



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES

CUAUTITLÁN

**PRODUCCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE ANTICUERPOS
MONOCLONALES CONTRA *Leptospira spp***

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA**

PRESENTA

HILARIO VEGA LAURA TERESA

ASESORES:

DR. VICTOR MANUEL ZENDEJAS BUITRÓN

M. en C. MARIA EDITH MEDINA ESCUTIA

DR. ALEJANDRO ESCOBAR GUTIERREZ



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Dedico este trabajo

A Dios por darme la dicha de llegar a este momento

A mi papá Joaquín E. Hilario Martínez por el amor,
la comprensión, la paciencia y el apoyo que me
brindó en todo momento

A mi mamá Guadalupe Vega Alcalá por tener
siempre su apoyo, su confianza y sus cuidados

A mis sobrinos Jesús, Diana, Josué, Rodrigo y
Regina, por enseñarme a siempre sonreírle a la vida
y por que espero ser su mejor ejemplo a seguir

A mi hermana Mari Carmen y mi hermano Salvador
por tener siempre su apoyo y su confianza

A mi hermana Rosario y mí cuñado Rodrigo por su
cariño, sus consejos y su total confianza.

A Siddhartha Rodríguez, por su amor, ayuda,
paciencia, comprensión y motivación

Agradecimientos

A la Universidad Nacional Autónoma de México por la formación personal y profesional que me brindo.

A los miembros del jurado que presiden este trabajo no solo por su revisión sino por ser parte de mi formación profesional.

Al Dr. Alejandro Escobar Gutiérrez por su revisión y crítica realizada a este trabajo.

A la M. en C. Yolanda Medina Flores quien siempre confió y apoyo este trabajo.

A la M. en C. Ma. Edith Medina Escutia por el tiempo y la aportación que brindo a este trabajo.

A la QFB Olga Mata y la QFB Araceli Zavala por ser partes fundamentales para la realización de este trabajo.

Al M. en C. Juan Carlos Carpio por su continua aportación y orientación para llevar a cabo este trabajo.

Al QBP Jonatan Castillo Millán por su aportación a este trabajo.

Al Dr. Agustín Ruiz Calorera por las sugerencias realizadas a este trabajo.

A la M. en C. Araceli Rodríguez por su motivación y entusiasmo que siempre me brindo.

A mis compañeros y amigos que me han acompañado durante este camino y que hoy comparten conmigo este logro.

Y a todas las personas que no menciono pero han sido parte de la realización de este trabajo.

INDICE

Índice de figuras	3
Índice de tablas	5
Abreviaturas	6
Resumen	7
1. Introducción	8
1.1 Leptospirosis	8
1.1.1 Características Microbiológicas	9
1.1.2 Mecanismo de Infección y patogenia	10
1.1.3 Manifestaciones clínicas	12
1.1.4 Métodos de diagnóstico	14
1.1.5 Tratamiento	15
1.1.6 Epidemiología	15
1.2 Inmunología de la leptospirosis	16
1.2.1 Inmunoglobulinas	17
1.2.2 Anticuerpos monoclonales	19
2. Justificación	23
3. Objetivo general	24
3.1 Objetivos particulares	24
4. Metodología	25
4.1 Inmunización	26
4.1.1 Animales	26
4.1.2 Antígeno	26
4.2 Evaluación de la respuesta inmune y titulación de anticuerpos	27
4.3 Fusión celular	29
4.4 Selección bioquímica de hibridomas positivos	30
4.5 Clonación celular	31
4.6 Proliferación in vitro, in vivo y caracterización de anticuerpos	32
4.7 Concentración de anticuerpos	34
4.8 Purificación de anticuerpos con proteína A	35
4.9 Cuantificación de proteínas por el método de Bradford	36
4.10 Inmunoelctrotransferencia (Western blot)	36
4.10.1 Preparación del antígeno para Inmunoelctrotransferencia	38
4.10.2 Electrotransferencia	40
4.11 Inmunofluorescencia Indirecta	42
4.12 ELISA indirecto para la determinar sensibilidad de los AcMo	43
5. Resultados	45
5.1 Inmunización	45
5.2 Titulación de Anticuerpos	47
5.3 Fusión celular y selección de hibridomas positivos	48

5.4	Clonación celular	51
5.5	Determinación de isotipo	53
5.6	Concentración, purificación y cuantificación de proteínas por el método de Bradford	55
5.7	Caracterización inmunoquímica	58
5.7.1	Reactividad de los AcMo ante serovariedades de Leptospira	58
5.7.2	Inmunolectrotransferencia (Western blot)	60
5.7.3	Inmunofluorescencia indirecta	62
5.7.4	Determinación de sensibilidad de los AcMo	64
6.	Discusión de resultados	65
7.	Conclusiones	68
8.	Perspectivas	69
9.	Referencias	70
10.	Anexo	74

Índice de figuras

Figura 1. <i>Leptospira pomona</i> . Cultivo con medio de Stuart, microscopia de interferencia	8
Figura 2. Mecanismo de infección de la leptospirosis	11
Figura 3. Representación de una Inmunoglobulina tipo G	17
Figura 4. Producción de anticuerpos monoclonales	20
Figura 5. Síntesis de ácidos nucleídos	22
Figura 6. Diagrama general de la producción de anticuerpos monoclonales contra <i>Leptospira spp</i>	25
Figura 7. Representación de ELISA indirecto	28
Figura 8. Representación de ELISA de captura	33
Figura 9. Preparación de antígenos para Inmunoelctrotransferencia	39
Figura 10. Evaluación de la respuesta inmune humoral de los diez ratones después de tres inmunizaciones con antígeno vacunal	45
Figura 11. Evaluación de la respuesta humoral de los diez ratones después de tres inmunizaciones, con antígeno vacunal	46
Figura 12. Placa de ELISA de la titulación de sueros de ratón (respuesta humoral), partiendo en una dilución 1: 1000	47
Figura 13. Titulación de sueros de ratón después de tres inmunizaciones con la vacuna LEPTOCAN	48
Figura 14. Células de mieloma X63Ag8.653 en cultivo celular con medio RPMI-1640 complementado con SFB 12% A) 40X y B) 100X	49
Figura 15. Valores de absorbancias del sobrenadante de los hibridomas evaluados por ELISA indirecta, para la selección de células productoras de anticuerpos específicos	50
Figura 16. Colonias de hibridomas	51
Figura 17. Distribución de ELISA de captura para la determinación de subclases, utilizando sobrenadantes de cultivo de las clonas	53
Figura 18. Valores de absorbancias obtenidas para la caracterización de subclases de IgG de las clonas	54

Figura 19. Purificación de los AcMo anti <i>Leptospira</i>	56
Figura 20. Gel de poliacrilamida al 11% de purificación por cromatografía de afinidad con columna casera. A) AcMo 10 µg con β- mercapto etanol y B) AcMo 10 µg sin agente reductor	57
Figura 21. Gel de poliacrilamida al 11% de purificación por cromatografía de afinidad con columna comercial MILLIPOR. A) AcMo 10 µg con β- mercapto etanol y B) AcMo 10 µg sin agente reductor	57
Figura 22. Valores de absorbancia presentados por el reconocimiento de los nueve AcMo con del las serovariedades de <i>Leptospira</i> (<i>L. icterohaemorrhagiae</i> , <i>L. pomona</i> , <i>L. tarassovi</i> , <i>L. grippityphosa</i> , <i>L. wolffi</i> y <i>L. canicola</i> ; presentes en la vacuna LEPTOCAN utilizada para la inmunización	59
Figura 23. Valores de absorbancia presentados por el reconocimiento de los nueve AcMo con serovariedades de <i>Leptospira</i> , (<i>L. bataviae</i> , <i>L. cynopteri</i> , <i>L. pirogenes</i> , <i>L. javanica</i> , <i>L. noguchii</i> y <i>L. biflexa</i>) y vacuna LEPTOCAN	60
Figura 24. Inmunoelectrotransferencia de antígenos de <i>L. icterohaemorrhagiae</i> (A) y vacuna LEPTOCAN (B) con sobrenadantes de cultivo concentrado	61
Figura 25. Inmunofluorescencia indirecta de los AcMo con bacterias del genero <i>Leptospira icterohaemorrhagiae</i>	63
Figura 26. Curva de sensibilidad de los AcMo	64

Índice de tablas

Tabla 1. Características de las inmunoglobulinas de ratón	18
Tabla 2. Características de la inmunoglobulinas tipo G de ratón y rata	18
Tabla 3. Líneas celulares de mieloma	21
Tabla 4. Esquema de inmunización para la obtención de AcMo contra <i>Leptospira spp</i>	27
Tabla 5. Calendario para la fusión y selección de híbridos	30
Tabla 6. Preparación de geles de gradiente de 5% al 22.5 %	37
Tabla 7. Preparación de gel concentrador	37
Tabla 8. Resumen de resultados de fusión	50
Tabla 9. Híbridos originales y los grupos de clonas obtenidos	52
Tabla 10. Isotipos de los anticuerpos producidos por las diferentes clonas	54
Tabla 11. Resultados del cultivo y concentración de los AcMo anti-leptospira	55

Resumen

La leptospirosis es una enfermedad zoonótica sistémica de distribución mundial, causada por una espiroqueta del género *Leptospira*. Es causa de subdiagnóstico por su similitud clínica con otras enfermedades (dengue, salmonelosis y otras febriles) por lo que el diagnóstico de laboratorio es decisivo. Actualmente la microaglutinación para búsqueda de anticuerpos en sospechosos es la técnica de referencia, pero es compleja por requerir de cultivos puros de los serovares prevalentes (19 en caso de México). El uso de métodos rápidos y de fácil ejecución para buscar antígenos con anticuerpos monoclonales (AcMo) son la mejor opción para el diagnóstico oportuno.

Objetivo. Producir anticuerpos monoclonales específicos contra *Leptospira spp* con fines diagnósticos.

