al nacer se administra por vía subcutánea la vacuna de BCG que previene los casos graves de tuberculosis meníngea. La vacuna se prepara con una cepa atenuada de *Micobacterium bovis* conocida como bacilo de Calmette y Guérin (bacilo de BCG). Esta bacteria originalmente virulenta se aisló de un caso de tuberculosis bovina y se mantuvo por pases repetidos en un medio de papa y glicerina complementada con bilis bovina. Después de 231 pases en 13 años se obtuvo una cepa no virulenta que se ha utilizado desde 1928 como vacuna anti-tuberculosis en humanos (18,19).

## 2.9 Anticuerpos monoclonales.

Los anticuerpos monoclonales son una herramienta útil para el diagnóstico presuntivo de múltiples enfermedades como dengue y cisticercosis. Se sabe que para desarrollar anticuerpos monoclonales primero se induce una primera respuesta policlonal con el antígeno de interés; cuando la respuesta es competente y presenta altos títulos de anticuerpos se procede a continuar con la obtención de anticuerpos monoclonales empleando las células del ratón inmunizado más las células de mieloma.

Kohler y Milstein desarrollaron la tecnología de los hibridomas en 1975 cuando pudieron producir inmunoglobulinas monoclonales con actividad de anticuerpo. La técnica inicial se desarrolló en células de ratón y en la actualidad ya se han podido producir hibridomas de células de varias especies incluyendo al hombre.

Los hibridomas de ratón productores de anticuerpos monoclonales se obtienen seleccionando cepas consanguíneas de ratón Balb/C y un el esquema de inmunización, el tamizaje de anticuerpos policlonales específicos se realiza por la técnica de ELISA cuando se tienen títulos altos de anticuerpo (absorbancia mayor de uno) las células esplénicas extraídas del bazo del ratón hiperinmunizado más células de mieloma en presencia de polietilenglicol (PEG adicionarlo 1 mL en 1 minuto a 37° C ) se fusionan.

La fusión da origen a tres tipos de hibridomas:

Linfocitos – Linfocitos, **Linfocitos – Mieloma** y Mieloma – Mieloma y la selección de los hibridomas es en medio de cultivo celular adicionándole HTA (hipoxantina, aminoptericina y timidina). Las células fusionadas se colocan en placas de poliestireno con medio de cultivo celular los hibridomas específicos ya identificados por ELISA se clonan en placas de 96 pozos y los cultivos resultantes se analizan por nuevamente por ELISA para la secreción de anticuerpos específicos. Las clonas específicas se subclonan los sobrenadantes se analizan y los cultivos se proliferan en botellas de cultivo se congelan y se conservan en nitrógeno líquido. Los anticuerpos monoclonales obtenidos del sobrenadante se pueden purificar por una cromatografía de afinidad (20,2,22).

Es necesario redoblar esfuerzos en la investigación básica para el logro de nuevas técnicas que nos de un resultado oportuno en la detección de la tuberculosis por lo que la tecnología de generación de células secretoras de anticuerpos monoclonales dirigido contra L4MT podrá ser utilizado en un ELISA de captura que detecte antígenos de *M tuberculosis* en muestras de pacientes cuando no es fácil demostrar bacilos por baciloscopía y oportunamente por cultivo (20).

### **3 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

Desde hace ya varios años en México la tuberculosis sigue siendo un problema de salud pública. Por lo que es necesario el desarrollo de técnicas rápidas para tener un diagnóstico oportuno de alta especificidad y sensibilidad en este trabajo se pretende obtener anticuerpos monoclonales contra la fracción 4MT de *Mycobacterium tuberculosis* H37Ra a fin de mejorar el diagnóstico usando anticuerpos monoclonales en el desarrollo de técnicas como el ELISA de captura.

### **4 OBJETIVO GENERAL**

Obtener anticuerpos monoclonales contra la fracción 4MT de *Mycobacterium tuberculosis* H37 Ra incluida en liposomas.

### **5 OBJETIVOS PARTICULARES**

- ❖ Contar con ratones competentes que tengan respuesta inmune contra liposomas 4MT de *Mycobacterium tuberculosis* H37Ra
- ❖ Proliferar y mantener la línea celular Ag8 (mieloma)
- ❖ Montar la metodología en el laboratorio para proliferar y mantener la línea celular Ag8 y los hibridomas obtenidos en esta tesis.
- ❖ Extraer el bazo de ratón inmunizado con L4MT y fusionar los Linfocitos B del bazo con las células Ag8.
- ❖ Clonar y subclonar los hibridomas productoras de anticuerpos anti-L4MT de la clase IgG para obtener AcMo anti-L4MT.
- ❖ Seleccionar clones positivas por ELISA Liposomal a fin de mantenerlas y expandirlas en el laboratorio de Inmunología Aplicada. mantenerlas y expandirlas
- ❖ Caracterizar de cada clona el tipo y subtipo de anticuerpo que produce por ELISA y Western-Blot.
- ❖ Crear el Banco de hibridomas anti-L4MT y conservarlas en nitrógeno líquido para usarlas en otros protocolos.
- ❖ Obtener el AcMo puro y demostrar su pureza por la electroforesis

## **6 HIPÓTESIS**

Al Inmunizar a ratones Balb/C por un año con la fracción lipídica 4MT incluida en liposomas se induce la diferenciación en el bazo de linfocitos B productores de anticuerpos IgG policlonales anti L4MT por lo que al fusionarlas con la línea celular Ag8 de ratón Balb/C, se obtendrán hibridomas productores de anticuerpos monoclonales IgG anti L4MT.

## **7 DISEÑO DE INVESTIGACION**

### **7.1 Tipo de estudio**

El trabajo es experimental longitudinal prospectivo.

### **7.2 Población**

Hibridomas productores de anticuerpos monoclonales IgG de ratón anti L 4 MT.

### **7.3 Criterios de selección**

Inclusión: Hibridomas viables productores de anticuerpos IgG.

Exclusión: Hibridomas no viables.

Eliminación: Hibridomas viables que no producen anticuerpos IgG

### **7.3 Variables**

Dependiente: Número de células Ag8 y células de bazo.

Independiente: Hibridomas fusionados

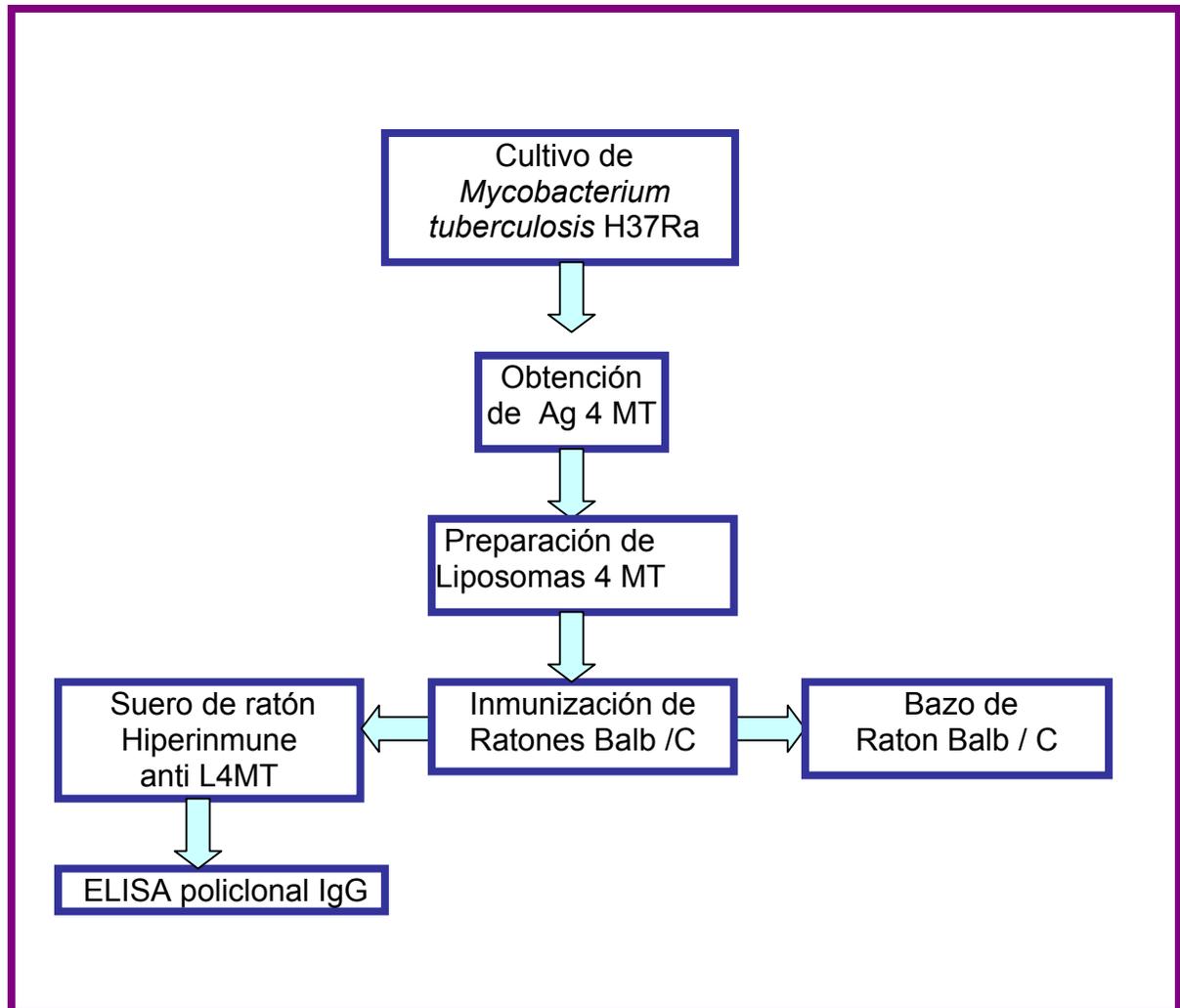
### **7.5 Diseño Estadístico**

Análisis estadístico de Wilcoxon.

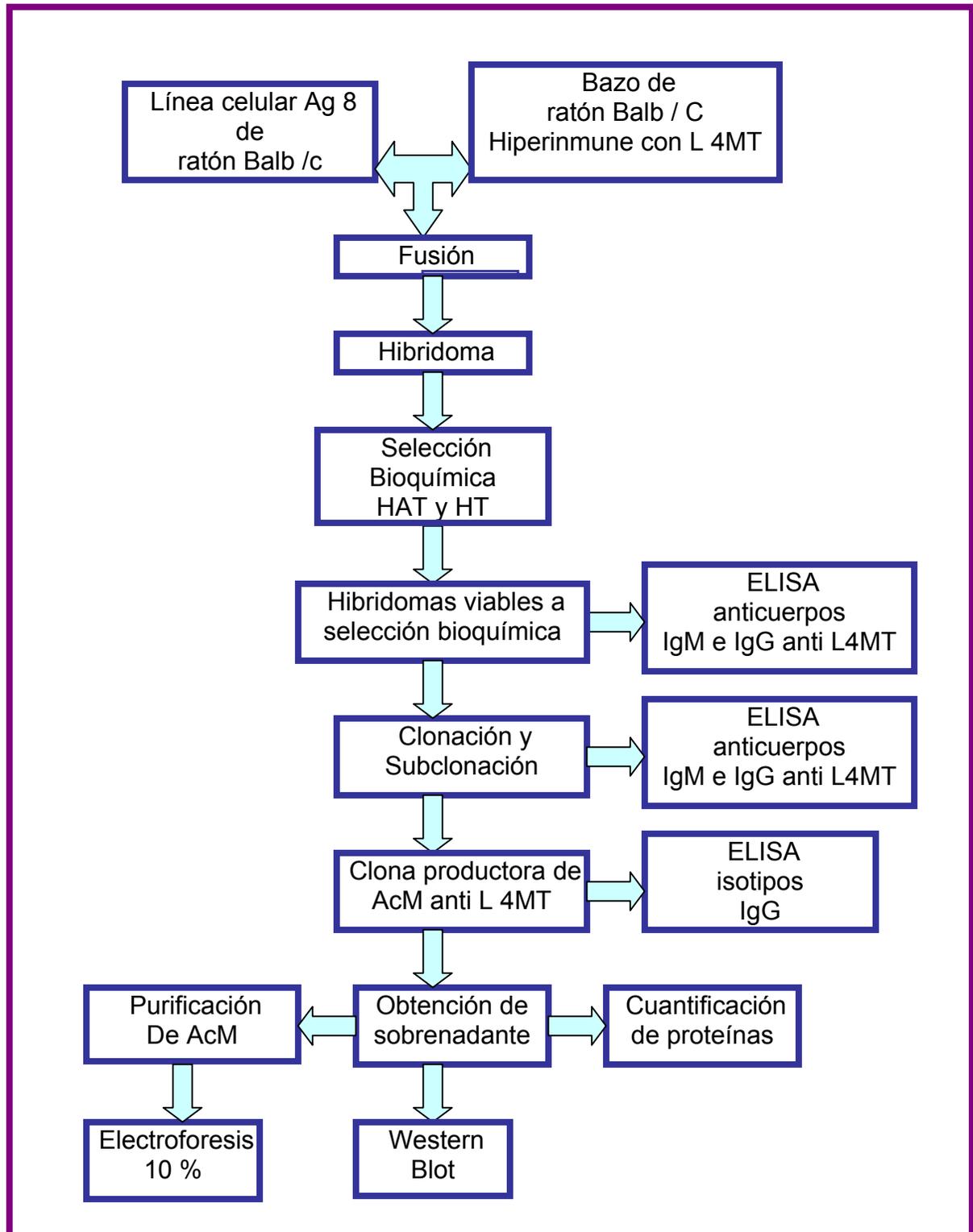
## 8 DIAGRAMA DE FLUJO EXPERIMENTAL

### Estrategia Experimental:

#### a) Obtención de anticuerpos policlonales anti L 4 MT.



**Estrategia Experimental:**  
**b) Obtención de anticuerpos monoclonales anti L 4 MT.**



## 9 MÉTODOS

### 9.1 Obtención de la fracción 4MT.

1. El antígeno lipídico 4MT se obtiene a partir de una cepa de *Micobacterium tuberculosis* H37Ra de cinco semanas de cultivo a 37° C en medio Sauton líquido
2. Se cosechan las micobacterias por filtración con papel Watman y se hacen lavados con solución salina estéril al 0.85% se conservan en alícuotas de 20 mL en tubos de poliestireno estériles a 4° C.
3. Una alícuota del cultivo se vierte en un matraz Erlenmeyer con tapa de baquelita se adiciona 100 mL de la mezcla cloroformo-metanol (1:2) y se agita 1 hora a temperatura ambiente.
4. Los bacilos se incuban a 50° C durante 18 horas.
5. Se centrifuga a 2500 rpm un tiempo de 15 minutos se recupera el sobrenadante al cual se agrega un volumen de una mezcla cloroformo-agua (1:1) se agita durante 1 hora a temperatura ambiente la mezcla se coloca en un embudo de separación hasta la separación de fases aproximadamente 24 horas .
6. Después de 24 horas se recupera la fase que queda en el cloroformo y se divide en alícuotas de 2 mL.
7. Se evapora el cloroformo con gas nitrógeno y se mantiene cada alícuota a menos 70° C
- 8.- La fracción 4MT queda sedimentada en el vial y para utilizarse debe resuspenderse en etanol o en una mezcla de hexano-etanol.

## 9.2 Formación de liposomas

Se preparan liposomas constituidos por 4MT, L4MT y como control negativo LPC. Las concentraciones de los liposomas se ajustan a 10 mg /mL en cloroformo. Los liposomas se forman por un método de fase inversa con agitación mecánica constante en un matraz de dos bocas, por una entra aire y por la otra se hace vacío a 10 atmósferas de presión (Baeza y col, 1998).