Material y métodos. Se produjeron AcMo por las técnicas convencionales contra los serovares incluidos en la vacuna de uso veterinario LEPTOCAN del laboratorio Nova Litton (México) que incluye las siguientes serovariedades: *Leptospira interrogans* (*L. canicola*, *L. icterohaemorrhagiae*, *L. wolffi* y *L. pomona*), uno de *L. kirschneri* (*L. grippothyphosa*) y otro de *L. borgpetersenii* (*L. tarassovi*). Se evaluó la respuesta humoral producida por los ratones mediante ELISA indirecta. Se determinó la reactividad y especificidad de los AcMo contra tres de los serovares más frecuentes por ELISA, IET e IFI. Como control de la capacidad de los AcMo para identificar *Leptospira* en IFI, las bacterias se tiñeron con coloración de Hoecht.

Resultados. Se obtuvieron nueve clonas productoras de AcMo (IgG, subclase 1gG2b). Mediante ELISA e IFI se encontró que todos reconocen epítomos comunes al género *Leptospira*, sin distinción del serovar respectivo. En IET no hubo reactividad lo que sugiere que el reconocimiento es de epítomos conformacionales y no secuenciales.

Conclusiones. Los AcMo obtenidos ofrecen la posibilidad de desarrollar un ELISA de captura y/o una IFI para el tamizaje rápido de muestras clínicas de pacientes con sospecha de leptospirosis. La microaglutinación quedará reservada para las muestras que resulten positivas, cuando se requiera la identificación de serovares con fines epidemiológicos.

1. Introducción

1.1 Leptospirosis

La leptospirosis es una enfermedad infecciosa generalizada; es una zoonosis de distribución mundial (Acha y Sziyres, 1992), conocida como síndrome de Weil, enfermedad de los porquerizos o fiebre de los cañaverales, que es causada por una espiroqueta del género *Leptospira* (NORMA Oficial Mexicana NOM-029-SSA2-1999).

La *Leptospira* presenta la siguiente clasificación taxonómica (Laguna, 2000).

- *División: Procariotes.*
- *Clase: Schizomicetes.*
- *Orden: Spirochaetales.*
- *Familia: Leptospiraceae.*
- *Género: Leptospira.*
- *Especies: L. interrogans, L. biflexa.*



Figura 1. *Leptospira pomona*. Cultivo con medio de Stuart, microscopia de interferencia.

Fuente: Carrada Leptospirosis Humana 2005

1.1.1 Características microbiológicas

Las bacterias del género *Leptospira* son bacterias aeróbicas o microaerofílicas, catalasa, oxidasa y peroxidasa positivas. Tienen forma de espiral, son muy finas, de 5-18 μm de longitud y 0.1-0.2 μm de ancho. Tienden a formar un gancho aerobio que se ha diferenciado de otras espiroquetas patógenas y se puede cultivar en medios artificiales (Acha y Szyfres, 1992).

La estructura consta de un protoplasma helicoidal con espiras apretadas y extremidades en forma de gancho. La membrana externa multiestratificada es rica en lípidos (20%) y el péptidoglicano es de ácido α , ϵ -diaminopilémico (Acosta et al., 1994), la capa de peptidoglicano está asociada con la membrana citoplasmática en vez de la membrana externa, algo que es único de las espiroquetas.

Las bacterias no se visualizan con los procedimientos de tinción habituales. Observadas en fresco, con microscopia de campo oscuro, se ven como “cordeles” finísimos, muy brillantes, dotados de movimientos de rotación y flexión muy activos. La bacteria tiene 18 hélices por célula y la conformación es dextrógira (en dirección de las manecillas de un reloj) (Carrada, 2005). Existen dos flagelos, uno en cada extremidad, están asociados al cilindro protoplásmico y se extienden hacia el centro de la *Leptospira* sin llegar a cruzarse.

La temperatura óptima de crecimiento es 30° C y el tiempo para obtener una nueva generación es de 7 a 10 días para nuevas colonias aisladas. Se pueden cultivar en medios artificiales ricos en suero de conejo al 10%, enriquecido con ácidos grasos de cadena larga como principal requerimiento nutritivo. Se desarrollan lentamente en medio de albúmina bovina a 1% y tween-80 (Medio de Ellinghausen, McCulloch, Harris y Johnson o EMJH) (Carrada, 2005).

El género de *Leptospira* se divide en las siguientes serovariedades:

- *Interrogans* patógena para el ser humano y los animales.
- *Biflexa* saprófita que se localiza en la superficie del suelo y el agua.

Son clasificadas de acuerdo a sus características bioquímicas de cultivo; donde *L. biflexa* crece a 13°C en presencia de 8 azaguanina, y no forma células esféricas en presencia de NaCl 1M en comparación con *L. interrogans* que no presenta las características anteriormente mencionadas (Loner C, 2005).

Se encuentran agrupadas antigénicamente en 23 serogrupos y 200 serovariedades para el complejo *Interrogans*; además genotípicamente existen 7 genopecies, 28 serogrupos y numerosos serovares y genotipos (McDonough, 2001).

1.1.2 Mecanismo de infección y patogenicia

La infección es a través de la piel erosionada, mucosas ocular y nasal, al entrar en contacto con agua, suelos húmedos y vegetación contaminada con orina de animales infectados o por manipular fetos, placentas y vísceras (Figura 2). El agente sobrevive durante varias semanas en ambientes húmedos, ligeramente alcalinos y calurosos. La *Leptospira* es altamente susceptible a la desecación y a los cambios de pH; pH<6 y pH>8 son inhibidores; temperaturas <7-10° C y temperaturas >34-36° C son nocivas. Los organismos sobreviven hasta 180 días en suelos húmedos, por varios meses en superficies acuosas y sobreviven aún mejor en agua estancada que en movimiento. Se presenta durante todo el año pero con mayor frecuencia en épocas de lluvias. La leptospirosis transmitida de humano a humano es sumamente rara (NORMA Oficial Mexicana NOM-029-SSA2-1999).

Leptospira se elimina rápidamente de todos los tejidos, excepto del cerebro, los ojos y los riñones, donde sobrevive y se multiplica para luego eliminarse a través de la orina. La bacteria permanece en el huésped por semanas o meses y, en el caso de los roedores, puede reproducirse y ser eliminada durante toda la vida.

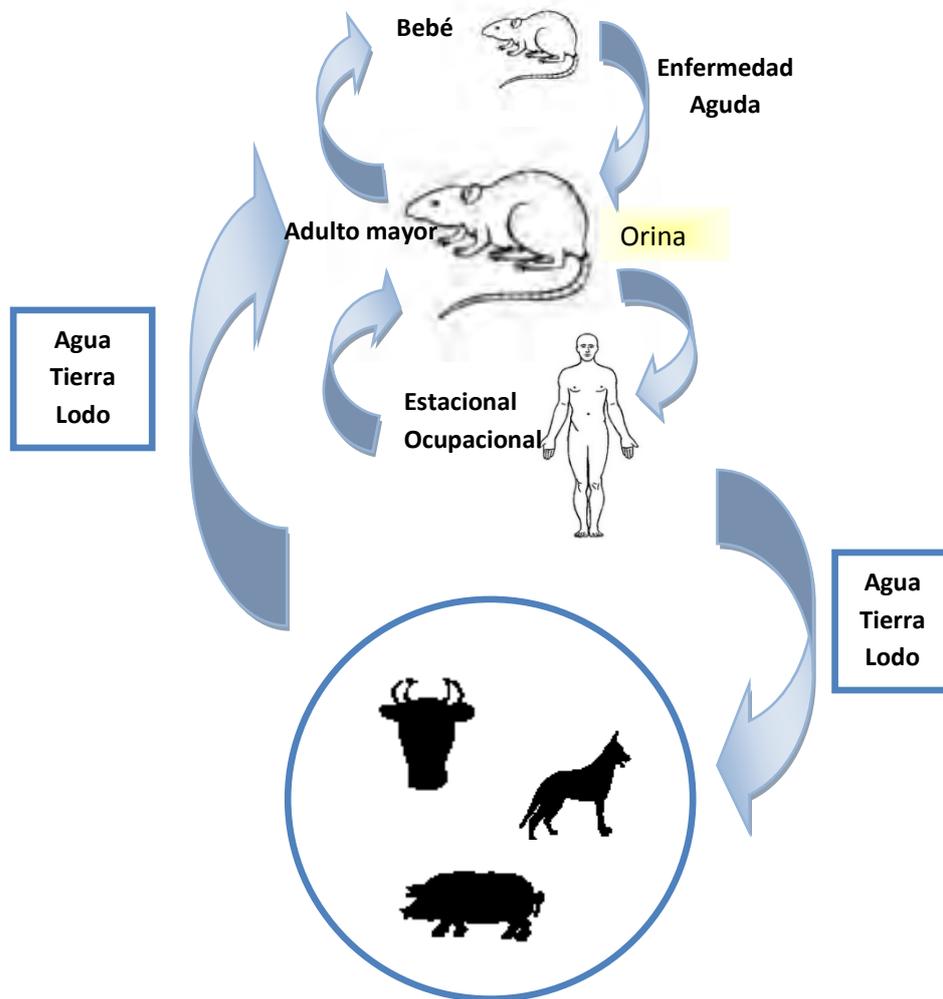


Figura 2. Mecanismo de infección de la leptospirosis. Los roedores constituyen la fuente más frecuente de infección, siendo reservorios naturales. Las infecciones en animales o en el hombre ocurren en forma directa, mediante el contacto con la orina de animales infectados o indirecta por el contacto con agua, tierra o lodo contaminados. Se considera una enfermedad profesional u ocupacional a veterinario o ganaderos y estacional debido a que se da una mayor incidencia en el verano y comienzos de otoño.

Leptospira es resistente a la actividad bactericida del suero normal y en ausencia de anticuerpos específicos no es fagocitada ni destruida por los polimorfonucleares o macrófagos. Después de penetrar la piel o las mucosas, provoca una bacteriemia que inicialmente alcanza a todas las partes del cuerpo, incluyendo el líquido cefalorraquídeo (LCR) y los ojos, entre los días 5 y 7 genera la producción de anticuerpos aglutinantes y opsonizantes. Si esta respuesta no es suficiente para detener su progreso, la bacteria avanza en los tejidos. Allí se multiplica en forma acelerada, deja de ser encontrada en la sangre y se elimina por la orina durante semanas o meses (fase inmune o de leptospiruria) (Acosta et al., 1994).

Los lipopolisacáridos de la *Leptospira* estimulan la adherencia de neutrofilos y la activación de las plaquetas, lo que puede ser responsable de las anomalías inflamatorias y de coagulación.

1.1.3 Manifestaciones clínicas

Los signos y síntomas de la leptospirosis son inespecíficos por lo que fácilmente se confunde con otros síndromes febriles icterohemorrágicos (SFIH) tales como paludismo, dengue, hepatitis, influenza, infecciones rickettsiales y fiebres hemorrágicas virales. Este cuadro clínico indefinido puede desembocar en complicaciones letales cuando el paciente no recibe tratamiento por falta de un diagnóstico clínico y de laboratorio.

El período de incubación promedio es de 10 días durante el cual, la espiroqueta migra por vía sanguínea y se establece en hígado, riñón, pulmón, cerebro y bazo, dependiendo de la serovariedad involucrada. Posterior a esto, los síntomas aparecen bruscamente. La leptospirosis cursa en dos formas clínicas: anictérica o benigna, que se presenta en un 85 a 90% de los casos y la icterica o grave, también llamada enfermedad de Weil, que se presenta en un 10 a 15% de los casos (Acosta et al., 1994; Lilenbaum et al., 2002; Songer y Thiermann, 1995).

La forma anictérica esta dividida en dos fases. La fase infecciosa que dura entre 4 y 9 días donde se presenta fiebre alta, escalofríos y mialgias severas, sobre todo en los miembros inferiores. La anorexia, las náuseas y el vómito ocurren en la mitad o más de los pacientes. La fase inmunitaria, se presenta después de 2 a 3 días de la fase infecciosa donde existe la disminución de los síntomas como la fiebre (corresponde a la aparición de *Leptospira* en la sangre y del LCR), y dura de 1 a 3 días. Puede existir reaparición de fiebre, si esto sucede los pacientes presentan delirio. Hay cefalea intensa persistente que no responde a analgésicos comunes. Se encuentran mialgias graves que comprometen en especial los gastronemios, la región paraespiral, el abdomen y el cuello. A nivel ocular se presenta fotofobia, dolor, hemorragia conjuntival (Acosta et al., 1994; Lilenbaum et al., 2002; Songer y Thiermann, 1995).

La forma ictérica, también denominada síndrome de Weil, es la forma más severa de la enfermedad, aparece a nivel clínico, se presenta un aumento de bilirrubinas no mayor a 20 mg/dl, fosfatasa alcalina moderadamente elevada y alza de aminotransferasas que raramente excede 5 veces los valores normales, que se manifiesta con la presencia de una ictericia progresiva. Hay hemorragias generalizadas siendo la evidencia clínica más notorias de esta forma de enfermedad, epistaxis, sangrado del tracto gastrointestinal, deterioro de la función renal, diátesis hemorrágica manifiesta como púrpura, petequias, hematuria o hemorragia conjuntival hemorragias pulmonares y sangrado a nivel de las glándulas suprarrenales y el sistema nervioso central (SNC) (Acosta et al., 1994).

El compromiso de la función renal, debido principalmente a una necrosis tubular aguda, puede llevar al paciente a una azoemia severa, concluyendo en la mayoría de estos casos a diálisis peritoneal o hemodiálisis. También se han informado alteraciones más raras, como fibrilación auricular con falla aguda del ventrículo izquierdo. El colapso cardiovascular por lo general es la causa de muerte en estos pacientes. En el desarrollo de esta complicación se han implicado factores tipo endotoxinas aún no estudiados.

1.1.4 Métodos de diagnóstico

Existen diferentes métodos de laboratorio que permiten el diagnóstico serológico de la enfermedad. Las pruebas serológicas son aplicables en la segunda fase; los anticuerpos aparecen de los días 6 a 12 de la enfermedad y el título máximo se alcanza en la tercera o cuarta semana (Acosta et al., 1994). La prueba de referencia recomendada por la Organización Mundial de la Salud (OMS) o estándar de oro es la técnica de microaglutinación con antígenos vivos (MAT), que se emplea para detectar anticuerpos anti-leptospira en suero. Se consideraron casos confirmados de leptospirosis los sueros únicamente que presentan un título de anticuerpos mayor o igual a 800, así como la demostración de un incremento de 4 veces el título o la seroconversión entre sueros pareados. Las muestras de sueros con títulos entre 200 y 400 se consideraron casos presuntivos o probables, mientras que los sueros que resultan negativos se consideraron como no confirmados. Esta prueba es altamente específica, no obstante, presenta una sensibilidad limitada en la fase aguda, debido a que los anticuerpos son detectables alrededor de los 7-10 días de la aparición de los síntomas y en general se requiere una segunda muestra de suero para confirmar el caso, lo que retarda el diagnóstico y el tratamiento (Myers, 2005).

Durante el periodo febril de leptospiemia se puede aislar el microorganismo del LCR; después de la primera semana se puede cultivar a partir de la orina. Al término de la primera semana son detectables los anticuerpos en el suero del enfermo, empleando la técnica de MAT lo que hace a este método serológico el de elección para el diagnóstico de la leptospirosis.

Hay otros métodos aún no usados en forma amplia como la PCR y anticuerpos monoclonales específicos (Acosta et al., 1994).

1.1.5 Tratamiento

Se ha comprobado que un tratamiento oportuno pueden revertir las manifestaciones de la enfermedad.

Los elementos más importantes en el manejo son: antibióticos, soporte respiratorio y cardiovascular, diálisis (peritoneal o hemodiálisis) y transfusiones sanguíneas en los casos severos de la enfermedad (Damment, 2005).

Existe un grupo de antibióticos con grado variable de efectividad contra la *Leptospira*. Los más importantes son: penicilina, doxiciclina, tetraciclinas, eritromicina, ampicilina, amoxicilina y estreptomycin. De estos, la penicilina y la doxiciclina son los más aceptados en la práctica clínica (Acosta et al., 1994, Rodríguez et al., 2001).

1.1.6 Epidemiología

La vigilancia epidemiológica de la leptospirosis es sumamente difícil de controlar porque el microorganismo se puede albergar y expulsar en la orina de muchos animales, perpetuándose entre ellos el estado de portador. La orina es la fuente de contagio más importante de *Leptospira*, después de la infección aguda.

La distribución de la leptospirosis se ha clasificado en dos grandes grupos:

- a) Leptospirosis rural: asociada a actividades agroganaderas y recreativas que impliquen el contacto con medios acuáticos (ganaderos, agricultores y excursionistas)
- b) Leptospirosis urbana: donde la población expuesta corresponde a grupos profesionales u ocupacionales.

Esta zoonosis se conoce en México desde 1920 cuando se presentó el primer caso en Yucatán siendo reportada por Noguchi y Klieger la enfermedad se confundía con la fiebre amarilla.

Dos características que hacen a *Leptospira* difícil de erradicar son las siguientes (Caíno et al., 2006):

- La bacteria puede permanecer por periodos prolongados en los túbulos renales de animales sin que presenten enfermedad, ni cambios patológicos en el riñón.
- Los animales silvestres representan un reservorio importante para reinfectar continuamente a las poblaciones domésticas.

1.2. Inmunología de la leptospirosis

La patogénesis de la leptospirosis está en su mayoría controlada por la respuesta humoral.

Los seres humanos reaccionan a una infección con *Leptospira* con la producción de anticuerpos específicos. La seroconversión puede ocurrir de 5 a 7 días después de la aparición de la enfermedad pero algunas veces solo después de 10 días o incluso más.

Los anticuerpos IgM aparecen generalmente más temprano que los anticuerpos de clase IgG y estos últimos usualmente permanecen detectables por meses o aún años aunque a bajos títulos.

La detección de anticuerpos IgG es más variable; algunas veces pueden no ser detectables en absoluto o ser detectables por períodos relativamente cortos de tiempo, pero ocasionalmente pueden persistir por varios años.

Los anticuerpos son dirigidos contra:

- Antígenos comunes (llamados antígenos género específicos) que son compartidos por todas las leptospirosis tanto patógenas como saprofitas.
- Antígenos serovar específicos y serogrupo específicos (Leptospirosis humana: guía para el diagnóstico, vigilancia y control/OMS 2008).

1.2.1 Inmunoglobulinas

Los anticuerpos o inmunoglobulinas son un tipo de glicoproteínas. Funcionan como la parte específica del receptor de células B (BCR) que reconocen epítopos a nivel de la membrana del linfocito B, y como moléculas secretadas por las células plasmáticas. Estas últimas proceden de la activación, proliferación y diferenciación de células B. Estructuralmente están formados por dos cadenas polipeptídicas pesadas H (del inglés *Heavy* pesado) y dos ligeras L (del inglés *Light* ligero) unidas entre sí mediante enlaces covalentes. Las cadenas ligeras consisten en una región variable (VL) y una constante (CL) mientras que las pesadas presentan una región variable (VH) y tres constantes (CH1, CH2, CH3) (Figura 3). Funcionalmente podemos distinguir tres porciones en los anticuerpos: dos de ellas implicadas en el reconocimiento y unión al antígeno denominadas regiones Fab (*antigen binding Fragment*) y otra implicada en las funciones de los anticuerpos y en su vida media en sangre, llamada región Fc (*crystallizable Fragment*) (Ruiz et al., 2007).