- ❖ Para preparar los L4MT se toman 800  $\mu$ L de la solución de 4MT en cloroformo, se colocan en el matraz de dos bocas y se agita hasta que se evapore el cloroformo. Se adiciona 1 mL de éter dietílico y 300  $\mu$ L de PBS filtrado las dos fases se agitan durante 45 segundos Se aplica vacío para que se evapore el éter y los liposomas formados quedan como una suspensión de color blanco. Se ajusta el volumen final a 1mL con 700  $\mu$ L de PBS.
  
- ❖ En el caso de LPC en el matraz de dos bocas se colocan 70  $\mu$ L de PC y se agita hasta que se evapora el cloroformo. Se añaden 1 mL de éter dietílico y 300  $\mu$ L de PBS filtrado y se agitan las dos fases por 45 segundos. Se aplica vacío para que se evapore el éter y los liposomas formados quedan como una suspensión de color blanco. Se ajusta el volumen a 1 mL con PBS.

### **9.3 Cultivo y proliferación de células Ag8**

1. Se descongelan células del mieloma Ag8 y se proliferaran en medio de cultivo RPMI complementado con suero fetal bovino al 10%.
2. Diariamente los cultivos se revisan en el microscopio invertido, vigilando la morfología celular así como las posibles fuentes de contaminación bacteriana y/o fúngica.
3. Se realizan cambio de medio cuando su color vira de anaranjado a amarillo, lo que indica un cambio en el pH por acidificación.
4. Cuando la proliferación celular es más de 10 millones, una parte de las células se proliferan en cajas nuevas y otra se congelan a  $-273^{\circ}$  C en nitrógeno líquido. Estas células son utilizadas en la fusión celular.

### **9.4 Fusión celular**

1. La producción de anticuerpos monoclonales se realiza mediante la fusión de células esplénicas del bazo del ratón inmunizado y de mieloma de la línea celular Ag8.
2. El ratón se sangra por vía retroorbital para determinar anticuerpos por ELSA.
3. Se sacrifica al ratón por dislocación.
4. En la campana de flujo laminar se hace la extracción del bazo del ratón, y se coloca en una caja de Petri estéril, que contenía aproximadamente 5 mL de medio RPMI sin complementar y un cuadro de 3x3 cm de tela de organza estéril.
5. Con la tela de organza se envuelve totalmente el bazo y con ayuda del embolo de una jeringa estéril se presiona el bazo lo más suave posible para disgregar las células del órgano, las cuales se resuspenden con una pipeta estéril.
6. La suspensión celular resultante se coloca en un tubo para cultivo celular de 15 mL con medio RPMI sin complementar y se lavan dos veces por centrifugación a 1200 rpm durante 10 minuto
7. Se resuspende el sedimento en 5 mL de RPMI.
8. En otra botella de cultivo celular se tienen  $5 \times 10^6$  células de mieloma en medio RPMI las cuales se despegan mediante agitación suave con ayuda de una pipeta de 10 mL

9. La suspensión se coloca en un tubo estéril de 50 mL y se centrifuga a 1200rpm por 10 min

10. Se elimina el sobrenadante y se resuspende el sedimento en medio RPMI sin complementar; se lavan 2 veces con este mismo medio.

Nota: Las células de mieloma se lavan al mismo tiempo que las células de bazo mientras se cuentan, las células se mantienen en la campana de flujo laminar.

### **9.5 Clonación celular.**

La uniformidad de los anticuerpos producidos por los híbridos celulares se incremento mediante la clonación.

1. Se toman 50  $\mu$ L de células híbridas de pozos de cultivo que se encuentran en confluencia y se hace una dilución 1:10 con medio RPMI complementado al 20%.

2. De la mezcla anterior se en placas de cultivo celular se hacen diluciones 1:2 en los pozos del A1 al A12.

3. Se cuentan las células de cada dilución y se elige el pozo donde tenemos 30 células por pozo.

4. Se toma todo el contenido del pozo y se resuspende en 18 mL de medio RPMI complementado con SFB al 20 % y se distribuye en la placa con 200  $\mu$ L por pozo.

5. Se dejan creciendo las células a 37° C en atmósfera de CO<sub>2</sub> al 5%.

6. Se evalúa el crecimiento celular de todos los pozos y se prueba por ELISA 4MT para poner en evidencia la producción de anticuerpos monoclonales IgG anti 4MT.

## 9.6 ELISA para lípidos con la fracción 4MT

1. Para realizar el ELISA con la fracción 4 MT se utiliza placas de poliestireno de alta afinidad colocando como antígeno 100  $\mu\text{L}$  de la fracción 4MT disuelta en etanol a una concentración de 500  $\mu\text{g}/\text{mL}$  se incuban hasta sequedad.
2. Se bloquean las placas con 200  $\mu\text{L}$  /pozo de PBS-BSA 1% se incuban 1 hora a 37° C.
3. Se retira la solución de bloqueo y se agrega 100  $\mu\text{L}$  de los sueros de ratón diluidos 1:250 en PBS-BSA 1% como controles y los sobrenadante de los hibridomas en cultivo, la placa se incuba 1 hora a 37° C.
4. Se decanta la placa y se hacen 4 lavados con 200  $\mu\text{L}$  de PBS-BSA 1% .
5. Se agrega conjugado anti-IgG total de ratón acoplado a peroxidasa 1:4000 en PBS-BSA 1% y se incuba 1 hora a 37° C.
6. Se retira conjugado anti-IgG total y se hacen 4 lavados con 200  $\mu\text{L}$  de PBS por pozo
7. Se agrega 100  $\mu\text{L}$  del cromógeno Ortofenilendiamina (OPD) y se incuban 120 minutos a 37° C.
8. Se para la reacción con 50  $\mu\text{L}$   $\text{H}_2\text{SO}_4$  4N
9. Se leen las placas a 492 nm en el lector de ELISA.

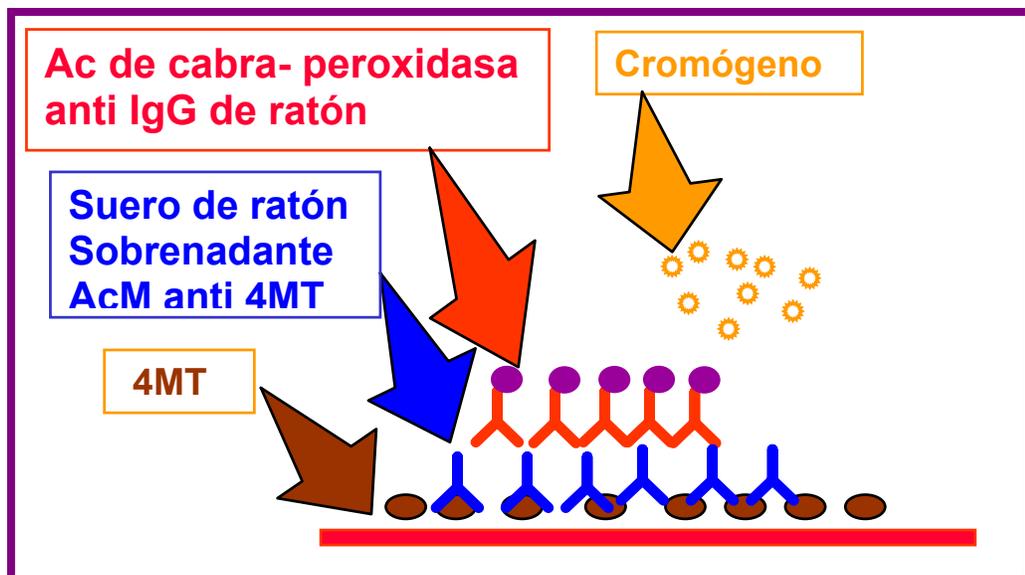


Figura 4 ELISA para lípidos 4 MT

### 9.7 ELISA liposomal con L 4 MT

- 1.- Se sensibiliza la placa de ELISA de mediana afinidad con 100  $\mu$ L de cada una de las preparaciones liposomales (LPC, L4MT-PC y L4MT) en PBS a una concentración de 500  $\mu$ g/mL
- 2.- Se incuba por 2 horas a temperatura ambiente.
- 3.- Se decanta y la placa se bloquea con 200  $\mu$ L PBS-BSA 1% por 1 hora a 37° C.
4. Se retira la solución de bloqueo y se colocan 100  $\mu$ L de los sueros de ratón diluidos 1:250 en PBS-BSA 1% y de sobrenadante de cultivo celular se incuban 1 hora a 37° C.
5. Las placas se lavan cuatro veces con 200  $\mu$ L PBS-BSA 1%.
6. Se agrega el conjugado anti-IgG de ratón acoplado a peroxidasa diluido 1:2,000 en PBS-BSA 1%, se incuba 1 hora a 37° C.
7. se decanta el conjugado y las placas se lavan cuatro veces más con PBS solo.
6. Se adiciona 100  $\mu$ L del cromógeno orto-fenilén diamina (OPD) en PBS y se incuba 30 minutos a 37° C.
7. La reacción se detiene con ácido sulfúrico 4 N.
8. Las placas se leen a 492 nm en el lector de ELISA.

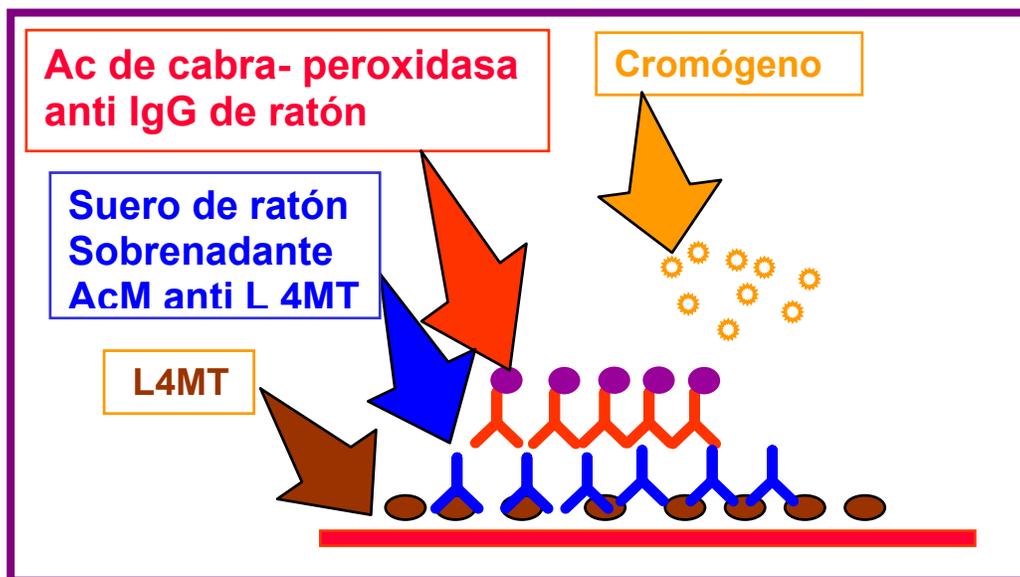


Figura 5 ELISA liposomal con L4MT

## 9.8 ELISA para Isotipos de IgG

1. Se sensibiliza una placa de ELISA de mediana afinidad con 100  $\mu$ L de cada uno de los isotipos de IgG (IgG 1, IgG 2a, IgG 2b, e IgG3) en dilución 1:500 se incuban 18 hora a 4° C.
2. Se decanta la placa y se bloquean con 200  $\mu$ L PBS-BSA 1% por 1 hora a 37° C.
3. Se colocan 100  $\mu$ L de los sobrenadantes de los hibridomas sin diluir y se incuban 2 horas a 37° C.
4. Se decanta la placa y se lava cuatro veces con 200  $\mu$ L PBS-BSA 1%.
5. Se decanta la placa y se lava cuatro veces con 200  $\mu$ L PBS-BSA 1%.
6. Se adiciona 100  $\mu$ L del conjugado anti-IgG de ratón acoplado a peroxidasa diluido 1:1000 en PBS-BSA 1% a cada pozo se incuban 1 hora a 37° C.
7. Se decanta la placa y se lava cuatro veces con PBS solo.
8. Se agrega 100  $\mu$ L del cromógeno orto-fenilén diamina (OPD) en PBS y se incuban 1 hora a 37° C.
9. La reacción se detiene con ácido sulfúrico 4 N. Las placas se leen a 492 nm en el lector de ELISA.

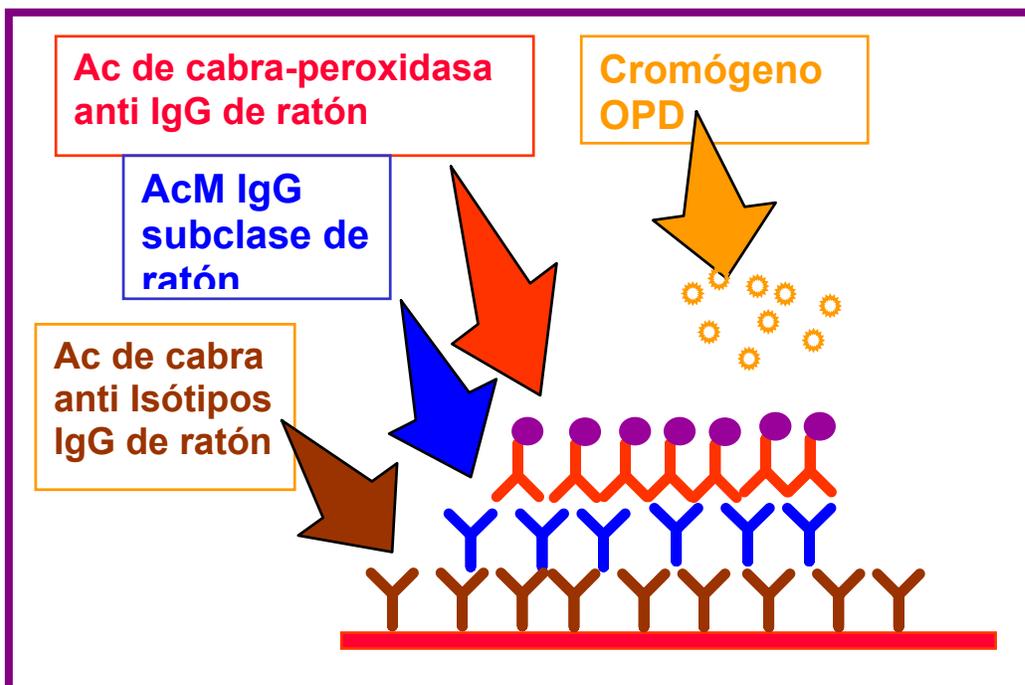


Figura 6 ELISA para isotipos IgG.

### **9.9 Purificación del anticuerpo monoclonal.**

La purificación de IgG a partir de sobrenadantes de hibridomas se realiza en una columna de afinidad con la proteína A de *Staphylococcus aureus*.

1. Los sobrenadantes se ajustan a pH 8 con 1/10 volumen de tris-base 1M. La columna se incuba con los sobrenadantes de los hibridomas toda la noche a 4° C.
2. Lavar las esferas con 20 veces el volumen de la columna con PBS pH 8 se colecta en tubos 2ml el eluyente para obtener la curva de albúmina.
4. Eluir la columna con glicina 0.1M pH 2.5 coleccionar el AcMo en 2 mL en tubos que contengan 50µL de tris 1M pH 8
5. Leer las absorbancias a 280nm luz UV se colectan las fracciones en donde las absorbancias sean mayor a 0.1
6. El anticuerpo dializa contra PBS pH 7.4 en frío y se almacena a -70° C

### 9.10 Método de Lowry

Para la determinación de proteínas del AcMo purificado.