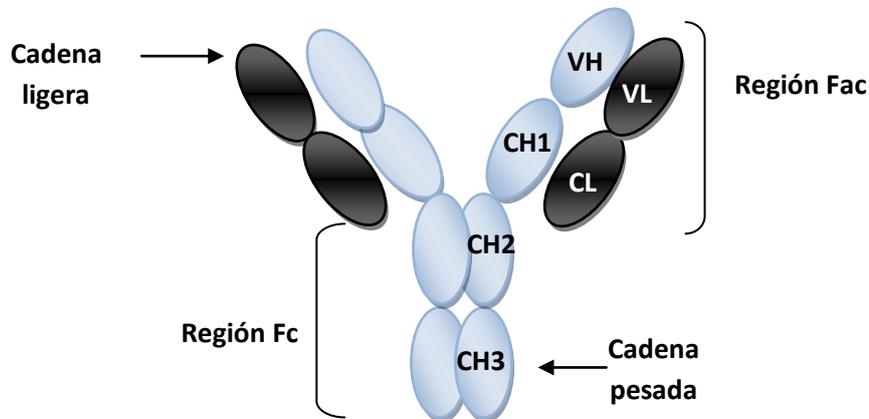


Figura 3. Representación de una Inmunoglobulina tipo G. Anticuerpo más abundantes en el organismo que neutralizan los antígenos; activan el sistema del complemento, capaz de unirse a otras células del sistema inmune (macrófagos, células NK), atraviesan membranas biológicas y por tanto durante el embarazo pueden pasar de la madre al feto.

Existen cinco clases diferentes de anticuerpos, que se diferencian entre sí por una serie de cambios estructurales que les confieren funciones diversas en el organismo. Los cinco tipos de anticuerpos se denominan: Ig G, Ig M, Ig E, Ig A e Ig D (Tabla 1).

Tabla 1. Características de la inmonoglobulinas de ratón. Fuente Goding, 1996

	IgM	IgG	IgA	IgD	IgE
Concentración en suero	0.1-1.0mg/mL	3-20mg/mL	1-3mg/mL	1-10µg/mL	0.1-1µg/mL
Peso Molecular	900000	160000	170000-500000	180000	190000
Cadenas pesadas	µ	γ	α	δ	ε
Cadenas ligeras	K ó λ	K ó λ	K ó λ	K ó λ	K ó λ
Subclases	1	4	1	1	1
Vida media (días)	1	2-4	1	~1	~1
Hidratos de carbono	9-12%	2-3%	7-11%	12-15%	12%
Citotoxicidad mediada por complemento	+	+	-	-	-
Unión a proteína A	-	+	-	-	-
Unión a proteína G	-	+	-	-	-

Las inmunoglobulinas de la clase IgG presentan 4 subclases con diferentes características las cuales se describen en la Tabla 2.

Tabla 2. Características de la inmonoglobulinas tipo G de ratón. Fuente Modificada de Goding, 1996.

Especie	Subclase	Citotoxicidad mediada por complemento	Unión a proteína A	Unión a proteína G
Ratón	IgG1	-	pH >8	++
	IgG2a	++	pH >4.5	++
	IgG2b	+++	pH >3.5	++
	IgG3	+	pH >4.5	+

1.2.2 Anticuerpos monoclonales

La tecnología de los anticuerpos monoclonales (AcMo) se inició a partir de los trabajos de Georges Kohler y Cesar Milstein en 1975 resultado de los experimentos realizados en Reino Unido. Fueron los primeros que tuvieron éxito en la obtención de hibridomas murinos productores de anticuerpos específicos contra eritrocitos de carnero (Kohler C, Milstein C, 1975).

La producción de los AcMo principia con la inmunización repetida de un ratón Balb/c con un antígeno específico o con una mezcla antigénica para inducir una buena respuesta humoral (Álvarez, 2004). Posterior a ello, con un desestabilizador de membrana como es el polietilenglicol (PEG) se realiza la fusión entre una línea celular y los linfocitos B del ratón inmunizado que están produciendo anticuerpos específicos, (Figura 4).

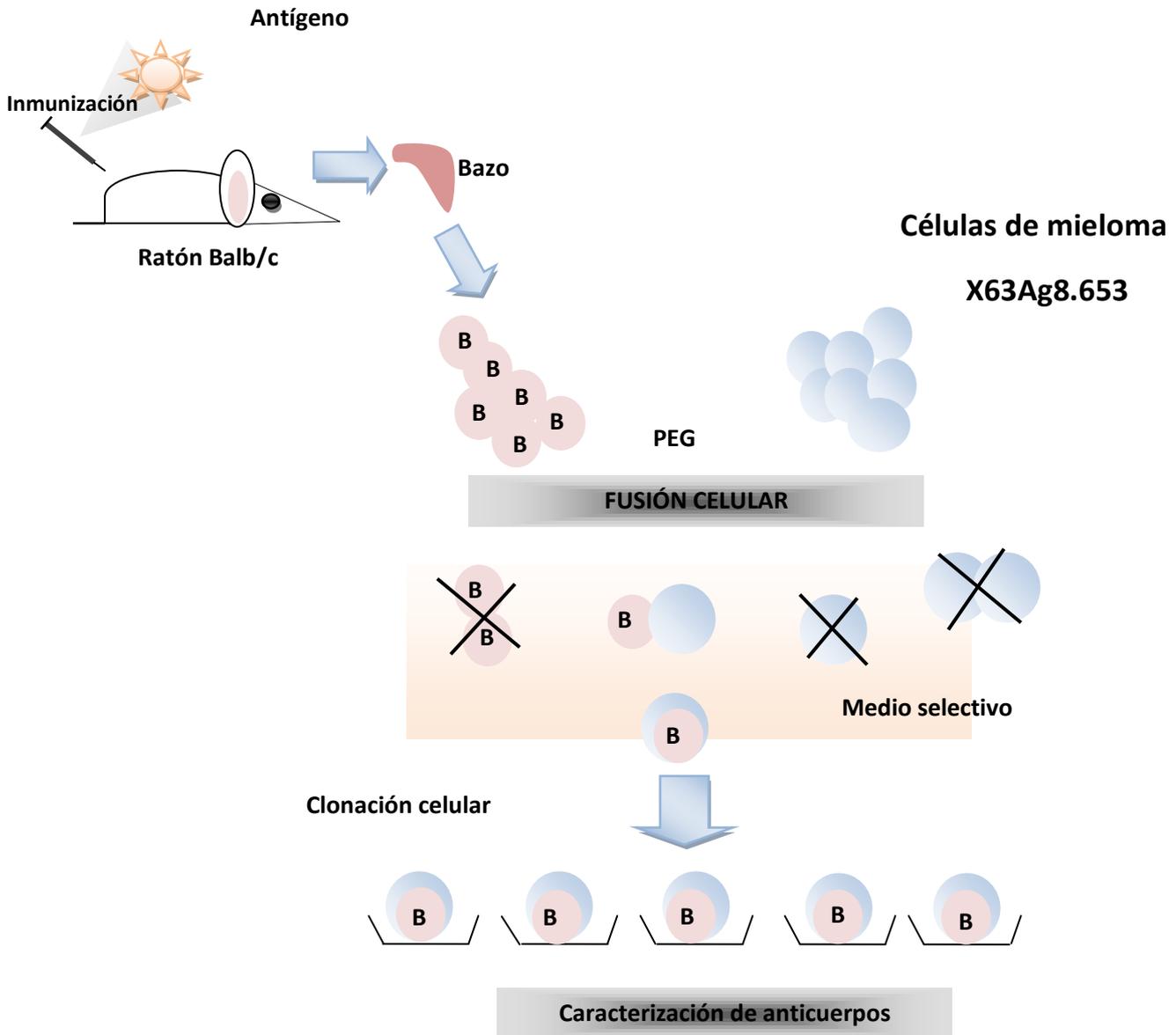


Figura 4. Producción de anticuerpos monoclonales. Tras la hiperinmunización de un ratón con un antígeno, se extrae las células de bazo y se fusionan mediante polietilenglicol con células de mieloma defectuosas en una de las enzimas que participan en la ruta de síntesis de nucleótidos (HGPRT). Las células del mieloma se mantienen en un medio selectivo en presencia de hipoxantina, aminopterina y timina (HAT). Tras el crecimiento de los hibridomas, el sobrenadante de cultivo se analiza para detectar la presencia de anticuerpos específicos.

Las líneas celulares de mieloma derivadas de ratón más utilizadas en la producción de anticuerpos monoclonales se puede ver en la Tabla 3.

Tabla 3. Líneas celulares de mieloma Fuente: Harlow & Lane, 1988

Líneas celulares de ratón	Derivada de:	Cadenas de Inmunoglobulinas expresadas	Ig que secreta
P3-X63 Ag8		Gamma 1 y kappa	IgG 1
X63Ag8.653	P3X63Ag8	Ninguna	Ninguna
Sp2/0-Ag14	P3X63Ag8X	Ninguna	Ninguna
FO	Sp2/0-AG14	Ninguna	Ninguna
NSI/1-Ag4-1	P3X63Ag8	Kappa	Ninguna
NSO/1	NSI/1-Ag4-1	Ninguna	Ninguna
FOX-NY	NSI/1-Ag4-1	Kappa	Ninguna

La línea celular de mieloma le proporcionara las características de división indefinida, como toda línea cancerosa, además presenta dos mutaciones genéticas que las hacen carentes de las enzimas hipoxantina- guanina-fosforribosil tranferas (HGPRT) y timidina cinasa (TK) que inhabilitan para efectuar la ruta alterna de síntesis de DNA. Al momento de la fusión se realiza una selección bioquímica al agregar aminopterina, (Medio HAT) un bloqueador de síntesis de DNA, de modo que sólo proliferan aquellos híbridos (linfocito - mieloma) que contienen las enzimas HGPRT y TK aportadas por las células B (Figura 5). Por tal motivo se define como AcMo a aquel que reconoce específicamente un solo epítipo, y que es producido por una clona única de linfocitos B. (Ruiz et al, 2007) capaces de proliferar en cultivo y o propagarse en animales genéticamente compatibles.