#### Solución A

<b>Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> al 2% en NaOH 0.1N</b>	50 mL
Tartrato de sodio al 25%	0.5 mL
CuSO <sub>4</sub> al 1%	0.5 mL

Esta solución es estable un día

#### Solución B

Reactivo de Folin-ciocalteu diluido 1:2 en agua destilada

#### Estandar de proteína BSA

Albúmina sérica bovina 0.2 mg/mL

TUBO	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9
BSA $\mu$ L	0	25	50	100	200	400	500	1000		
BSA $\mu$ g	0	5	10	20	40	80	100	200		
H <sub>2</sub> O mL	1	0.975	0.95	0.9	0.8	0.6	0.5			
Problema mL									1	1
Sol. A mL	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
Sol. B mL	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3

Mezclar y dejar reaccionar de 30 minutos a 2 horas, leer a 500 nm.

### 9.11 Electroforesis en geles de poliacrilamida al 10%

En geles de poliacrilamida al 10% se analiza la pureza del anticuerpo monoclonal. Para esto, en un matraz Erlenmeyer se colocan los componentes para el **gel separador**:

Agua	7.9 mL
Acrilamida 30%	6.7 mL
Tris Base 1.5 M pH 8.8	5.0 mL
SDS 10%	0.2 mL
Persulfato de Amonio 10%	0.2 mL
Temed	0.010 mL

Para la preparación del **gel concentrador** se mezclan los siguientes componentes en otro matraz Erlenmeyer.

Agua	5.5 mL
Acrilamida 30%	1.3 mL
Tris Base 1.5 M Ph 8.8	1.0 mL
SDS 10%	0.08 mL
Persulfato de Amonio 10%	0.08 mL
Temed	0.010 mL

Se montan los cristales para la cámara vertical y se colocaron 7 mL del gel separador y se deja en reposo hasta que polimerizo. El grosor del gel debe ser de 1.5 mm polimerizado el gel separador se pone la mezcla del gel concentrador hasta el borde y se colocan los peines de modo tal que se formen los carriles donde se colocan las muestras con anticuerpo monoclonal anti L 4 MT.

Los geles solidificados se colocan dentro de la cámara con amortiguador de corrimiento.

Al final del corrimiento se proceden a teñir el gel con azul de coomasie para confirmar la correcta separación de las cadenas que forman el anticuerpo monoclonal obtenido.

### **9.12 Western Blot.**

Después de separar por electroforesis los componentes del antígeno micobacteriano ESMTB H 37 Ra y 4MT se lleva a cabo su transferencia a papel de nitrocelulosa

El gel con los antígenos separados se colocan en amortiguador de transferencia y se organiza un sándwich formado por la esponja, el papel filtro, el gel, la membrana de nitrocelulosa, papel filtro y esponja a fin de que queden colocados con el gel hacia el polo negativo y el papel de nitrocelulosa al positivo de la cámara de transferencia. La corriente en la cámara de transferencia se ajusta a 100 Volts y se deja correr 1 hora a 4° C. Una vez transcurrido el tiempo, la membrana de nitrocelulosa se saca, se tiñe con rojo de Ponceau para verificar que la transferencia haya sido eficiente, se lava con agua y se cortan las tiras de 5 mm y se hace la inmunodetección.

Las tiras se bloquean con PBS-BSA 1% durante 18 horas a 4° C para la reacción, se colocan los sueros humanos diluidos 1:500 en PBS-Tween-leche 2% y se incuban 1 hora

a temperatura ambiente con agitación suave. Después se coloca 1 mL del conjugado anti IgG humano acoplado a peroxidasa, diluido 1:1000 en PBS-Tween-leche 2%, y la reacción se revela con una solución de 4-cloro naftol hasta observar la aparición de bandas.

### **9.13 Expansión del anticuerpo monoclonal**

1. Se inyectan 0.3 mL de aceite mineral a cada ratón y dos días después se inoculan  $5 \times 10^6$  células híbridas resuspendidas en 0.5 mL de PBS estéril por vía intraperitoneal.
2. Quince días después los ratones desarrollan un tumor no sólido en el peritoneo, de donde por punción se obtiene el líquido de ascitis rico en anticuerpos se deja vivo al ratón para que siga produciendo líquido de ascitis.
4. El ratón se sacrifica por dislocación rápida del cuello se desinfecta con etanol al 70%. Se fija el animal en la tabla de disección y se procedió a realizar una incisión sobre la piel que recubre la cavidad peritoneal. Con ayuda de las pinzas de dientes de ratón, se desprendió el tejido que mantiene unida la piel y la capa serosa del peritoneo hasta dejar al descubierto toda la cavidad peritoneal.
4. Con una jeringa se puncionó la capa serosa del peritoneo y lentamente se extrae líquido de ascitis, el cual se centrifugó a 1200 rpm durante 10 min.
5. El botón celular contiene los hibridomas y el sobrenadante a los anticuerpos. Las células híbridas se cultivan y el sobrenadante se purifica por cromatografía de afinidad para obtener el AcMo.

La producción en grandes cantidades de anticuerpos monoclonales

(1 a 10 mg/mL) se logra en animales genéticamente compatibles con el hibridoma que se usó, lo cual tiene ventajas en la reducción en costos de reactivos para el cultivo celular, y evita riesgos de contaminación. Se realiza con la producción de líquido de ascitis.

#### **9.14 Congelación y descongelación de células.**

1. En un tubo estéril se trasvasa la suspensión celular de una botella de cultivo con una viabilidad de más del 90% de células.
  2. Se centrifuga a 1200 rpm por un tiempo de 10 minutos a temperatura ambiente
  3. Se decanta y el paquete celular se resuspende en un criotubo que contenga 1 mL de solución crioprotectora (90% de SFB y 10% de DMSO) la congelación celular debe ser en frío y lo más rápida posible.
  4. El criótubo se envolvió en una capa de algodón de un centímetro de espesor. Se guardo en una caja de poliuretano y se conservo a -70° C durante un día, para pasarlo al siguiente día al nitrógeno líquido.
  5. Cuando sea necesario, el vial se descongelo rápidamente en baño María a 37° C y las células se transfirieron a un tubo cónico estéril con 8 mL de medio RPMI al 10% SFB se centrifuga a 1200 rpm durante 10 minutos a 37° C. Se resuspendió el paquete celular con 7 mL de RPMI complementado al 20% SFB y se proliferaron en cajas para cultivo.
- Nota: El manejo de los cultivos celulares se realiza en campana de flujo laminar. Se mantiene a 30° C en una atmósfera húmeda con una mezcla de 95% aire y 5% de CO<sub>2</sub>.

## 10 RESULTADOS.

A continuación se presentan los resultados mas importantes del desarrollo de esta tesis experimental, se inician con la obtención del antígeno 4MT a partir de *Mycobacterium tuberculosis* H37Ra para la formación de liposomas 4MT.

Al ser insolubles los componentes de 4MT, se formaron las suspensiones liposomales para inmunizar a ratones Balb/C y como antígeno en ELISA.

### 10.1 Antígeno 4MT de *Mycobacterium tuberculosis* H37Ra

A partir de un cultivo de *M. tuberculosis* H 37 Ra de 5 semanas (figura 7) se cosecho 20 g de masa húmeda se hace una extracción con Cloroformo-metanol 1:2 para obtener el antígeno 4 MT en cloroformo. La cuantificación del antígeno se realiza por peso seco se evaporo el cloroformo con atmósfera de gas nitrógeno. Se separa en alícuotas para ser usadas en los diferentes experimentos de esta tesis (tabla 1).



**Figura 7** Cultivo de *Mycobacterium tuberculosis* H 37 Ra en medio Sautón.

Se obtuvieron 70 mL de 4MT en cloroformo, y se guardaron a  $-70^{\circ}$  C.

**Concentración de antígeno, fracción 4 MT de  
*Mycobacterium tuberculosis* H 37 Ra.**

Vial	Peso del vial vacío	Peso del vial con 4MT	Diferencia entre Viales.	Concentración en cada vial
1	6.235	6.2586	0.0236	23.6 mg
2	6.1194	6.1373	0.0179	17.9 mg
3	6.1089	6.1334	0.0245	24.5 mg
4	6.3164	6.3479	0.0315	31.5 mg
5	6.2554	6.2717	0.0163	16.3 mg
6	6.1926	6.2118	0.0192	19.2 mg
7	6.2355	6.2640	0.0304	30.4 mg
8	6.2663	6.2804	0.0141	14.1 mg
9	6.1530	6.1758	0.0228	22.8 mg
10	6.1679	6.1958	0.0279	27.9 mg

**Tabla 2 Concentración del antígeno 4MT por vial**

Con cada vial que contiene a 4 MT se formaron liposomas ajustando la concentración a 10 mg/mL disuelta en hexano-etanol.

## 10.2 Formación de Liposomas con la fracción 4MT.

Se forma con la fracción 4MT liposomas en PBS y se obtienen liposomas de 4MT.

Como testigo negativo se prepara liposomas con fosfatidilcolina.

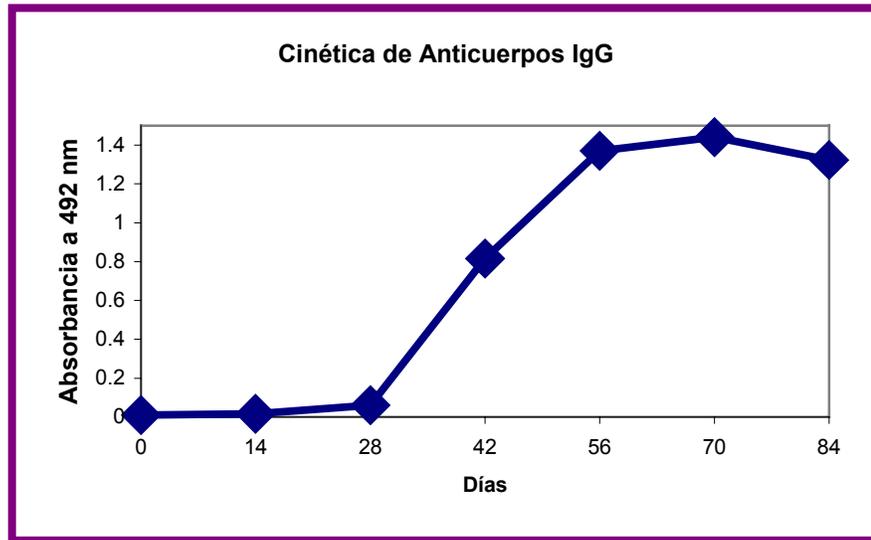
Se inmuniza cada semana a los lotes de ratones Balb/C con 0.1mL de los liposomas 4MT y LPC.

Suero de ratón Balb/ C	Días Post inmunización	Vía de inmunización	Absorbancia 492 nm
1	0	IP	0.009
2	14	IP	0.016
3	28	IP	0.061
4	42	IP	0.817
5	56	IP	1.370
6	70	IP	1.441
7	84	IP	1.323

**Tabla 3** Cinética de anticuerpos IgG policlonal con sueros de ratón Balb/C inmunizado con 100  $\mu$ L de L4MT. Utilizando la técnica de ELISA liposomal.

Los sueros de ratón obtenidos se guardan para utilizarlos como sueros control positivo y negativos en ELISA y Western Blot.

Cinética de anticuerpos IgG en suero de ratón Balb/C.

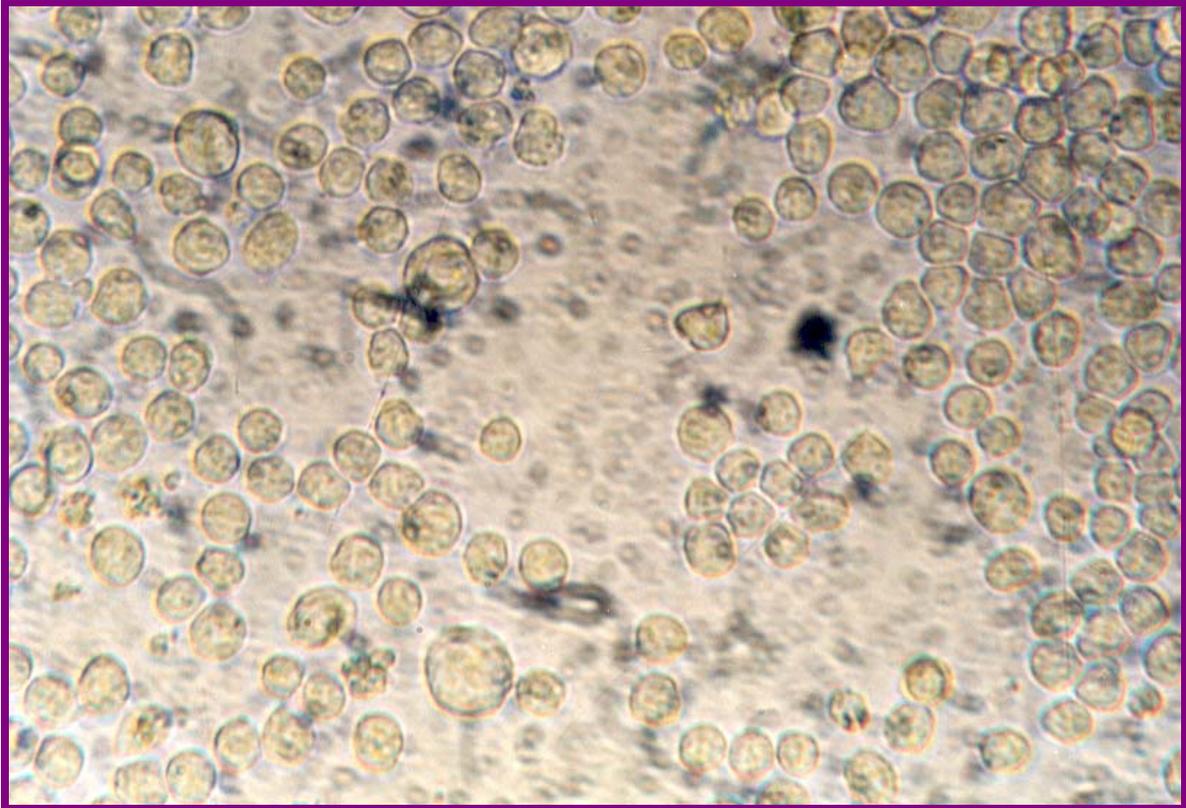


**Grafica 1** Cinética de respuesta inmune humoral mediada por anticuerpos IgG en suero de ratón Balb/C

En la gráfica se observa que al día 56 la respuesta de anticuerpos IgG es elevada con un valor de absorbancia a 492 nm de 1.4 por lo que ya se puede sacrificar al ratón para obtener el bazo.

### 10.3 Fusión celular

Habiendo obtenido por ELISA un alto título de anticuerpos policlonales anti L4MT se sacrificó el ratón y el bazo se fusiona y se obtuvo un 12.8% de positividad, los cultivos con crecimiento logarítmico se observan en la figura 8.



**Figura 8** Cultivo de hibridomas productoras de anticuerpos monoclonales anti L 4MT.

Los cultivos de hibridomas son viables y se mantienen creciendo en medio de cultivo RPMI con suero fetal bovino al 10% se proliferan y se mantienen en nitrógeno líquido, el sobrenadante se prueba con ELISA para lípidos y ELISA liposomal.

#### 10.4 ELISA 4MT de los hibridomas fusionados.

Se observaron los pozos cada tercer día por dos semanas, haciendo la selección bioquímica con HAT una semana y con HT en la segunda semana, el porcentaje de éxito de fusión fue del 90% donde el crecimiento celular es de tipo exponencial como en la figura 2. El monitoreo de los hibridomas que son productores de anticuerpos se hace con un ELISA para lípidos.

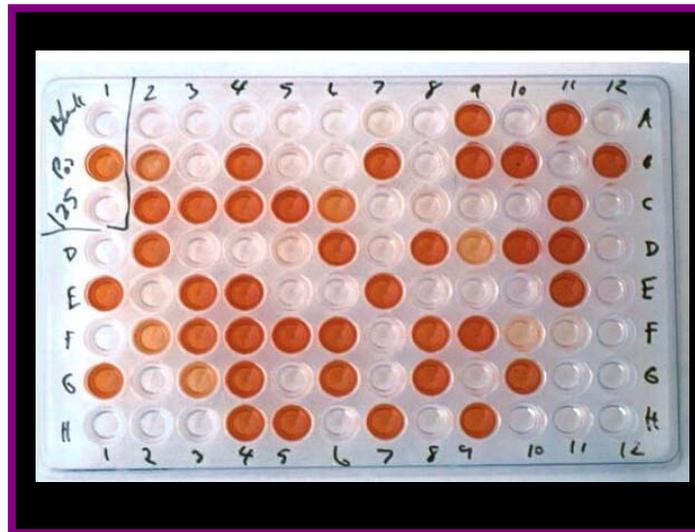


Figura 9 ELISA para lípidos.

Se observa la reacción antígeno-anticuerpo entre los lípidos de 4MT y anticuerpos IgG que secretan al medio de cultivo los hibridomas de la fusión que se seleccionan mediante ELISA para lípidos, la reacción se hace evidente con la aparición de color cuando la enzima peroxidasa actúa sobre el sustrato peróxido de hidrógeno, el cromógeno la orto-fenildiamina vira a color café.

En la tabla 4 se muestra el monitoreo de la placa 1 por ELISA para lípidos 4MT a la primera y segunda semana después de haber realizado la fusión celular entre células del bazo de ratón inmunizado con L 4 MT y la línea celular Ag8 de ratón Blalb/C.

#### ELISA para lípidos 4 MT.

<b>PLACA 1</b>	31 de mayo 2004	2 de junio 2004
<b>POZOS</b>	Absorbancia 492 nm	Absorbancia 492 nm
C 2	0.468	0.000
<b>D 3</b>	<b>1.561</b>	<b>1.049</b>
B 4	0.789	0.098
E 4	0.734	0.643
B 5	0.425	0.465
E 5	0.973	0.122
D 6	1.174	0.102
E 6	0.561	0.431
C 8	1.147	0.906
<b>E 8</b>	<b>1.490</b>	<b>1.182</b>
H 8	0.385	0.571
F 9	0.332	0.407
E 11	0.435	0.402
G 11	0.841	0.647

**Tabla 4** Monitoreo de los hibridomas productores de anticuerpos de la placa 1.

Se observa por ELISA que los hibridomas que están en los pozos C2, B4, E5, D6 pierden capacidad de producir anticuerpos IgG anti L4 MT en tanto que los demás pozos se mantienen e incluso aumentan la producción de anticuerpos IgG anti L4MT de acuerdo a las absorbancias obtenidas.

En la tabla 5 se muestra el monitoreo de la placa 2 por ELISA para lípidos 4MT a la primera y segunda semana después de haber realizado la fusión celular entre células del bazo de ratón inmunizado con L 4 MT y la línea celular Ag8 de ratón Blalb/C.

#### ELISA para lípidos 4 MT.

<b>PLACA 2</b>	31 de mayo 2004	02 de junio 2004
POZO	Absorbancia 492 nm	Absorbancia 492 nm
F2	0.623	0.639
A3	0.660	0.438
D3	2.004	Sin cambio
F3	0.389	0.438
G3	0.537	Sin cambio
H3	0.509	Sin cambio
B4	1.439	0.739
<b>D4</b>	<b>1.319</b>	<b>1.661</b>
A5	0.595	Sin cambio
C5	0.667	0.495
D5	0.593	0.749
<b>E5</b>	<b>0.851</b>	<b>1.459</b>
F5	0.608	-
<b>G5</b>	<b>1.484</b>	<b>1.151</b>
H5	0.365	-
A6	0.595	0.863
B6	0.580	0.403
C8	1.376	1.307
F9	0.311	-
B10	1.137	1.131
E10	0.367	0.391
B11	0.409	-
D11	0.998	1.346
G11	0.397	-

**Tabla 5** Monitoreo en la placa 2 por ELISA para lípidos 4MT

Se observa por ELISA que los hibridomas que están en los pozos D3, G3, H3, A5 dejan de producir anticuerpos IgG anti L 4 MT en tanto que los demás pozos se mantienen e incluso aumentan la producción de anticuerpo IgG anti L 4 MT de acuerdo a las absorbancias obtenidas.

En la tabla 6 se muestra el monitoreo de la placa 3 por ELISA para lípidos 4MT a la primera y segunda semana después de haber realizado la fusión celular entre células del bazo de ratón inmunizado con liposomas 4MT y la línea celular Ag8 de ratón Balb/C.

### ELISA para lípidos 4 MT.

<b>PLACA3</b>	31 de mayo 2004	2 de junio 2004
POZO	Absorbancia 492nm	Absorbancia 492 nm
C1	0.611	0.601
G3	1.256	1.145
F4	0.399	0.399
E7	1.301	1.301
B8	0.907	0.734
C10	0.684	0.684
D11	1.307	1.300

**Tabla 6** ELISA para lípidos 4MT

Se observa que los hibridomas se mantienen viables y produciendo anticuerpo IgG anti 4 MT de acuerdo a las absorbancias obtenidas.

En la tabla 7 se muestra el monitoreo por ELISA de la placa 4 para lípidos de 4 MT en la primera y segunda semana después de haber realizado la fusión celular entre células del bazo de ratón inmunizado con L 4MT y la línea Ag8 de ratón Balb/C.

#### ELISA para lípidos 4 MT.

<b>PLACA 4</b>	31 de mayo 2004	02 de junio 200
POZO	Absorbancia 492nm	Absorbancia 492 nm
G1	0.360	0.060
D3	0.685	0.973
F3	1.368	1.140
H3	0.963	0.363
C4	0.652	0.635
D4	1.186	0.691
G4	1.040	0.979
C5	0.695	0.658
<b>F7</b>	<b>1.835</b>	<b>1.733</b>
D8	0.573	1.010
F9	1.039	1.057
G11	0.923	0.574

**Tabla 7** Monitoreo en la placa 4 por ELISA para lípidos 4MT de hibridomas positivos.

Se observa por ELISA que los hibridomas que están en el pozo G1 deja de producir anticuerpo IgG anti L4MT, los demás hibridomas se mantienen viables y produciendo anticuerpo IgG anti 4MT de acuerdo a las absorbancias obtenidas.

En la tabla 8 se muestra el monitoreo de la placa 5 por ELISA para lípidos de 4MT primera y segunda semana después de haber realizado la fusión celular entre células del bazo de ratón inmunizado con liposomas L 4MT y la línea Ag8 de ratón Balb/ C.

#### ELISA para lípidos 4 MT.

<b>PLACA 5</b>	31 de mayo 2004	02 de junio 2004
POZO	ABSORBANCIA	ABSORBANCIA
D7	1.661	1.402
B8	1.22	0.439
E8	1.28	1.051
F8	<b>0.406</b>	<b>0.19</b>
G8	0.693	0.431
G9	0.546	0.301
F10	1.148	1.299
A11	0.973	0.382
H11	1.813	<b>1.813</b>

**Tabla 8** ELISA para lípidos 4MT.

Se mantienen los valores de la absorbancia durante las dos semanas todos los hibridomas se mantienen viables y produciendo anticuerpo IgG anti 4 MT menos el hibridoma del pozo F8.

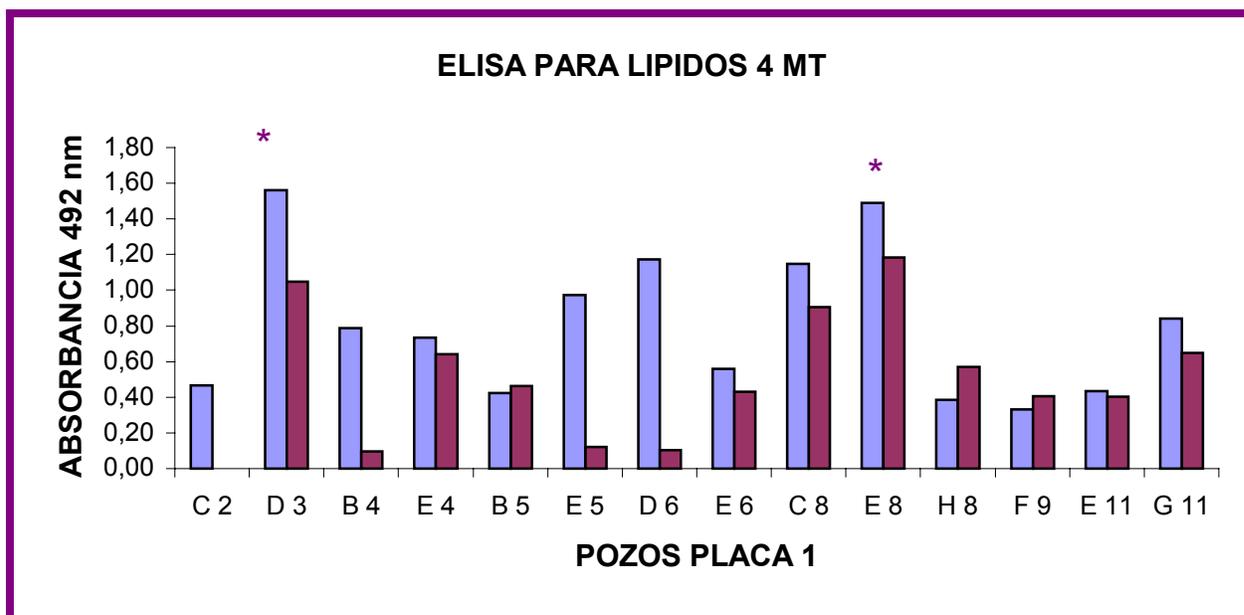
En la tabla 9 se muestra el monitoreo de la placa 6 por ELISA de 4MT monitoreo en la primera y segunda semana después de haber realizado la fusión celular entre células del bazo de ratón inmunizado con liposomas L 4MT y la línea Ag8 de ratón Balb/ C.

<b>PLACA 6</b>	31 de mayo 2004	02 de mayo 2004
POZO	ABSORBANCIA	ABSORBANCIA
E1	1.457	-
B4	1.547	-

**Tabla 9** ELISA para lípidos 4MT

Se observa que los hibridomas evaluados en esta placa dejan de producir anticuerpos IgG anti L 4MT de acuerdo a los valores de absorbancia.

De manera representativa se muestra en la gráfica 2 el monitoreo de la placa 1 por ELISA para lípidos de los hibridomas que se obtuvieron en la fusión.



**Grafica 2** ELISA para lípidos 4MT de hibridomas positivos de la placa1.

Para esta placa se clonan por dilución limitante las células de los pozos D3 y E8 dejando una célula por pozo la cual se prolifera dando origen a otras células idénticas a ella y así obtener anticuerpos monoclonales.

En resumen los hibridomas que producen anticuerpos IgG son los que se muestran en la tabla 10.

Hibridomas en cada placa	1	2	3	4	5	6	<b>POSITIVAS</b>
Hibridomas positivos primer semana	14	24	7	12	9	2	12.8%
Hibridomas positivos segunda semana	10	15	7	11	8		9.65%

**Tabla 10** Hibridomas fusionados y positivos en ELISA de las seis placas

En las seis placas los hibridomas que crecieron en cada pozo se le midieron los anticuerpos que se secretan al sobrenadante por ELISA.

En la primer semana se obtuvo el 12.8% de hibridomas positivos a ELISA y en la segunda semana 9.65%

Con los hibridomas positivos se procedió a realizar la dilución limitante.

Hibridomas a clonar	<b>1D3</b>	<b>1E8</b>	<b>2D4</b>	<b>2E5</b>	<b>2G5</b>	<b>4F7</b>
Absorbancia	1.049	1.182	1.661	1.459	1.151	1.733

**Tabla 11** Hibridomas clonados de tres placas.

El criterio de selección fue que la absorbancia sea mayor de 1.000

### 10.5 Clonación y subclonación de hibridomas

Los hibridomas 1D3, 1E8, 2D4, 2G5, 4F7 y 2E5 con absorbancia mayor de 1.00 se clonan y se subclonan.

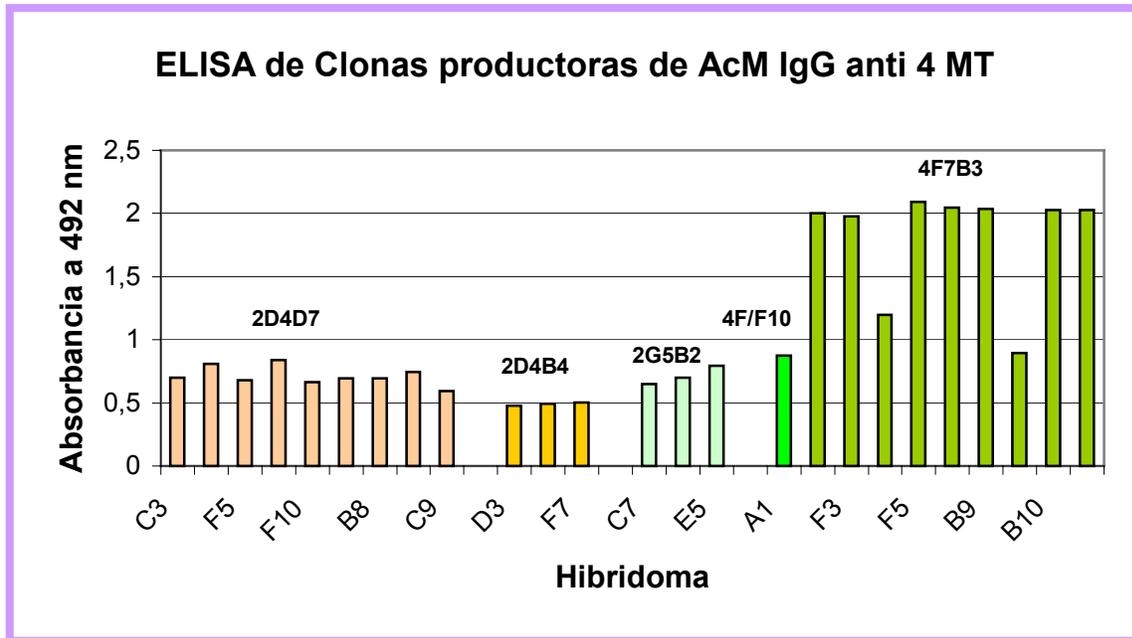
Los resultados se resumen en la siguiente tabla:

HIBRIDOMA	ABSORBANCIA	CLONA	ABSORBANCIA	SUB CLONA	ABSORBANCIA		
1D3	1,04	NEGATIVA					
1 E 8	1,182	1E8C9	1,359	NEGATIVA			
		1E8C5	1,421	NEGATIVA			
2D4	1,661	2D4D7	2,005	2D4D7C3	0,7		
				2D4D7B4	0,812		
				2D4D7F5	0,678		
				2D4D7B6	0,842		
				2D4D7F10	0,662		
				2D4D7G4	0,693		
				2D4D7B8	0,696		
				2D4D7C6	0,746		
				2D4D79C	0,592		
				2D4B4	1,348		
		2D4B4F6	0,494				
		2D4B4F7	0,503				
		2D4B1	0,853	NEGATIVA			
2G5	1,151	2G5B2		2G5B2C7	0,649		
				2G5B2D3	0,701		
				2G5B2E5	0,793		
		2G5A5	0,882	NEGATIVA			
4F7	1,733	4F7F10	2,236	4F7F10A1	0,875		
				4F7B3	2,263	4F7B3F2	2,003
						4F7B3F3	1,977
						4F7B3E4	1,1962
						4F7B3F5	2,092
						4F7B3D6	2,045
						4F7B3B9	2,035
						4F7B3C9	0,896
						4F7B3B10	2,028
						4F7B3E11	2,025
2 E5	1,459	NEGATIVA					

**Tabla 12** Clonación de seis hibridomas con absorbancia mayor a 1.00 por ELISA 4MT

## 10.6 Dilución limitante de hibridomas reactivos

Cuando se realizó la dilución limitante de los seis hibridomas, se observa que tres hibridomas (1D3, 1E8 y 1E5) dejaron de producir anticuerpo IgG anti L4MT. Los hibridomas sobrevivientes se subclonaron por dilución limitante para asegurar la producción de anticuerpo monoclonal.