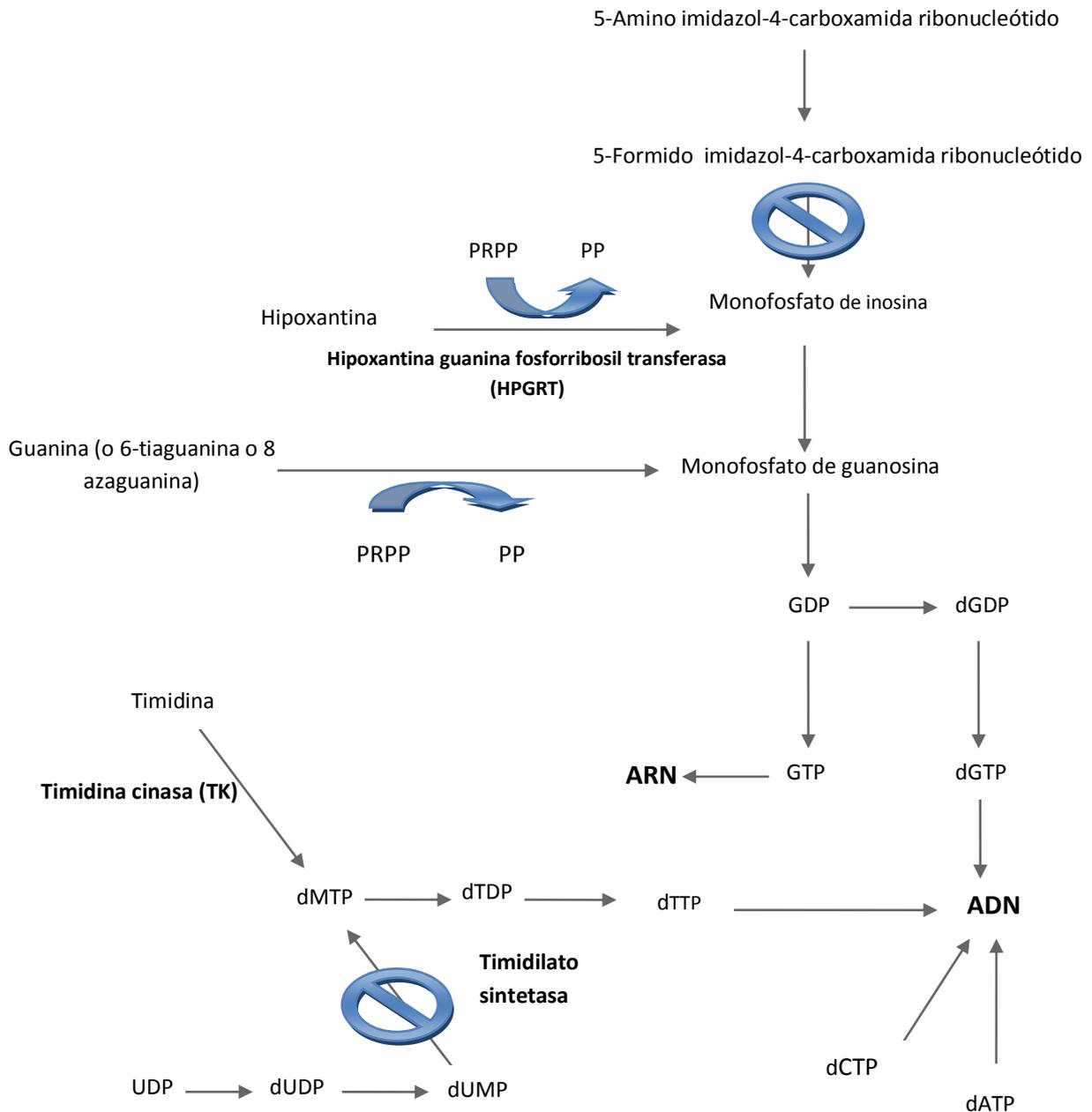


Figura 5. Síntesis de ácidos nucleídos. Se muestra el sitio donde la aminopterina bloquea la ruta en presencia del medio HAT (hipoxantina, aminopterina –timidina), seleccionando solo aquellas células que poseen las enzimas TK y HPGRT.

2. Justificación

La leptospirosis es una enfermedad que puede presentarse con una amplia diversidad de manifestaciones clínicas que varían desde una enfermedad pseudo gripal leve hasta un cuadro serio que puede llegar a ser fatal y puede mimetizar a otras enfermedades, como el dengue, salmonelosis y febriles. (Leptospirosis humana: guía para el diagnóstico, vigilancia y control / OMS, 2008). La similitud con la que se presentan las enfermedades febriles en su fase inicial, ha propiciado dificultades en nivel operativo para el diagnóstico oportuno y para la atención adecuada para los enfermos, así como su notificación y su clasificación (Navarrete et al., 2006). Desde el punto de vista clínico, la leptospirosis es difícil de diferenciar de un gran número de enfermedades y con mucha frecuencia es subdiagnosticada. Actualmente los métodos de laboratorio ayudan a confirmar la leptospirosis en donde se sospecha la enfermedad con base en los datos clínicos mas el empleo de la técnica de aglutinación microscópica (MAT), que es el método de referencia en el diagnóstico, pero esta metodología presenta varias desventajas tales como la necesidad de mantener cepas vivas de *Leptospira* y de personal entrenado en su realización. En comparación, existen técnicas de laboratorio como las inmunoenzimáticas que ofrecen una mayor sensibilidad del 87 a 95% (Loner C, 2005), es por ello que el presente trabajo tuvo por objetivo producir y caracterizar AcMo que puedan ser utilizados en técnicas inmunoenzimáticas tales como las reportadas por Yan et al., 1999, al desarrollar una ELISA de captura o ELISA de tipo competitivo (Surujballi y Elmgren, 2000), que permita la detección diagnóstica de leptospirosis en forma rápida y certera.

3. Objetivos

3.1 Objetivo General

Producir anticuerpos monoclonales específicos contra *Leptospira spp*, con fines diagnósticos.

3.2 Objetivos Particulares

3.2.1 Inmunizar ratones con un antígeno vacunal que contiene las siguientes serovariedades: *L. icanicola*; *L. icterohaemorrhagiae*. *L. woolffi*; *L. Pomona*; *L. grippotiphosa* y *L. tarasovii*, para inducir una respuesta policlonal.

3.2.2 Caracterizar el tipo y subtipo de los anticuerpos obtenidos por el método de ELISA.

3.2.3 Comprobar reactividad de los AcMo, mediante técnica de ELISA, Inmunoelectrotransferencia e Inmunofluorescencia.

3.2.4 Determinar la sensibilidad de los AcMo utilizando cultivo de bacterias por técnica de ELISA.

4. Metodología

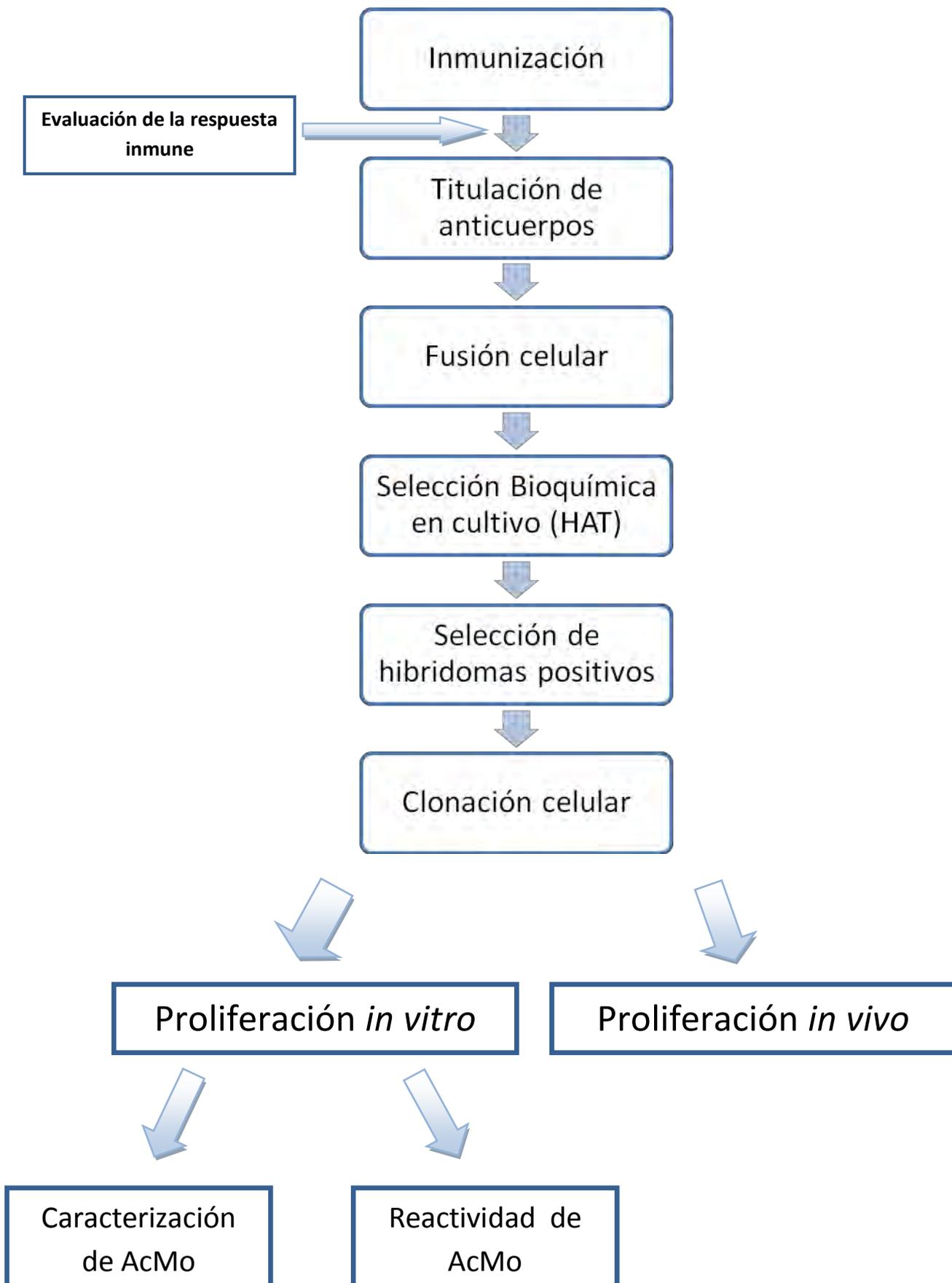


Figura 6. Diagrama general de la producción de anticuerpos monoclonales contra *Leptospira spp*

La Figura 6 muestra de manera general la metodología que se llevó a cabo para la producción de los AcMo anti-leptospira. Primero se realizó la inmunización de 10 ratones Balb/c hembras de 4 semanas de edad con antígeno vacunal. Se hizo el seguimiento de la respuesta humoral producida mediante ELISA indirecta. Se tituló el suero obtenido después de la tercera inmunización. Se realizó la fusión celular y una selección bioquímica con medio HAT. Se evaluaron los hibridomas producidos seleccionando solo a los positivos a la producción de anticuerpos específicos. Se procedió a la clonación celular por dilución limitada. Los hibridomas productores de los AcMo anti-leptospira se expandieron de manera *in vivo* en ratones para la producción de líquido de ascitis y de manera *in vitro* en cultivo celular. Para caracterizar a los AcMo se realizó un ELISA de captura y para determinar su reactividad se realizó una inmunofluorescencia (IFI) y después un ELISA indirecto con antígeno de *Leptospira*, y una curva de sensibilidad por ELISA.