**Gráfica 3** Clonas productoras de AcMo IgG anti L4 MT

Los gráfica 3 muestra los resultados de absorbancia de la subclonación de los tres hibridomas reactivos de los cuales al final se obtuvieron 25 clonas de cada una se congeló de dos a tres viales a  $-70^{\circ}\text{C}$ .

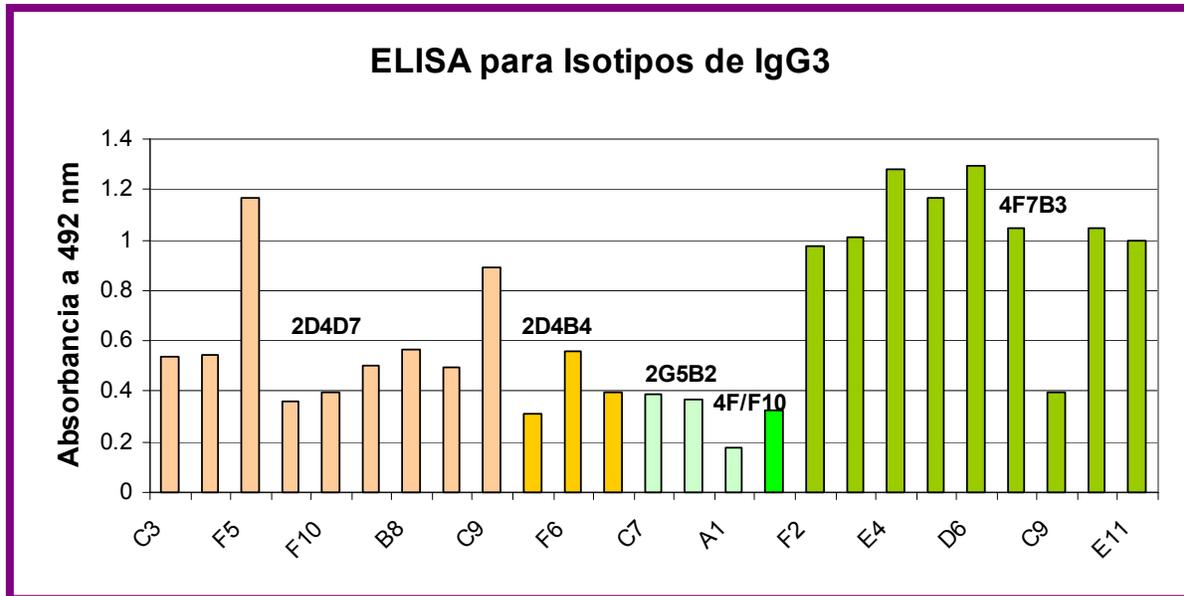
### 10.7 Determinación de la subclase de IgG de ratón.

Determinación de la subclase de anticuerpo IgG monoclonal por ELISA sensibilizado con isotipos de IgG de ratón.

Clona	IgG1	IgG2a	IgG2b	IgG3	Predomina
2D4D7C3	0.288	0.289	0.338	0.537	IgG3
2D4D7B4	0.203	0.239	0.284	0.541	IgG3
2D4D7F5	0.296	0.28	0.28	1.167	IgG3
2D4D7B6	0.239	0.28	0.204	0.358	IgG3
2D4D7F10	0.168	133	0.141	0.393	IgG3
2D4D7G4	0.228	0.189	0.252	0.501	IgG3
2D4D7B8	0.26	0.226	0.265	0.567	IgG3
2D4D7C6	0.226	0.277	0.172	0.494	IgG3
2D4D7C9	0.128	0.145	0.156	0.890	IgG3
2D4B4D3	0.083	0.105	0.127	0.313	IgG3
2D4B4F6	0.111	0.148	0.15	0.562	IgG3
2D4B4F7	0.177	0.243	0.204	0.393	IgG3
2G5B2C7	0.11	0.163	0.168	0.386	IgG3
2G5B2D3	0.096	0.089	0.13	0.366	IgG3
2G5B2E5	0.065	0.107	0.155	0.326	IgG3
4F7F10A1	0.026	0.031	0.054	0.179	IgG3
4F7B3F2	0.34	0.291	0.274	0.978	IgG3
4F7B3F3	0.267	0.258	0.217	1.01	IgG3
4F7B3E4	0.423	0.345	0.439	1.278	IgG3
4F7B3F5	0.296	0.28	0.28	1.167	IgG3
4F7B3D6	0.23	0.276	0.438	1.297	IgG3
4F7B3B9	0.3	0.298	0.274	1.045	IgG3
4F7B3C9	0.103	0.135	0.207	0.398	IgG3
4F7B3B10	0.32	0.249	0.344	1.044	IgG3
4F7B3E11	0.324	0.485	0.412	0.996	IgG3

**Tabla 13** ELISA para determinar subclase de IgG anti L4 MT producida por las clonas obtenidas en sobrenadante de cultivo

Se ve en la tabla 13 que un mismo híbridoma produce anticuerpo que reconoce a diferentes isotipos de IgG dando un valor menor de absorbancia que el predominante debido a que las subclases comparten secuencias similares en la región Fc de inmunoglobulinas de la clase IgG. Se observa que el Isotipo que predomina es IgG<sub>3</sub> con mayor absorbancia.

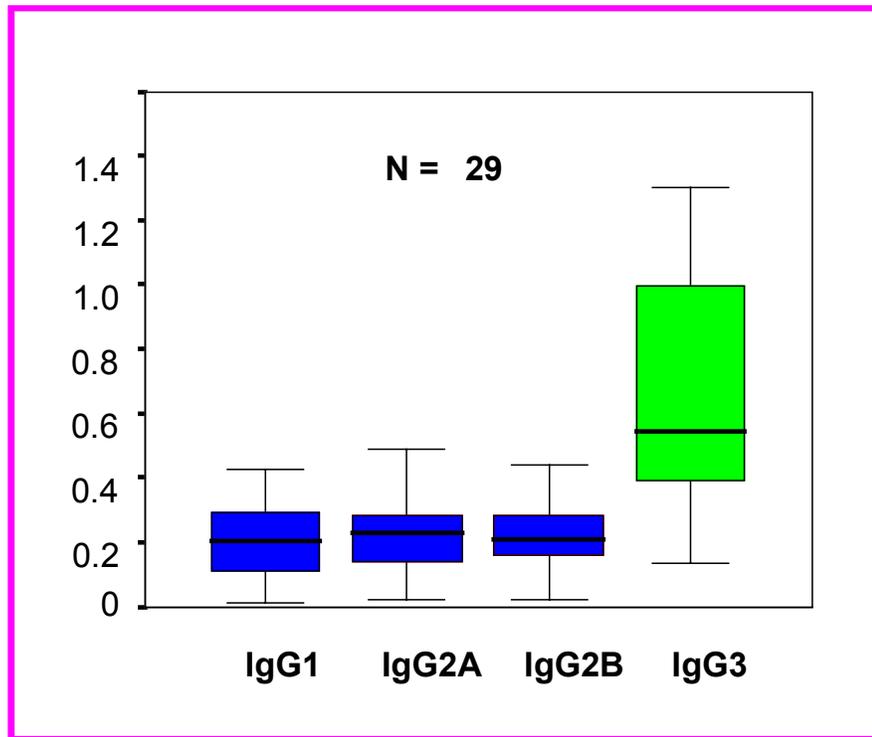


**Gráfica 4** Clonas productoras de AcMo IgG<sub>3</sub> anti L 4 MT por ELISA

Al determinar por ELISA para isotipo, ¿cuál es el predominante?

Como se muestra la gráfica 4 el Isotipo predominante es IgG<sub>3</sub>.

## ELISA para isotipos IgG



**Gráfica ELISA de Isotipo IgG de ratón.**

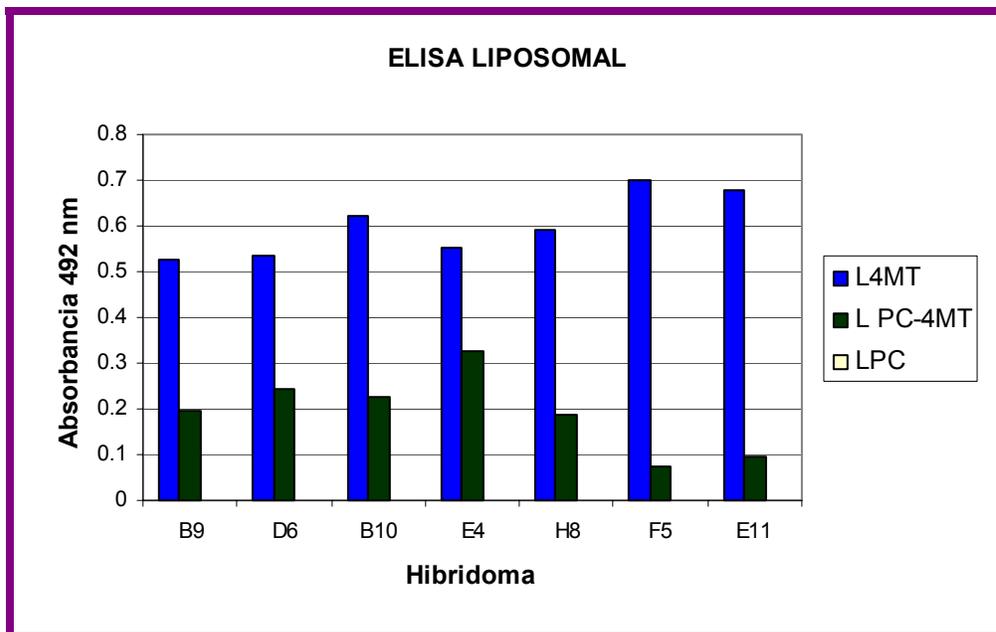
En la gráfica 5 se muestra que las clonas obtenidas producen anticuerpos monoclonales IgG<sub>3</sub> diferenciándose claramente de los otros isotipos de acuerdo a los valores de absorbancia.

## 10.8 ELISA liposomal.

Para continuar con el análisis se procedió a saber cuales hibridomas obtenidos son los que producen anticuerpos hacia el antígeno L 4MT mediante un ELISA para liposomas, los resultados se observan la tabla 14.

ELISA LIPOSOMAL			
CLONA	L PC-4MT	LPC	L4MT
B9	0.197	0	0.524
D6	0.243	0	0.536
B10	0.224	0	0.622
E4	0.325	0	0.554
H8	0.189	0	0.59
F5	0.072	0	0.7
E11	0.094	0	0.678

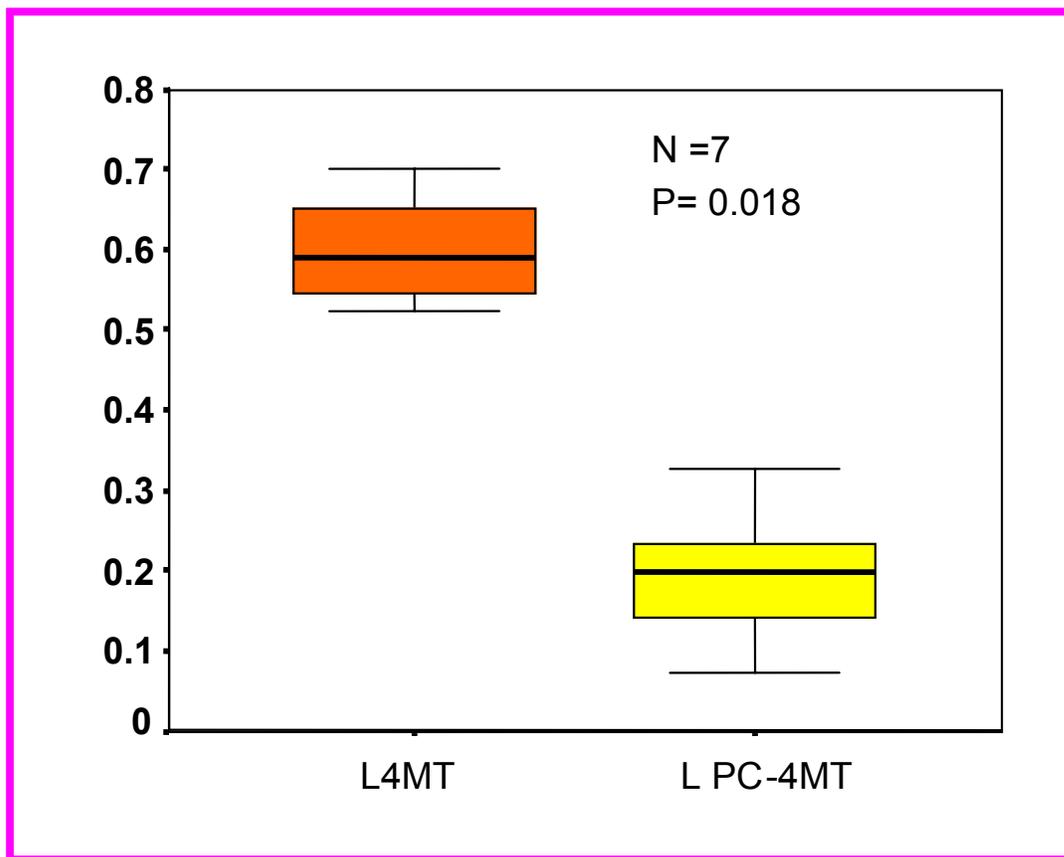
**Tabla 14** Clonas productoras de anticuerpo IgG monoclonal anti L 4MT en ELISA liposomal.



**Grafica 6** ELISA liposomal con clonas productoras de AcMo IgG3 anti L4MT.

En la gráfica 6 se observa que los AcMo IgG3 anti L 4MT es mayor que contra L PC-4MT por los valores de absorbancia.

Al obtener resultados del ELISA liposomal con antígeno L 4MT, observamos que la mejor respuesta antígeno-anticuerpo monoclonal IgG es cuando se confronta con su homólogo el liposoma L4MT que con la combinación liposoma LPC-4MT y la respuesta es negativo con el liposoma LPC que utilizamos como control negativo.



**Grafica 7** ELISA liposomal anticuerpos IgG3 anti L4MT.

En la gráfica 7 al comparar sólo la reactividad hacia los liposomas L 4MT y L4MT-PC se observa que los AcMo IgG3 reconocen claramente al liposoma homólogo por los valores de absorbancia.

Para el análisis de los datos obtenidos y saber si existe diferencia significativa en el reconocimiento de los AcMo obtenidos hacia los liposomas, se utilizó el estadístico de Wilcoxon.

### Estadístico para muestras pareadas

LIPOSOMA	MEDIA	N	Desviación Estándar	Error Estándar
L 4MT	0.6006	7	0.691	0.260
L PC-4MT	0.1920	7	0.0869	0.0330

**Tabla 15** Análisis estadístico Wilcoxon del ELISA liposomal de muestras pareadas.

La hipótesis nula:

Los anticuerpos anti L 4 MT producidos por los hibridomas reconocen igual a los liposomas L 4MT y L PC-4 MT.

La hipótesis alternativa:

Los anticuerpos anti L 4 MT producidos por los hibridomas no reconocen igual a los liposomas L 4MT y L PC-4 MT.

El análisis estadístico indica que se rechaza la hipótesis nula, hay un reconocimiento mayor de los anticuerpos hacia el antígeno homólogo L 4MT (gráfica 7).

La diferencia en la reactividad hacia el Liposoma L 4MT es estadísticamente significativa con un intervalo de confianza del 95% y un valor de P de 0.018.

### 10.9 Western Blot.

Mediante Western Blot se analizan la especificidad de los sobrenadantes de las clonas que producen AcMo IgG 3 anti 4MT



**Figura 10** Western blot de sobrenadantes y purificados de clonas productoras de AcMo IgG3 anti L4 MT.

En la figura 10, se observa que hay reconocimiento del AcMo IgG 3 que producen las clonas E11, E4, D 6 y F5 hacia 4 MT incrustada en gel de poliacarilamida al 18% y transferida a papel de nitrocelulosa.

### 10.10 Purificación de los anticuerpos monoclonales anti L 4MT

La purificación de los AcMo se realizó mediante proteína G a partir de los sobrenadantes de hibridomas productoras de anticuerpos IgG 3 anti L 4MT.

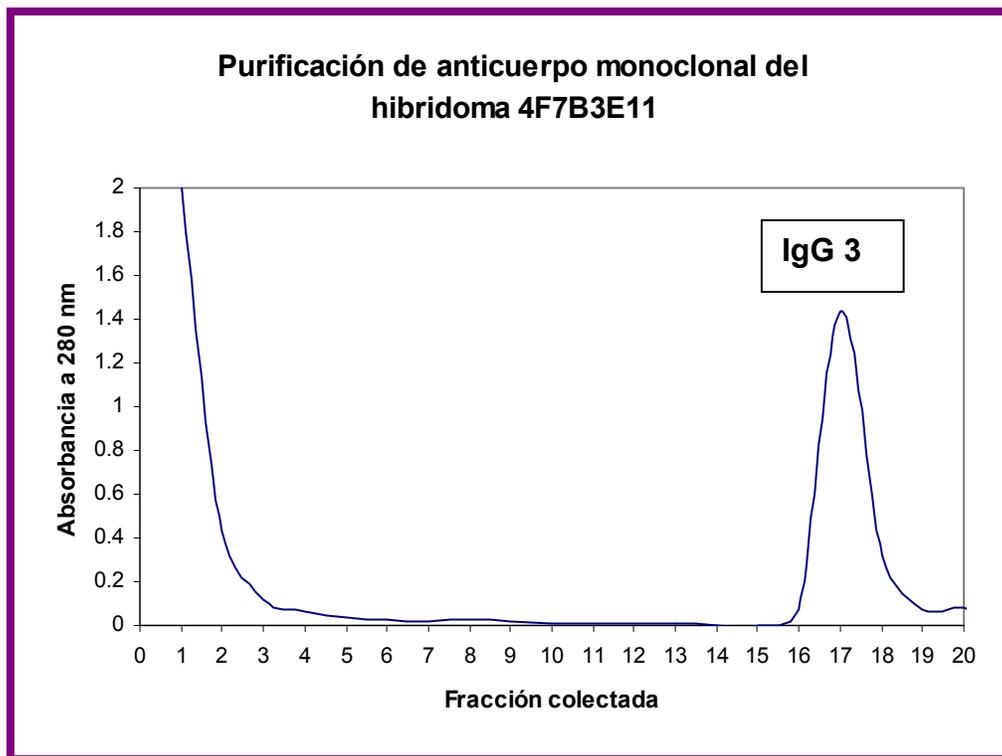
Purificación del AcMo IgG3 del sobrenadante de la clona 4F7B3E11

No de tubo	Absorbancia
1	1.999
2	0.439
3	0.117
4	0.066
5	0.037
6	0.023
7	0.018
8	0.027
9	0.019
10	0.010
11	0.011
12	0.008
13	0.007
14	0.004
15	0.003
16	0.074
17	<b>1.440</b>
18	<b>0.316</b>
19	0.070
20	0.078
21	0.048

**Tabla 16** Fracciones eluidas por afinidad del AcMo 4F7B3E11

La elusión de la columna de proteína G fue con PBS pH 7.4 del tubo numerados del 1 al 15 y con glicina pH 2.5 del tubo 16 al 21.

El AcMo IgG3 de esta clona se eluyó en los tubos 17 y 18 con glicina pH 2.5 leídos con luz UV a 280 nm.



**Gráfica 8** Purificación del AcMo **4F7B3E11** por cromatografía de afinidad con Proteína G.

Se eluyeron 20 fracciones 13 con PBS y 7 con glicina, el AcMo IgG3 se identificó en la fracción 17 y 18 a 280 nm.

En seguida se determinó la concentración de proteínas del el AcMo **4F7B3E11** mediante la cuantificación de proteínas por el método de Lowry a 500 nm,

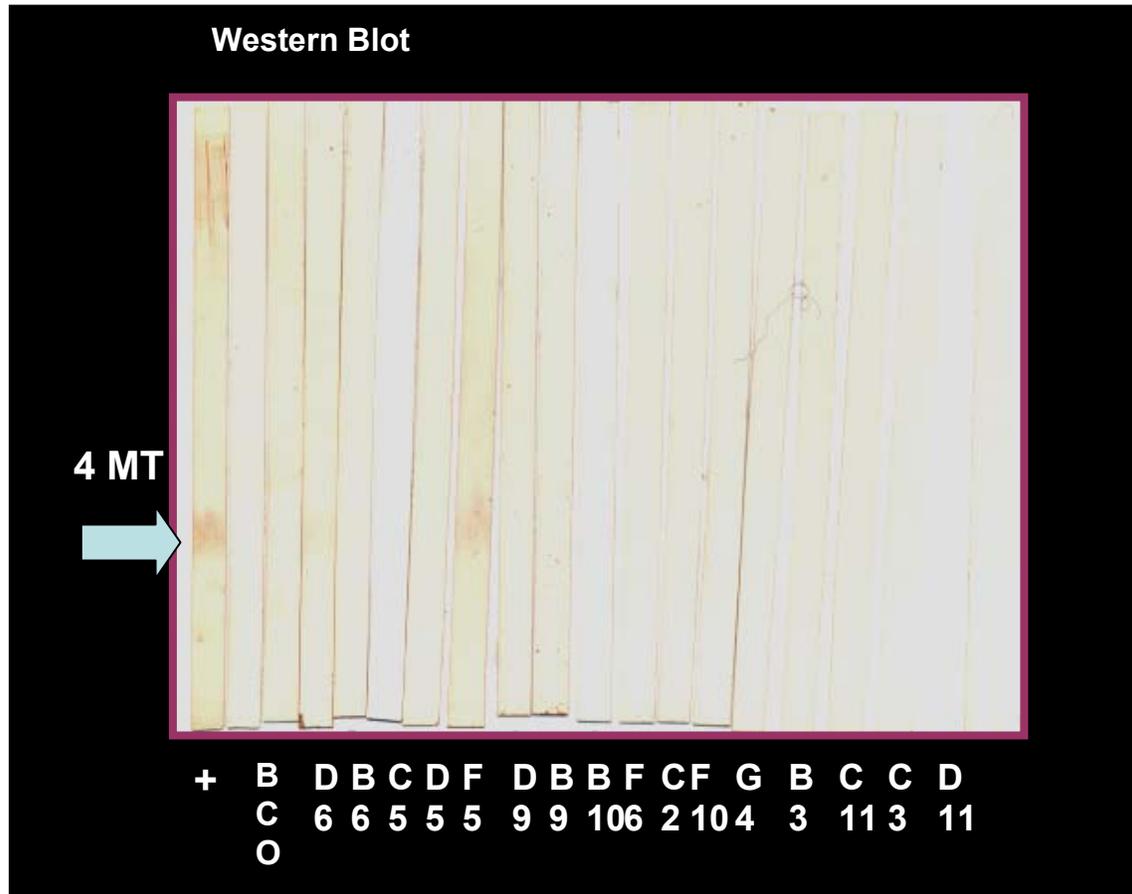
La concentración de AcMo fue de 1.218 mg / mL.

También se cuantificaron los anticuerpos monoclonales purificados con columna de proteína G acoplada a sefarosa de la tabla 17.

Hibridoma	Dilución	Concentración mg/mL
4F7B3F5	1:50	0.651
	1:100	0.627
4F7B3E4	1:50	1.202
	1:100	0.916
4F7B3E11	1:50	1.281
	1:100	1.218
4F7B3D6	1:50	1.032
	1:100	1.000

**Tabla 17** Concentración de proteínas de los AcMo por el método de Lowry.

Se analizan los purificados que producen AcMo IgG 3 anti 4MT.

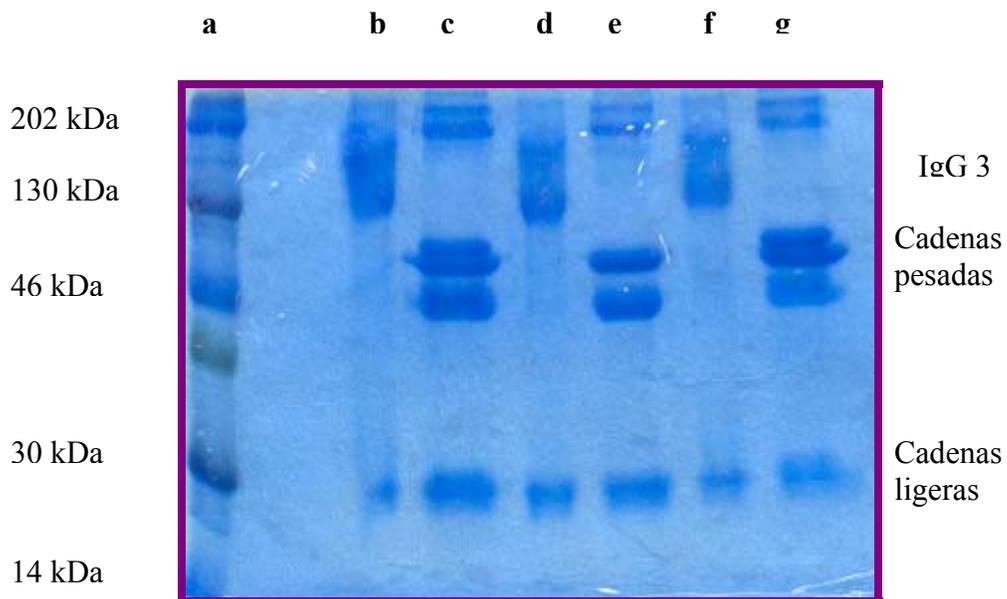


**Figura 11** Western blot con AcMo IgG 3 anti 4MT purificados mediante cromatografía de afinidad.

Después de la purificación se perdió la reactividad. Se observa que hay reconocimiento del AcMo IgG 3 que producen la clona F5 hacia 4 MT incrustada en geles de poliacrilamida al 18% y transferida a papel de nitrocelulosa.

### 10.11 Electroforesis de poliacrilamida al 10 %.

Para saber la pureza de los AcMo obtenidos en esta tesis se realizó un corrimiento electroforético en geles de acrilamida al 10% figura 15



**Figura 12** Gel de acrilamida al 10%.

a) Marcador de pesos moleculares. b, d y f) IgG 3 en condiciones no reductoras de 150 kDa. c, e y g) IgG3 en condiciones reductoras, cadenas pesadas de 50 kDa y cadenas ligeras de 25 kDa.

## 11 ANÁLISIS DE RESULTADOS

Tradicionalmente en el laboratorio de Inmunología aplicada se trabajo usando técnicas inmunológicas empleando anticuerpos policlonales como herramienta para el diagnóstico y estudio de la tuberculosis humana en diferentes modelos experimentales como en conejo. En esta tesis se obtuvieron anticuerpos monoclonales dirigidos contra la fracción 4 MT de *Mycobacterium tuberculosis* H37 Ra en forma de Liposoma (L4MT).

Para esto se contó con el modelo en ratones Balb/C los cuales se inmunizaron con L 4 MT a lo largo de un año, se observa que la respuesta inmune se incrementa considerablemente al día 56 y se mantiene todo el año sin que el ratón tengan daños aparentes. Al comparar inmunizando con ESBCG que son proteínas la respuesta inmune humoral de IgG ocurre en un mes de haber iniciado el cuadro de inmunización.

Para la fusión se cultivaron las células de mieloma Ag8 de ratón Balb/C en medio de cultivo RPMI al 10% de SFB obteniéndose una sobre vivencia del 98% este fue un paso importante que aseguro el éxito de la fusión debido a que las condiciones experimentales se optimizaron adecuadamente.

La fusión en este trabajo resulto un éxito al compararla con fusiones anteriores y se realizo en partes:

- **Primero** A partir de saber que tenemos suero hiperinmune de ratón Balb/C con absorbancia mayor de 1 medida por ELISA para lípidos, entonces se obtuvo el bazo y al macerar tenemos cerca de 80 millones de células para la fusión.

- **Segundo** la proliferación de hibridomas resultantes de la fusión de células Ag8 y linfocitos B de bazo de ratón Balb/C se obtuvo con un 90% de viabilidad asegurando una buena obtención de hibridomas productores de anticuerpos monoclonales anti L 4MT.
- **Tercero** Se seleccionaron los hibridomas fusionados de células no fusionadas mediante selección Bioquímica incorporando al medio HAT por una semana y HT en la segunda. Sobreviviendo sólo los hibridomas fusionados.
- **Cuarto** En el monitoreo por ELISA para lípidos 4MT de los sobrenadantes donde crecen los hibridomas, el porcentaje de positivos fue de 12.8% con absorbancia mayor de 0.300.

Al realizar el ELISA para lípidos para saber la clase de Inmunoglobulina que producen los hibridomas seleccionados se utilizaron dos anticuerpos comerciales en cabra anti IgM de ratón y anti IgG de ratón acoplado a peroxidasa de rábano, se encontró que todos los hibridomas producen anticuerpos de clase IgG.

Se seleccionaron seis hibridomas candidatos a clonar con absorbancia mayor de 1.000 obteniendo más hibridomas que la fusión anterior (35) que se clono sólo un hibridoma para obtener el AcMo TB48 FC.

Mediante dilución limitante, se clonaron hibridomas productores de anticuerpos IgG dejando crecer una célula hasta proliferación. Los positivos por ELISA para lípidos, se subclonaron de igual manera obteniéndose 25 clonas productoras de AcMo IgG anti 4 MT (gráfica 3).

De los 25 hibridomas clonados que son reactivos a 4 MT, sólo 7 hibridomas reconocen a L 4MT y a 4MT como antígeno en ELISA liposomal y para lípidos respectivamente (Tabla 12, Tabla 14).

En general se confirma que el valor de absorbancia en ELISA liposomal L4MT de los hibridomas clonados resulto más bajo que con 4MT en ELISA para lípidos en forma lineal (11). Esto demuestra que si la fracción 4MT es complejo multimolecular de naturaleza lipídica e hidrofóbica al hacerla liposoma L4MT, en forma esférica, sus componentes quedan parcialmente expuestos de tal forma que la reacción del antígeno con el anticuerpo monoclonal es menor.

El anticuerpo monoclonal obtenido L4MT al confrontarlo en un ELISA

Al determinarse el subtipo de inmunoglobulina IgG monoclonal mediante ELISA de isotipos, existen dos posibilidades de reconocimiento:

**Primera** Hay un reconocimiento inespecífico del anticuerpo monoclonal en IgG1, IgG 2a e IgG 2b parecido con absorbancia en promedio de 0.200 debido al reacción de fondo propio del sistema

**Segundo** La reacción inespecífica también puede deberse a que las subclases comparten secuencias en la región Fc de las inmunoglobulinas de los tres isotipos IgG1, IgG 2a e IgG 2b.