4.1 Inmunización

4.1.1 Animales

Se utilizaron diez ratones hembras Balb/c de 6 semanas de edad los cuales de manera indistinta fueron identificados de la siguiente manera: CaLo, CaPa, MiPd, MiPi, PiPd, CaLo, Co, MdPd, MiCo y S/M.

4.1.2 Antígeno

Se utilizó la vacuna LEPTOCAN que es una bacterina constituida por cuatro serovares de *Leptospira interrogans* (*L. canicola*, *L. icterohaemorrhagiae*, *L. wolffi* y *L. pomona*), un serovar de *Leptospira kirschneri* (*L. grippothyphosa*) y un serovar de *Leptospira borgpetersenii* (*L. tarassovi*), inactivadas, estabilizadas y adsorbidas en adyuvante oleoso Inmunoset.

Previo a la primera inmunización, mediante sangrado del seno infraorbitario se obtuvo suero pre inmune, el cual sirvió para la evaluación de las inmunizaciones.

La inmunización se realizó mediante la inoculación de la vacuna LEPTOCAN de manera IP con el siguiente esquema de inmunización (Tabla 4).

Tabla 4. Esquema de inmunización para la obtención de AcMs contra *Leptospira spp*

DIA	DOSIS DE ANTIGENO	OBSERVACIONES
1	25 µg	Sangrado pre- inmune 200µL
7	25 µg	Sangrado 200µL
14	25 µg	Sangrado 200µL
21	25 µg	Sangrado 200µL
25	25 µg	Sin sangrado
28	FUSION CELULAR	ULTIMO SANGRADO

4.2. Evaluación de la respuesta inmune y titulación de anticuerpos

En cada inmunización se extrajo una gota de sangre del ratón obtenida por un pequeño corte en la cola, se separó el suero y se utilizó para evaluar la respuesta inmune mediante ELISA indirecta (Medina, 2009), con anticuerpos anti-Immunoglobulinas de ratón marcados con peroxidasa (Figura 7).

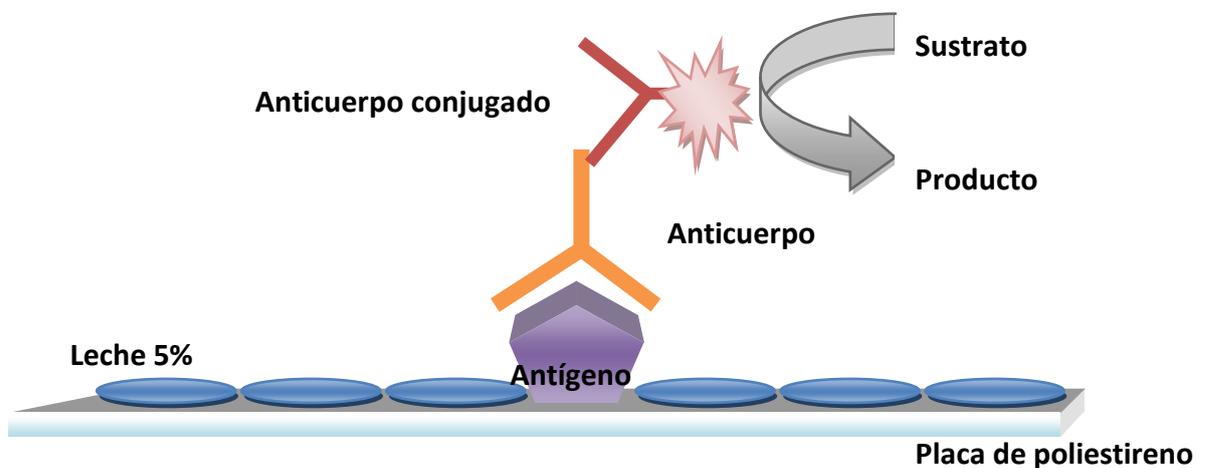


Figura 7. Representación de ELISA indirecto.

Se utilizó como antígeno vacuna LEPTOCAN y antígeno *Leptospira interrogans sr. Icterohaemorrhagica* inactivada previamente con solución de formol al 1% vol/vol por 24 horas estandarizada a la turbidez del tubo 0.5 del Nefelómetro de MF, equivalente a 1×10^8 bacterias, diluidos en solución amortiguadora (anexo 10.1) hasta obtener la concentración de 5µg/mL. Los pozos de la placa de poliestireno se sensibilizaron con un volumen de 100 µL de la solución de antígeno, la cual se mantuvo a 4° C durante toda la noche. Se eliminó el exceso de la solución vertiendo el contenido de los pozos y se secó sobre una gasa. La placa se lavó 3 veces con 200 µL/pozo con PBS-T (anexo 10.3), durante 5 min cada lavado; se agregaron 200 µL/pozo de solución de bloqueo (anexo 10.4) y se incubó durante 30 minutos a 37° C. Se repitieron los 3 lavados y el suero se diluyó 1: 1000 en PBS-T. Cada suero diluido se agregó en volumen de 100µL/pozo y se incubó 2 horas a 37° C. Nuevamente se repitieron los lavados y posterior a ello se colocaron 100µL/pozo del conjugado anti-Ig total de ratón-peroxidasa* a una dilución previamente titulada en PBS-T (anexo 10.3). Se incubó a 37° C durante 2 horas y se lavó. En cada pozo se colocaron 100 µL de la solución de cromógeno/sustrato peroxidasa (anexo 10.5), se dejó incubar durante 8 minutos y se detuvo la reacción enzimática, añadiendo 100 µL/pozo de ácido sulfúrico 2N (anexo 10.7). Se leyó la absorbancia en un lector de ELISA a 490 nm para peroxidasa/ortofenilendiamina.

La titulación de los anticuerpos producidos por el ratón se realizó también mediante ELISA indirecta (Figura 7), utilizando como antígeno vacuna LEPTOCAN a la concentración de 5µg/mL, considerando que se colocó el suero de ratón en diluciones dobles seriadas partiendo de un mínimo de 1: 1000. Se siguió con el mismo procedimiento anteriormente indicado.

Nota: En ambos ELISA, como testigo positivo se utilizó suero de ratón hiper inmunizado, como control negativo solución de PBS y suero de ratón pre inmune.

4.3 Fusión celular

Cuando el título de anticuerpos fue igual o mayor a 4000 se llevó a cabo la fusión celular, seleccionando solo al ratón que presentó la mejor respuesta humoral.

Previo a la fusión celular (3 días antes), se inmunizó al ratón candidato, con la misma dosis de inmunogeno, a lo cual se le denominó reto final.

La fusión celular tiene como propósito obtener células que se reproduzcan indefinidamente y que además sean productoras de anticuerpos específicos mediante la fusión de membranas e intercambio de material genético, para ello se utilizó la línea celular X63Ag8.653 que son células de mieloma. Estas se encontraban en crecimiento exponencial en medio RPMI-1640 suplementado con SFB al 12 %. Para ello se siguió la metodología de Medina et al., 2009 y Gavilondo, 1997, la cual consistió en:

1. Se mezclaron las células de bazo y las de mieloma en una relación 5:1 (5 células de bazo por 1 célula de mieloma) en un tubo de 50 mL, y se centrifugó a 1,200 rpm durante 5 min.
2. Se eliminó el sobrenadante y disgregaron suavemente las células.
3. Por cada 60 millones de células, se agregaron 0.5mL de polietilenglicol (PEG) al 42% (anexo 10.23), en un tiempo aproximado de 60 segundos agitando suavemente (fue recomendable emplear agitador a baja velocidad).
4. Se agregaron 5 mL de medio RPMI-1640 (anexo 10.20) por goteo y agitando suavemente en un lapso de 3 min; de la misma forma se adicionaron 15 mL más en un lapso de 1 min y se centrifugó a 1,200 rpm durante 10 min a 37° C.
5. Se resuspendieron las células en medio RPMI-1640 con SBF al 12% (anexo 10.20, 10.21) adicionado con HAT (anexo 10.24). Se colocaron 200µL/pozo en placas de cultivo de 96 pozos y se cultivaron a 37° C en atmósfera húmeda con 95% aire y 10% CO₂.

6. Las células se revisaron diariamente para identificar si existía algún tipo de contaminación y localizar los pozos con híbridos viables (se presentan como cúmulos de células) o si se requería de cambiar medio.
7. Diez días después de la fusión se realizaron los cambios a medio con HT (anexo 10.25) por 5 días, al finalizar estos solo se cultivaron las células con medio RPMI-1640 (anexo 10.20) con SFB al 12%.
8. La presencia de híbridos productores de anticuerpos se detectó tomando el sobrenadante de los cultivos y realizando un ELISA, con los sobrenadantes de cultivo directamente y se reveló con un conjugado anti-gammaglobulinas de ratón-peroxidasa*.

La eficiencia de fusión se calculó con el número de pozos con hibridomas positivos entre el número total de pozos sembrados y multiplicados por cien.

4.4 Selección bioquímica de hibridomas positivos

Posterior a la fusión diariamente se revisaron las células en cultivo bajo el microscopio invertido, para ubicar los hibridomas viables, así como una posible contaminación bacteriana o fúngica.

El cultivo celular se mantuvo realizando adiciones de medio RPMI-1640 complementado con SFB al 12% y HAT 50X (anexo 10.24) en una temperatura de 37° C y CO₂ al 10% (Tabla 5).

Tabla 5. Calendario para la fusión y selección de híbridos

Día	Tipo de medio	Actividad
1	RPMI-1640-SFB 12%+HAT	FUSIÓN
3	RPMI-1640-SFB 12%+HAT	Cambio de medio
5	RPMI-1640-SFB 12%+HAT	Cambio de medio
8	RPMI-1640-SFB 12%+HAT	Cambio de medio
10	RPMI-1640-SFB 12%+HAT	Cambio de medio
12	RPMI-1640-SFB 12%+HAT	Cambio de medio
14	RPMI-1640-SFB 12%+HAT	Cambio de medio
16	RPMI-1640-SFB 12%+HAT	Cambio de medio

*conjugado de antigamma globulina G producido en cabra, anti ratón.

Aproximadamente dos semanas posteriores a la fusión, se seleccionaron los hibridomas que sobrevivieron y crecieron lo suficiente para poder detectar aquellos de interés por su capacidad de producir anticuerpos específicos.

Se evaluaron los hibridomas resultantes de la fusión celular mediante ELISA indirecta, utilizando el sobrenadante del cultivo de los hibridomas, con anti-gamma globulina G de ratón- peroxidasa.

4.5 Clonación celular

Se llevó a cabo la clonación celular de los hibridomas positivos por dilución limitada (Gavilondo, 1997 y Goding 1996). Se utilizaron placas de cultivo celular de 96 pozos. En la hilera A, se colocaron 100 μ L de medio de cultivo RPMI-1640 con SFB al 12% (anexo 10.20), luego se tomaron 100 μ L de suspensión celular de aquellos híbridos que fueron positivos al antígeno de interés y se colocaron en la posición A1. A partir de ésta se hicieron diluciones dobles seriadas hasta el final de la fila y se dejaron reposar durante 10 min.

Las células de cada pozo se contaron en el microscopio invertido y aquel pozo que contenía 30-40 células se diluyó en 18 mL de medio RPMI-1640 con SFB al 12% (anexo 10.20). De esta suspensión celular se sembraron 200 μ L por pozo en las 7 filas restantes de la placa. La placa se mantuvo a 37° C y 10% de CO₂ durante una semana.

Mediante revisiones diarias a las placas, se identificaron los pozos donde se encontraban células únicas que al pasar de los días formaron una colonia en proliferación. Estas se mantuvieron en la incubadora de CO₂ hasta que alcanzaron un crecimiento de casi el 100 % de la superficie del pozo. El sobrenadante se evaluó nuevamente mediante ELISA indirecta para verificar que continuara secretando anticuerpos específicos. Los que resultaron positivos se procedieron a expandir las células en cultivo celular.

4.6 Proliferación *in vitro*, *in vivo* y caracterización de anticuerpos

Las células verificadas por ELISA indirecto, como productoras de anticuerpos se expandieron en botellas de cultivo de 25 cm², con medio de cultivo RPMI 1640 complementado con SFB al 12 % (anexo 10.20) y se mantuvieron en crecimiento en incubadora de CO₂.

Para a expandir las células en peritoneo de ratón se debe de considerar la histocompatibilidad del mieloma que se va a usar con la cepa de ratón. Una de las ventajas de utilizar la expansión *in vivo* es que se obtendrá una cantidad mayor de anticuerpos específicos, aproximadamente 1 a 10 mg/mL, mientras que en cultivo celular se obtiene de 10 – 100 µg/mL.

Para esto se inoculó al ratón por vía IP con 0.5 mL de adyuvante incompleto de Freud, tres días antes. Se inocularon 5 x 10⁶ células clonadas suspendidas en 0.5 mL de PBS (anexo 10.2). Quince días después de la inoculación de la suspensión celular, los ratones desarrollaron un tumor líquido en el peritoneo, de donde se pudo obtener el líquido de ascitis rico en anticuerpos y las células productoras de éstos.

El líquido de ascitis se puede recuperar de dos maneras distintas. En la primera el animal se mantiene vivo durante todo el proceso

1. Se limpia el área abdominal del ratón con alcohol al 70% o benzal
2. Se hace una punción en la parte baja del vientre a la altura de la ingle con una aguja nueva de número 22 G.
3. El líquido se recolecta en un tubo cónico estéril y en condiciones de esterilidad.

Este procedimiento se puede realizar máximo tres veces, es importante mencionar que el ratón después de la primera obtención, la cantidad de ascitis recolectada es menor y hay una tendencia a la producción de un tumor sólido. Además, la salud del animal se deteriora bastante, por lo que solo se recomienda la “ordeña” máximo tres veces.

La segunda forma de obtener el líquido de ascitis es en animales sacrificados por dislocación cervical.

1. Se desinfecta el área abdominal con etanol al 70%.

2. Fijar al animal a la tabla de disección y realizar una incisión sobre la piel que recubre la cavidad peritoneal
3. A continuación y con ayuda de las pinzas separar el tejido que mantiene unida la piel a la capa serosa del peritoneo.
4. Puncionar con una jeringa (21x22) la capa serosa del peritoneo y extraer lentamente el líquido ascítico, el cual se centrifuga a 1,200 rpm durante 5 min.
5. El botón obtenido contiene a los hibridomas y el sobrenadante los anticuerpos. Si se desea, las células híbridas pueden ser colocadas en cultivo o congeladas.

Nota: Los sobrenadantes resultantes del cultivo celular, fueron utilizados para llevar a cabo la caracterización de los anticuerpos producidos.

Se determinó la clase y la subclase del anticuerpo producido por medio de ELISA de captura (Figura 8) utilizando anticuerpos anti gama globulinas de ratón marcados con peroxidasa*.

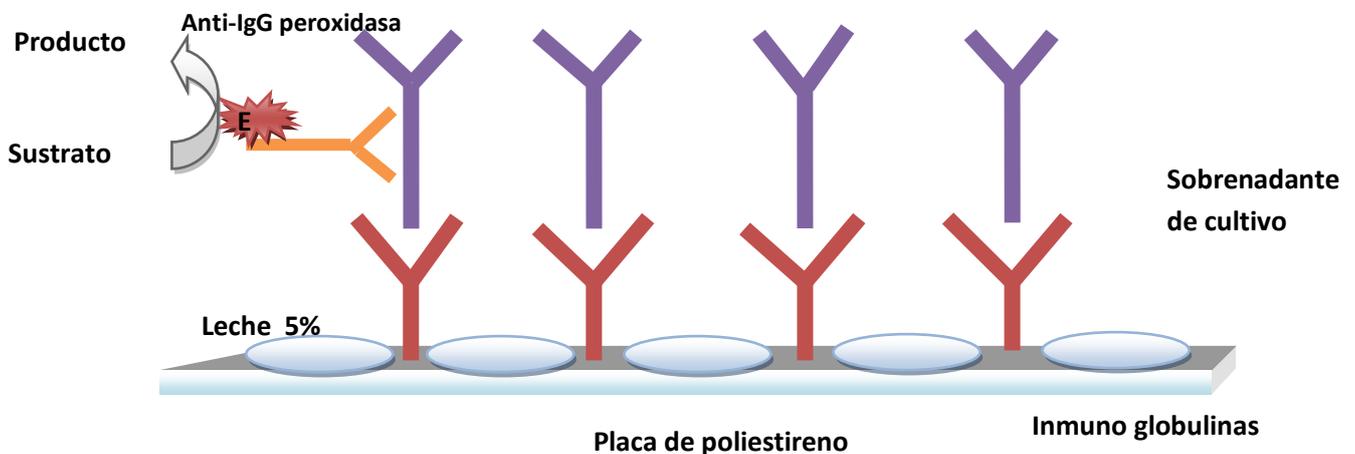


Figura 8. Representación de ELISA de captura.

La técnica que se siguió para realizar la ELISA de captura es la siguiente:

1. Se forró una placa de ELISA de 96 pozos con 100 μ L de anti-IgG de cada subclase IgG1, IgG2a, IgG2b e IgG3 en una concentración de 10 μ g/mL en solución amortiguadora de boratos, previamente tituladas y se incubó toda la noche a 4°C.

2. Posteriormente se realizaron tres lavados con 200µL de PBS –T (anexo 10.3) durante 5 minutos cada lavado.
3. Se adicionaron 200 µL de solución de bloque (anexo 10.4) por 30 minutos a 37° C.
4. Se repitieron los lavados del paso 2, se colocaron 100 µL del sobrenadante de cultivo de los AcMo por 2 horas a 37°C, se realizaron tres lavados como ya se indicó.
5. Se colocó el conjugado anti-IgG de ratón conjugado con peroxidasa* para el revelado de la reacción. Se agregaron 100 µL de solución cromógeno/sustrato para peroxidasa (anexo 10.5) y se dejó desarrollar la reacción temperatura ambiente durante 8 minutos.
6. Se detuvo la reacción con 100 µL/pozo se acido sulfúrico 2N (anexo 10.7), la absorbancia se leyó en un lector de ELISA a una longitud de onda de 490 nm.

Nota. Como testigo positivo se utilizó suero de ratón hiper inmune y como control negativo suero de ratón pre inmune y un blanco de PBS-T.

4.7 Concentración de anticuerpos

Una vez obtenido un volumen de 45 a 50 mL de sobrenadante de cultivo de los hibridomas, se procedió a concentrar dicho sobrenadante, se colocó el sobrenadante de cultivo en una membrana de diálisis y se mantuvo durante 5 horas exponiéndola a una corriente de aire con el fin de reducir el volumen del medio de cultivo y así concentrar los componentes presentes en el sobrenadante de cultivo. Ya reducido el volumen del sobrenadante a la mitad recolecta se mantuvo a -4 ° C para su posterior purificación.