El valor de absorbancia más alto de los cuatro isotipos de IgG fue con el isotipo IgG3 anti L 4MT por lo que este subtipo es el predominante en ELISA para isotipos. Subtipo diferente al del AcMo TB 48 FC que es IgG1 anti ESMTB (11).

Para ver la especificidad de los anticuerpos monoclonales producidos por las clonas de este trabajo además de el ELISA. Se realizó un Wester Blot en donde se inserto como antígeno a 4MT previamente disuelta en agarosa caliente en un gel de poliacrilamida al 18% y se transfirió a papel de nitrocelulosa.

Los anticuerpos monoclonales se identificaron en sobrenadantes de cultivo y en sobrenadante eluido en cromatografía de afinidad, (anticuerpo purificado). Se obtuvo como resultado la precipitación de las bandas con un peso molecular de aproximadamente 4 kDa (figura 10 y 11).

En Western Blot se pierde el reconocimiento de los AcMo ya que el sistema no es adecuado por la insolubilidad de 4MT.

Finalmente se realizó una electroforesis en geles de poliacrilamida al 10% para determinar la pureza e integridad de tres anticuerpos monoclonales IgG3

anti L4MT en condiciones reductoras y no reductoras, dando como resultado la separación de las cadenas pesadas con un peso molecular de 50 kDa para la cadena pesada y 25 KD para la cadena ligera en condiciones reductoras la obtención de una banda del anticuerpo completo, con un peso molecular de 150 kDa en condiciones no reductoras (Figura 12).

Cabe señalar que en todas las clonas productoras de anticuerpos monoclonales IgG3 anti L4MT se proliferaron en medio RPMI complementado con SFB al 10% p H 7.2 y además se recolectó el sobrenadante y se purificó por cromatografía de afinidad con proteína G, se obtuvieron cuatro anticuerpos monoclonales purificados: El 4F7B3F5 con 531 µg/mL el 4F7B3D6 con 718 µg/mL 4F7B3E4 309 µg/mL y el 4F7B3E11 con 1.4 mg/mL (Tabla 17).

Las 25 clonas productoras de anticuerpos monoclonales, IgG3 anti 4MT se contaron a tener de 5 a 8 millones por vial en solución crioprotectora SFB: DMSO y se congelaron en nitrógeno líquido con una viabilidad de 90 a 100% dando lugar al banco de clonas anti 4 MT y anti L 4 MT de *Mycobacterium tuberculosis*.

## 12 CONCLUSIONES

- Se contó con el modelo experimental adecuado de ratones competentes que tengan respuesta inmune contra liposomas 4MT de *Mycobacterium tuberculosis* H37Ra.
- El tiempo necesario para dar respuesta hiperinmune policlonal en ratón Balb/C hacia liposomas L4MT es a partir del día 56.
- Se formó un banco de sueros de ratón con anticuerpos IgG anti L 4MT para ser utilizados como controles en pruebas inmunológicas como ELISA.
- Se logró la fusión realizada entre la línea celular Ag8 mantenida en cultivo y las células del bazo del ratón Balb/C cepa singénica, inmunizado con L4MT
- Se clonaron y subclonaron 6 hibridomas, obteniéndose 25 clones anti 4 MT.
- Todos los anticuerpos monoclonales obtenidos son de la clase IgG subclase 3.
- Solo 7 hibridomas producen anticuerpos IgG<sub>3</sub> anti L4MT en ELISA liposomal.
- La reactividad de los anticuerpos monoclonales anti L4MT probados por ELISA hacia liposomas de L4MT-PC, L4MT es significativamente mayor hacia los liposomas de L4MT medida estadísticamente mediante la prueba de Wilcoxon.
- Cuando los anticuerpos monoclonales anti L4MT probados por ELISA hacia LPC no hay reactividad por lo que se utilizará como control negativo.
- Se obtuvieron 4 AcMo purificados.

- Cuatro hibridomas producen anticuerpos IgG<sub>3</sub> anti L4 MT en Western Blot.
- De los 25 hibridomas obtenidos que producen anticuerpos monoclonales anti 4MT en ELISA para lípidos al ser analizados en Western Blot contra el Extracto protéico ESMTB H 37 Ra son negativos.
- Mediante Electroforesis en gel de poliacrilamida al 10% se observa que los anticuerpos monoclonales IgG<sub>3</sub> anti L 4MT tienen un peso molecular de 150 kDal en condiciones no reductoras, al ser separados los AcMo están constituidos por dos cadenas pesadas de 50 kDal y dos cadenas ligeras de 25 kDal en condiciones reductoras.
- Se formo un banco de células con los 25 hibridomas clonados en esta tesis.

## ABREVIATURAS

Albúmina Sérica Bovina	BSA
Anticuerpo Monoclonal	AcMo
Bacilo de Callmette-Güerin	BCG
Bacilos Acido Alcohol Resistente	BAAR
Derivado protéico purificado	PPD
Fracción lipídica de Mycobacterium tuberculosis H 37 Ra	4 MT
Hipoxantina,Aminopterina	HT
Hipoxantina,Aminopterina,Timidina.	HAT
Inmunoensayo enzimático	ELISA
Inmunoglobulina G	IgG
Inmunoglobulina G subclase 1	IgG1
Inmunoglobulina G subclase 2a	IgG2a
Inmunoglobulina G subclase 2b	IgG2b
Inmunoglobulina G subclase 3	IgG3
Línea celular de ratón Balb/C	Ag8
Liposomas de 4MT	L 4MT
Liposomas de Fosfatidil colina	L PC
Marcador de pesos moleculares de proteínas	MPM
Medio de cultivo celular	RPMI 1640
Polietilenglicol	PEG
Ratones de cepa singénica	Balb/C
Solución Salina Reguladora de Fosfatos	PBS
Suero Fetal Bovino	SFB

## APÉNDICE

### I MATERIAL

Estufa para medios de cultivo *Blue-electric*

Centrífuga refrigerada *Damon/ IEC*.

Microcentrífuga refrigerada *Hermle Z252M*.

Campana de bioseguridad *VWR*

Agitador mecánico *VWR Scientific*

Equipo de electrotransferencia *Bio-Rad*

Equipo de electroforesis *Bio-Rad Protean II*

Fuente de poder *Bio-Rad*

Recipientes para incubación de tiras *Bio-Rad*

Potenciómetro digital *Corning*

Material de vidrio *Pyrex* (matraces, tubos de ensaye, vasos, probetas, embudos, etc)

Multipipeta de 8 canales, de volumen variable *Gilbson*

Lavador semiautomático de placas *Corning*

Agitador Orbital *New Brunswick Scientific*.

Balanza granataria *Ohaus*

Balanza analítica *Chyo*

Refrigerador (4° C) *Mabe*

Congelador (-20° C) *American*

Ultracongelador (-70° C) *VWR*

Micropipetas de 1-10  $\mu\text{L}$ , 10-100  $\mu\text{L}$  y 250-1000  $\mu\text{L}$  marca *Eppendorf*.

Pipetas graduadas de 5 y 10 mL *Pyrex*

Tubos *Eppendorf*

Filtro de poro abierto *Merck*

Baño María *Fisher Scientific*.

Papel de nitrocelulosa *BioRad*.

Microplacas de titulación de 96 pozos *Costar*

Lector de placas de ELISA *Labsystems*.

Micropipeta *Hamilton*

## II SOLUCIONES

### Solución Medio Sauton

L- asparagina	4.0 g
Ácido cítrico- H <sub>2</sub> O	2.0 g
Sulfato de magnesio	0.5 g
Fosfato dipotásico	0.5 g
Citrato de amonio férrico	0.05 g
Glicerol	60 mL
H <sub>2</sub> O destilada	Aforar a 1000 mL

### Solución salina amortiguador de fosfatos PBS 0.02M pH 7.4

Cloruro de sodio (NaCl)	0.6 g/L
Fosfato de sodio monohidratado (NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> H <sub>2</sub> O)	3 g/L
Fosfato de sodio dibásico (Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> )	12.8 g/L

### Solución amortiguadora de carbonatos 0.015 M pH 9.6

H <sub>2</sub> O	50 mL
Carbonato de sodio (Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> )	0.093 g
Bicarbonato de sodio (NaHCO <sub>3</sub> )	0.146 g

### Solución de bloqueo (albúmina 1% en PBS 0.02M pH 7.4)

Albúmina sérica bovina	1.0 g
Amortiguador de PBS 0.02M pH 7.4	100 mL

### Sustrato

Ortofenilendiamina (OFD)	0.005 g
Amortiguador de PBS 0.02M pH 7.4	12.5 ml
Peróxido de hidrógeno al 30%	10 µL

**Solución de ácido sulfúrico 4N**

Acido sulfúrico ( $H_2SO_4$ )	11 mL
Agua destilada	89 mL

**Solución de acrilamida para el gel separador (37.7% T 0.5% C<sub>bis</sub>)**

Acrilamida	37.5 g
Bisacrilamida	0.1875 g
Agua destilada	100 mL

**Solución amortiguadora para el gel separador (Tris 3.0 M, pH 9.3)**

Tris-base	16.1 g
Tris-HCl	2.7 g
Agua destilada	50 mL

**Solución amortiguadora para el gel concentrador (Tris 0.5 M, pH 6.8)**

Tris-base	0.075 g
Tris-HCl	3.85 g
Agua destilada	50 mL

**Dodecil sulfato de sodio al 10%**

SDS	10 g
Agua destilada	100m L

**Persulfato de amonio (psa) al 10%**

PSA	100 mg
Agua destilada	1.0 mL

**Azul de bromofenol (0.5% p/v en etanol al 10%)**

Azul de bromofenol	50 mg
Etanol al 10%	10 mL

**Regulador de corrimiento**

Glicina	142.7 g
Tris-Base	25.66 g
Tris-HCl	6.14 g
SDS al 10%	50 mL
Agua destilada	Aforar a 5 L

**Solución madre para la tinción de proteínas con azul de Coomassie**

Azul de Coomassie R-250	2 g
Agua tridestilada	200 mL

Disolver en agua caliente, filtrar en papel Wathman No.1 y conservar en frasco ámbar a temperatura ambiente.

**Colorante de trabajo azul de Coomassie**

Solución madre de azul de Coomassie	31.3 mL
Metanol	125 mL
Ácido acético glacial	25 mL
Agua tridestilada	68.7 mL

Mezclar, llevar a 250 mL y filtrar por papel Wathman No.1, conservar en frasco ámbar a temperatura ambiente.

### **Solución decolorante de geles teñidos con azul de Coomassie**

Metanol	500 mL
Ácido acético glacial	100 mL
Agua tridestilada	400 mL

### **Regulador de transferencia**

Tris-base	3.02 g
Glicina	14.4 g
Metanol	200 mL
Agua tridestilada	800 mL

Se ajusta el pH a 8.3 con hidróxido de sodio 1 M, aforar a 1 litro, conservar en refrigeración, puede ser usado 3 ó 4 veces.

### **PBS 0.01M pH 7.4**

NaCl	0.06 g
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> H <sub>2</sub> O	3.0 g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> anhidro	12.8 g

Se ajusta el pH a 7.4 si es necesario con las mismas sales, aforar a 1 litro.

### **PBS-Tween 0.1%**

PBS 0.01M pH 7.4	1 L
Tween 20	1 mL

### **Solución de Bloqueo: PBS-Tween 0-1%-leche 5%**

PBS-Tween 0.01%	50 mL
Albúmina sérica bovina	2.5 g

### **Colorante rojo de Ponceau S**

Acido tricloroacético	3 g
-----------------------	-----

Agua tridestilada	100 mL
Rojo de Ponceu S	20 mg

**Medio RPMI-1640 complementado al 10 % con SFB.**

Frasco de medio RPMI-1640 Sigma para un litro.

Agua tridestilada	1 L
Bicarbonato de sodio	2 g
Hepes para cultivo celular	2 g
Antibiotico (penicilina-estreptomicina)	10 mL
AntiPPLO (Gibco), Tilosin (Sigma)	1 mL
2-Mercaptoetanol 0.05M	0.5 mL
L-glutamina	16 mL
Piruvato de sodio	18.2 mL
Aminoácidos no esenciales	10 mL
Suero Fetal Bovino	100 mL

**Solución de Criopreservación**

Dimetil sufoxido	100 µL
Suero fetal bovino	900 µL

Para congelar un vial de 5 -10 millones de células.

**Medio selectivo hipoxantina, aminopterin y timina ( HAT )**

RPMI complementado	100 mL
HAT 50x ( Sigma N-0262 )	2 mL

**Medio selectivo con hipoxantina y timina ( HT )**

RPMI complementado	100 mL
HT 50X ( Sigma No. Cat. H-0137 )	2 mL

**Solución de L-Glutamina**

Pesar 2.92g de L-Glutamina, calidad cultivo celular y disolver en 100 mL de agua bidestilada.

Esterilizar por filtro millipore 0.22 micrometros

Hacer hacer alícuotas de 5 mL y almacenar a -20° C

### **Suero bovino fetal ( SFB )**

El suero fetal bovino antes de utilizarse se mantiene durante 30min a 56° C para descomplementarlo.

Fraccionar en tubos estériles de 50 mL y almacenarlos a temperatura de -20° C

### **Azúl de tripano**

Pesar 0.1g azul de tripano y aforar a 5 mL de agua tridestilada

El día de su uso tomar 100 microlitros de solución anterior y anadir 1.9 mL de PBS

### **Tela de organza**

Colocar la tela de organza en HCL 0.1N hasta ebullición.

Lavar con agua destilada pH 7

Colocar la tela en NaOH 0.1 N hasta ebullición

Lavar con agua destilada pH 7

Dejar secar la tela

## 13 REFERENCIAS

- 1.-Farga V. Tuberculosis. 2ª ed. Mediterráneo. Chile: Mediterráneo,1992.
- 2.- Hernandez Pando R, Rook W GA. The Pathogenesis of tuberculosis. Annu Rev Microbiol. 1996 50:259-84.
- 3.-Glickman M, Jacobs W. Microbial Pathogenesis of Mycobacterium tuberculosis: Dawn of Discipline Cell; 2001 104: 477-485.
- 4.- Bates JH and Stead WW, The history tuberculosis as a global epidemic, Med.Clin. North ;1993 77: 12051210.
- 5.- Schluger W, William N. Current Approaches to the Diagnosis of Active Pulmonary Tuberculosis. Am J Respir Crit Care Med 1994 vol 149 pp 264-267
- 6.- Cázares Sosa F. Caracterización parcial de la fracción lipídica 4MT de *Mycobacterium tuberculosis* H 37 Ra e inducción de la respuesta inmune en ratones Balb/c. Tesis de Maestría. Escuela Superior de Medicina y Homeopatía. México. 2004.
- 7.- Cruz HM, Comparación de dos técnicas inmunoenzimáticas utilizando la fracción 4 MT de *Mycobacterium tuberculosis* H37 Ra para el diagnóstico de tuberculosis pulmonar. Tesis de Licenciatura. UNAM. 2002
- 8.- Luna J. Lípidos de *Mycobacterium lepraemurium*. Aspectos químicos y biológicos. Tesis Doctoral Escuela Nacional de Ciencias Biológicas IPN. México 1991.

- 9.- González Mateos S. Evaluación de dos técnicas inmunoenzimáticas para el diagnóstico temprano de la meningitis tuberculosa en muestras de líquido cefalorraquídeo. Tesis de Licenciatura de la UNAM, México 1996
- 10.- Baeza I, Aguilar L. Papel estructural y funcional de los lípidos en las membranas biológicas Mensaje Bioquímico 2 ed. México 1998 22: 51 – 78.
- 11.- Aguilar L, Ortega PG, Phospholipid membranes form specific nonbilayer molecular arrangements that are antigenic. J Biol Chem 1999; 274:25193-25196.
- 12.- Oros A. Evaluación de la respuesta inmune humoral hacia antígenos de bajo peso molecular de *Mycobacterium tuberculosis* en pacientes con tuberculosis activa utilizando la técnica de Western Blot. Tesis de licenciatura, Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán. UNAM. México 1999
- 13.- Salyers AA. Witt DD. Bacterial pathogenesis a molecular approach. American society for microbiology;1994 Washington D.C. 307-321.
- 14.- Flynn J, Chan J.. Immunology of Tuberculosis. Rev Immunol ;2001 19:93-129.
- 15.- Rock G, Hernández R. The pathogenesis of tuberculosis. Annu Rev . Microbiol 1996 ;50: 259-284
- 16.- Escobar Gutiérrez A, Amezcua Chavarría ME, Pastén Sánchez Sergi, Ramírez Casanova E, Cázares JV, Granados G, Loo Méndez E, Cicero R. Enzyme linked immunosorbent assay ( ELISA ) with mycobacterial crude antigens active for seroepidemiological diagnosis of tuberculosis. Int J Lepr 1995; 64: 417-427.

17.- Daniel M T, Debanne M S, The serodiagnosis of tuberculosis and other Mycobacterial diseases by Enzyme-linked Immunosorbent Assay. Am Rev Respir Dis 1987;135: 1137-1151.

18.- Von Reyn CF, Vuola JM, New vaccines for the prevention of tuberculosis Clin Infect Dis 2002 35: 465-74

19.- Pacheco. C. Vacunas Ciencia y Salud México. INDRE SSA 1994.

20.- Gavilondo CJ, Anticuerpos monoclonales. Teoría y práctica. Elos Scientiae, 1995 Cuba.

21.- Medina Flores Y. Correa Beltrán M. Vaughan Figueroa J. Medina Escutia M . Mandujano Martínez A. Anticuerpos Monoclonales. Manual de Procedimientos de Laboratorio. México InDRE SSa 1997.

22.-Campbell, A. M. Monoclonal antibodies and immunosensor technology. Lab Tech biochem mol biol. 1998, 23, 232- 238.

23.-Alemany M, Font S, Practicas de bioquímica Madrid España Editorial Alhambra, 1983, 256-258.

24.-Bates JH and Stead WW, 1993 The history tuberculosis as a global epidemic, Med.Clin. North77: 1205.

25.- Andersen P, Munk E, Pollock J, Doherty. Specific immune-based diagnosis of tuberculosis. Lancet 2000, 356: 1099-104.

26.- Boleti,E, George, J.T. and Epenetos, AA Therapeutic monoclonales. Biochem. Soc. Trans;1995, 23 1044 1047.

- 27.- Brooks. G. Microbiología Medica 16<sup>a</sup> ed. México el Manual Moderno, 1999.
- 28.-Campbell, A. M. Monoclonal antibodies and immunosensor technology. Laboratory techniques in biochemistry and molecular biology;1998, 23 723-750.
- 29.- Carapio Pedroza J C Anticuerpos Monoclonales Anti-Longus: Caracterización y su utilidad en el diagnostico de *Escherichia coli enterotoxigénica* Tesis de licenciatura ENCB 2004.
- 30.- Cowan S.T. Steel K.J. Manual para la identificación de bacterias de importancia medica. CECSA ;1985 México.
- 31.- Ellner J.The immune response in human tuberculosis implicación for tuberculosis control. J Infect Dis ; 1997,176 : 1351-1359.
- 32.-Ernst.J Macrophage Receptors for *Mycobacterium tuberculosis* Infection and Immunity ;1998, 66 p 1277 1281
- 33.- Escamilla L, Mancilla R, Glender . Mycobacterium fortuitum Glycolipids for the Serodiagnosis of Pulmonary Tuberculosis. J. Respir Crit Care Med ;1996154: 1864-1867.
- 34.- García G. Tuberculosis en enfermedades tropicales en México. Diagnóstico, tratamiento y distribución geográfica. 1ed,INDRE, SSA;1994 México.
- 35.- Herrera C Z. Obtención de anticuerpos Monoclonales contra la Fracción Lípidica 4MT de *Mycobacterium tuberculosis* H37Ra. Tesis de licenciatura, UPIBI IPN, México D.F 2003.

36.- Hiromatsu K, Descher C, LeClair K, Sugita M , Furlung S, Brenner M, Porcelli S. Induction of CD1- restricted immune responses in guinea pig by immunization with mycobacterial lipid antigens. J Immunology 2002;169, 330-339.

37.- Harboe M , Wiker H The 38 kDa Protein of Mycobacterium tuberculosis. The J Infec Dis 1992. 166 p 874-84

38.- Joly V. *Mycobacterium tuberculosis* infections. Curr Opin Infect Dis; 6: 171-178. Finegold S, Baron E. Diagnóstico Microbiológico. 7<sup>a</sup> ed. Medica Panamericana, Argentina;1993, 1992. 8

39.- Lara MM Detección de anticuerpos contra partículas lipídicas en el suero de pacientes con síndrome de antifosfolípidos. México : Tesis de Maestría. IPN 1999.

40.- Maekura R, Okuda Y, Nakagawa M y col. Calinical evaluation of antituberculous glycolipid immunoglobulin G antibody assay for rapid serodiagnosis of pulmonary tuberculosis. J Clin. Microbiol; 2001,39: 3603-3608

41.- Márquez de Cantu MJ Probabilidad y Estadística para Ciencia Químico Biologicos . México Mc Grez Hill Interamericana de México 1991.

42.- Makonkawkeyoon S, Makonkawkeyoon L, Songsiri S, Dettrairat S. Evidence for a highly conserved immunoreactive lipid in Mycobacterium tuberculosis. Am Rew Respir Dis; 1989. 139:774-778

43.- Meza A. Vázquez R. Técnicas Inmunológicas actualizadas. INDRE, 1997.

44.- Norma Oficial Mexicana 006 SSA 2 Para la prevención y control de la tuberculosis en la atención primaria de la salud. Diario Oficial1993, México 1-6.

45.- Ortalo A, Dupont MA Lamassu A, Andersen A, Gounon P, Daffé M. Molecular composition of the outermost capsular material of the tubercle bacillus. *Microbiology*; 1995 141: 1609-1620

46.- Ortega R. Producción y caracterización de anticuerpos monoclonales contra pilus Longus de *Escherichia coli* enterotoxigénica: Reactividad con cepas heterologas productoras de Longus. Tesis de maestría. ENCB. IPN. México. D.F. 1999.

47. - Pottumarthy S, Morris A and Wells V. A Comparison of Seven Tests for Serological Diagnosis of Tuberculosis. *J Clin Microbiol* 2000, 46 .- p. 2227-2231

48.- Rojas O. Inmunología de memoria 2ª ed. México Panamericana. 2001

49. -Rosat JP, Grant EP, Beckman CD1-restricted microbial lipid antigen-specific recognition found in the CD8 + alpha beta T cell pool. *J Immunol* 1999; 162:366-371

50.- Saldaña A Z. Producción de Anticuerpos Monoclonales contra el flagelo de *Escherichia coli enteropatogena* cepa E23487/ 69 serotipo 0127: H6 Benemérita Universidad Autónoma de Puebla; 2004.

51.- Schlossberg Tuberculosis e infecciones por micobacterias no tuberculosas. 4ed. México; 2000.

52.- Schluger W, William N. Current Approaches to the Diagnosis of Active Pulmonary Tuberculosis. *Am J Respir Crit Care Med* ;1994, 149 pp 264-267

53.- Sepúlveda R. Caracterización de antígeno *Mycobacterium tuberculosis* a partir de aislamiento clínico de pacientes con tuberculosis activa. Tesis de Maestría Escuela Nacional de Ciencias Biológicas. Instituto Politécnico Nacional. México;1994.

54.- Williams R, Alde S, Havlir Diana. Identification of Antigens of *Mycobacterium Tuberculosis* .Using Human Monoclonal Antibodies. J Clin. Invest ; 1989, 84: 214-219.

## APÉNDICE

### I MATERIAL

Estufa para medios de cultivo *Blue-electric*

Centrífuga refrigerada *Damon/ IEC*.

Microcentrífuga refrigerada *Hermle Z252M*.

Campana de bioseguridad *VWR*

Agitador mecánico *VWR Scientific*

Equipo de electrotransferencia *Bio-Rad*

Equipo de electroforesis *Bio-Rad Protean II*

Fuente de poder *Bio-Rad*

Recipientes para incubación de tiras *Bio-Rad*

Potenciómetro digital *Corning*

Material de vidrio *Pyrex* (matraces, tubos de ensaye, vasos, probetas, embudos, etc)

Multipipeta de 8 canales, de volumen variable *Gilbson*

Lavador semiautomático de placas *Corning*

Agitador Orbital *New Brunswick Scientific*.

Balanza granataria *Ohaus*

Balanza analítica *Chyo*

Refrigerador (4° C) *Mabe*

Congelador (-20° C) *American*

Ultracongelador (-70° C) *VWR*

Micropipetas de 1-10  $\mu\text{L}$ , 10-100  $\mu\text{L}$  y 250-1000  $\mu\text{L}$  marca *Eppendorf*.

Pipetas graduadas de 5 y 10 mL *Pyrex*

Tubos *Eppendorf*

Filtro de poro abierto *Merck*

Baño María *Fisher Scientific*.

Papel de nitrocelulosa *BioRad*.

Microplacas de titulación de 96 pozos *Costar*

Lector de placas de ELISA *Labsystems*.

Micropipeta *Hamilton*

## II SOLUCIONES

### Solución Medio Sauton

L- asparagina	4.0 g
Ácido cítrico- H <sub>2</sub> O	2.0 g
Sulfato de magnesio	0.5 g
Fosfato dipotásico	0.5 g
Citrato de amonio férrico	0.05 g
Glicerol	60 mL
H <sub>2</sub> O destilada	Aforar a 1000 mL

### Solución salina amortiguador de fosfatos PBS 0.02M pH 7.4

Cloruro de sodio (NaCl)	0.6 g/L
Fosfato de sodio monohidratado (NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> H <sub>2</sub> O)	3 g/L
Fosfato de sodio dibásico (Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> )	12.8 g/L

### Solución amortiguadora de carbonatos 0.015 M pH 9.6

H <sub>2</sub> O	50 mL
Carbonato de sodio (Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> )	0.093 g
Bicarbonato de sodio (NaHCO <sub>3</sub> )	0.146 g

### Solución de bloqueo (albúmina 1% en PBS 0.02M pH 7.4)

Albúmina sérica bovina	1.0 g
Amortiguador de PBS 0.02M pH 7.4	100 mL

### Sustrato

Ortofenilendiamina (OFD)	0.005 g
Amortiguador de PBS 0.02M pH 7.4	12.5 ml
Peróxido de hidrógeno al 30%	10 µL

**Solución de ácido sulfúrico 4N**

Acido sulfúrico (H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> )	11 mL
Agua destilada	89 mL

**Solución de acrilamida para el gel separador (37.7% T 0.5% C<sub>bis</sub>)**

Acrilamida	37.5 g
Bisacrilamida	0.1875 g
Agua destilada	100 mL

**Solución amortiguadora para el gel separador (Tris 3.0 M, pH 9.3)**

Tris-base	16.1 g
Tris-HCl	2.7 g
Agua destilada	50 mL

**Solución amortiguadora para el gel concentrador (Tris 0.5 M, pH 6.8)**

Tris-base	0.075 g
Tris-HCl	3.85 g
Agua destilada	50 mL

**Dodecil sulfato de sodio al 10%**

SDS	10 g
Agua destilada	100m L

**Persulfato de amonio (psa) al 10%**

PSA	100 mg
Agua destilada	1.0 mL

**Azul de bromofenol (0.5% p/v en etanol al 10%)**

Azul de bromofenol	50 mg
Etanol al 10%	10 mL

**Regulador de corrimiento**

Glicina	142.7 g
Tris-Base	25.66 g
Tris-HCl	6.14 g
SDS al 10%	50 mL
Agua destilada	Aforar a 5 L

**Solución madre para la tinción de proteínas con azul de Coomassie**

Azul de Coomassie R-250	2 g
Agua tridestilada	200 mL

Disolver en agua caliente, filtrar en papel Wathman No.1 y conservar en frasco ámbar a temperatura ambiente.

**Colorante de trabajo azul de Coomassie**

Solución madre de azul de Coomassie	31.3 mL
Metanol	125 mL
Ácido acético glacial	25 mL
Agua tridestilada	68.7 mL

Mezclar, llevar a 250 mL y filtrar por papel Wathman No.1, conservar en frasco ámbar a temperatura ambiente.

### **Solución decolorante de geles teñidos con azul de Coomassie**

Metanol	500 mL
Ácido acético glacial	100 mL
Agua tridestilada	400 mL

### **Regulador de transferencia**

Tris-base	3.02 g
Glicina	14.4 g
Metanol	200 mL
Agua tridestilada	800 mL

Se ajusta el pH a 8.3 con hidróxido de sodio 1 M, aforar a 1 litro, conservar en refrigeración, puede ser usado 3 ó 4 veces.

### **PBS 0.01M pH 7.4**

NaCl	0.06 g
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> H <sub>2</sub> O	3.0 g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> anhidro	12.8 g

Se ajusta el pH a 7.4 si es necesario con las mismas sales, aforar a 1 litro.

### **PBS-Tween 0.1%**

PBS 0.01M pH 7.4	1 L
Tween 20	1 mL

### **Solución de Bloqueo: PBS-Tween 0-1%-leche 5%**

PBS-Tween 0.01%	50 mL
Albúmina sérica bovina	2.5 g

### **Colorante rojo de Ponceau S**

Acido tricloroacético	3 g
-----------------------	-----

Agua tridestilada	100 mL
Rojo de Ponceu S	20 mg

### **Medio RPMI-1640 complementado al 10 % con SFB.**

Frasco de medio RPMI-1640 Sigma para un litro.

Agua tridestilada	1 L
Bicarbonato de sodio	2 g
Hepes para cultivo celular	2 g
Antibiotico (penicilina-estreptomicina)	10 mL
AntiPPLO (Gibco), Tilosin (Sigma)	1 mL
2-Mercaptoetanol 0.05M	0.5 mL
L-glutamina	16 mL
Piruvato de sodio	18.2 mL
Aminoácidos no esenciales	10 mL
Suero Fetal Bovino	100 mL

### **Solución de Criopreservación**

Dimetil sufoxido	100 µL
Suero fetal bovino	900 µL

Para congelar un vial de 5 -10 millones de células.

### **Medio selectivo hipoxantina, aminopterina y timina ( HAT )**

RPMI complementado	100 mL
HAT 50x ( Sigma N-0262 )	2 mL

### **Medio selectivo con hipoxantina y timina ( HT )**

RPMI complementado	100 mL
HT 50X ( Sigma No. Cat. H-0137 )	2 mL

### **Solución de L-Glutamina**

Pesar 2.92g de L-Glutamina, calidad cultivo celular y disolver en 100 mL de agua bidestilada.

Esterilizar por filtro millipore 0.22 micrometros

Hacer hacer alícuotas de 5 mL y almacenar a -20° C

### **Suero bovino fetal ( SFB )**

El suero fetal bovino antes de utilizarse se mantiene durante 30min a 56° C para descomplementarlo.

Fraccionar en tubos estériles de 50 mL y almacenarlos a temperatura de -20° C

### **Azúl de tripano**

Pesar 0.1g azul de tripano y aforar a 5 mL de agua tridestilada

El día de su uso tomar 100 microlitros de solución anterior y anadir 1.9 mL de PBS

### **Tela de organza**

Colocar la tela de organza en HCL 0.1N hasta ebullición.

Lavar con agua destilada pH 7

Colocar la tela en NaOH 0.1 N hasta ebullición

Lavar con agua destilada pH 7

Dejar secar la tela