4.8 Purificación de anticuerpos con proteína A

Se purificaron los AcMo 12D5E, 12D7E, 28C6F y 63F10C con el método propuesto por Medina et al, 2009. Se utilizó una columna de 5 cm de altura, montada con proteína A-sefarosa. Brevemente, una vez concentrado cada uno de los sobrenadantes de los AcMo, se incubaron a 4°C TN, en la columna de proteína A-sefarosa. Al día siguiente se colectaron alícuotas de 2 mL de PBS pH 7.2 (anexo 10.2) las cuales se leyeron a 280 nm para detectar la presencia de la proteína. Cuando la absorbancia fue de aproximadamente 0, se procedió a eluir los anticuerpos con glicina 0.1 M pH 2.5 en alícuotas de 2 mL que se siguieron espectrofotométricamente a 280 nm. Las fracciones en donde se encontró proteína, es decir donde la absorbancia obtenía era mayor o igual a 0.200, se juntaron y se dializaron contra PBS pH 7.2 (anexo 10.2). Posteriormente, se determinó la concentración de proteínas por método de Bradford en microplaca y se efectuó una electroforesis en gel de poliacrilamida al 11% (Bradford, 1976) para corroborar la pureza de las preparaciones.

Se realizó una segunda purificación por cromatografía de afinidad con proteína A, con columnas MILLIPORE; para ello se equilibró la columna con 10 mL de amortiguador A (incluido en Kit MILLIPORE) y se centrifugó a 1700 rpm por 5 min. El producto de la purificación anterior se filtro con microfiltro de 0.45 micrometros y se pasó por la columna de afinidad para después centrifugar a 1200 rpm por 10 min. Se lavó la columna dos veces con 5 mL de amortiguador buffer A y se centrifugó a 1700 rpm por 5 min con el fin de eluir proteínas presentes en la muestra que no se fijaron a la proteína A. Se realizó la lectura del amortiguador recolectado, leyéndolo espectrofotométricamente a 280 nm hasta obtener una absorbancia de cero. Se realizó la elusión con amortiguador B (Glicina pH 2.5) y se centrifugó a 1700 rpm por 5 min. Se leyó el producto de la elusión a 280 nm para verificar la presencia del anticuerpo. Se realizó la electroforesis en gel de poliacrilamida al 11%.

4.9 Cuantificación de proteínas por el método de Bradford

La curva estándar se realizó con una solución de albúmina al 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ obteniendo en un volumen final de 200 μL las concentraciones de 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 y 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Para ello, en una microplaca se colocó 40 μL de cada concentración de la curva realizada y se adicionó 160 μL de la dilución de reactivo de Bradford (Bio Rad) 1:5 en PBS. La muestra se preparó en un pozo de la microplaca colocando un volumen de 5 μL en 35 μL de PBS, se adicionaron 160 μL de reactivo de Bradford. Se incubó por 10 minutos a temperatura ambiente y se leyó la absorbancia a 595 nm. Se leyó la curva estándar y con las absorbancias obtenidas se construyó una grafica de regresión lineal en la cual se interpoló la absorbancia de la muestra, logrando así la determinación de la concentración de proteínas presentes en la muestras.

4.10 Inmunoelctrotransferencia (Western blot)

Se prepararon geles de poliacrilamida en gradiente de concentración del 5% al 22% (Medina et al., 2009).

1. Se lavaron las placas de vidrio con agua y alcohol al 70%.
2. Se colocó el juego de placas de vidrio y separadores en la cámara de llenado.
3. Se prepararon los geles correspondientes en un volumen previamente determinado en la cámara formadora de gradientes (Tabla 6).
4. Se enciende la bomba peristáltica una vez preparada la mezcla para el gel separador, que permite el llenado de la cámara con la mezcla, dejando un marco de 3 cm del borde superior y se deja polimerizar.
5. Se colocó el peine apropiado de acuerdo al número de muestras; se preparó la mezcla de soluciones para gel concentrador (Tabla 7), se agregó la mezcla sobre el gel separador tratando de no formar burbujas y se dejó polimerizar.
6. Se retiró el peine con cuidado y se lavaron los carriles con agua destilada, cuando la polimerización del gel concentrador haya terminado.

7. Se pusieron las placas en el electrodo y se colocaron dentro de la cámara de electroforesis, llenando la cámara inferior con amortiguador de electroforesis (Tris-glicina) (anexo 10.14). Se verificó la ausencia de burbujas en el espacio que se genera entre los vidrios en la parte inferior, entre el gel y la solución de electroforesis.

Tabla 6. Preparación de geles de gradiente de 5% al 22.5%*

Para→	13 mL	20m	13mL	20mL
Cantidad de ↓ (mL)		5%		22.5%
Agua destilada	7.3	11.2	0	0
Acrilamida/Bis-acrilamida	2.2	3.3	9.5	14.6
Tris pH 8.8	3.25	5	3.25	5
SDS 10%	.13	.2	.130	.2
Persulfato de amonio 10%	.08	.12	.08	.12
TEMED	.004	.006	.004	.006

Tabla 7. Preparación de gel concentrador*

Para→	1 mL	2 mL	3 mL	4 mL
Cantidad de ↓ (mL)				
Agua destilada	0.68	1.4	2.1	2.7
Acrilamida/Bis-acrilamida	0.17	0.33	0.50	0.67
Tris pH 6.8	0.13	0.25	0.38	0.50
SDS 10%	0.01	0.02	0.03	0.04
Persulfato de amonio 10%	0.01	0.02	0.03	0.04
TEMED	0.001	0.002	0.003	0.004

*ver anexo 10.9-10.14

4.10.1 Preparación del antígeno para inmunoelectrotransferencia

Para realizar la electroforesis el antígeno vacuna LEPTOCAN y *L.pomona* fueron sometidos a un proceso de tratamiento (Figura 9).

Se tomaron 200 μ L de vacuna LEPTOCAN que se centrifugaron a 12 ,000 rpm durante 30 minutos a 4 ° C, posterior a esto se decantó el sobrenadante recuperándolo en un nuevo tubo, y se desechó el botón resultante.

A 5 mL de medio EMJH con bacteria *L. pomona* concentrada se centrifugó a 12 000 rpm durante 30 minutos a 4 °C, posterior a esto se desechó el sobrenadante y se recuperó el botón, se realizaron los lavados con 200 μ L de solución de PBS (anexo 10.2) tres veces, con el fin de eliminar el medio de cultivo. El botón obtenido al final, fue re suspendido en 200 μ L de PBS. A ambas preparaciones se les determinó concentración de proteínas por el método de Bradford.

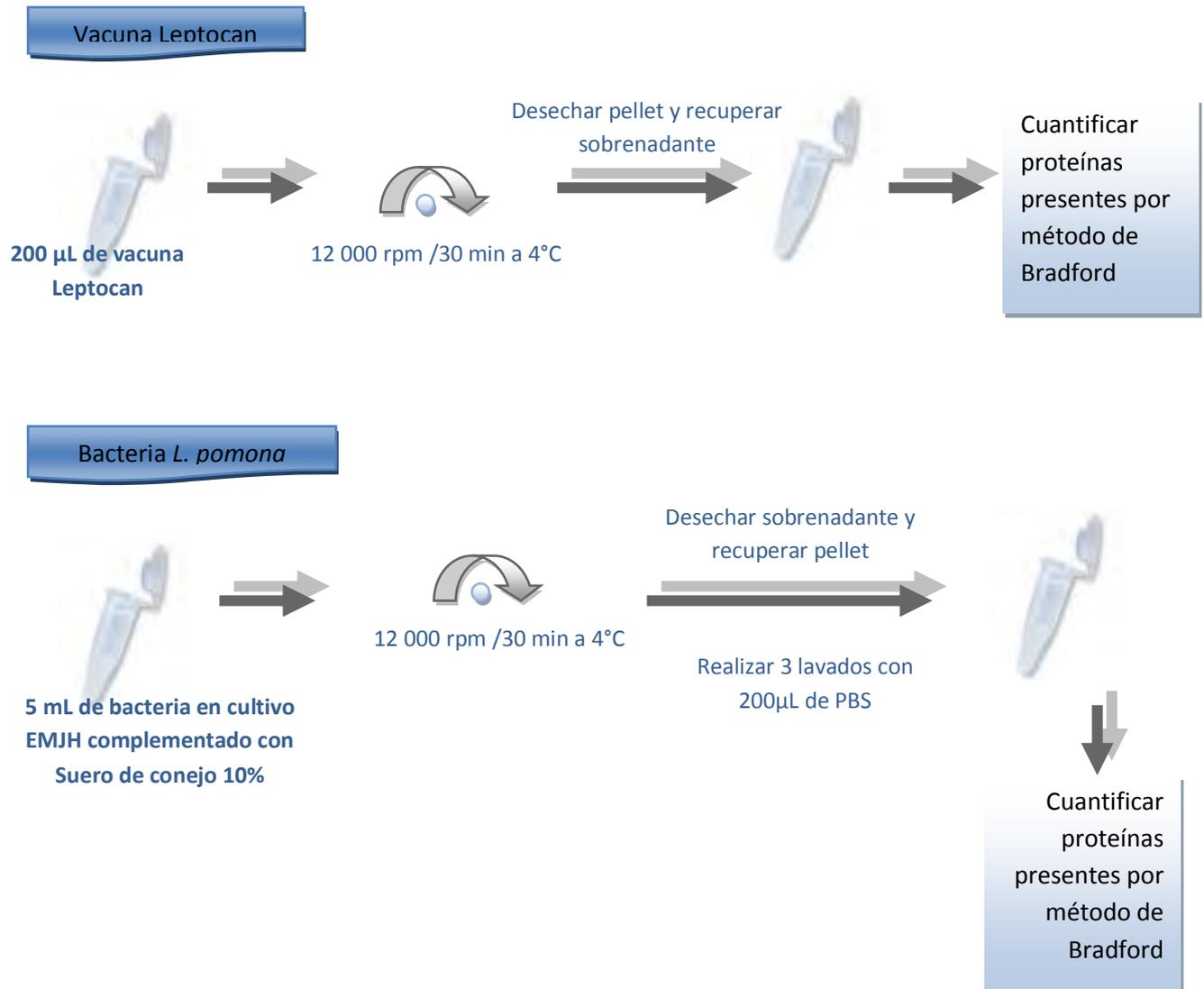


Figura 9. Preparación de antígenos para inmunoelectrotransferencia

Se prepararon las muestras mezclándolas 1:1 v/v con el amortiguador de muestra. Las muestras que se requerían condiciones reductoras se le añadieron 2- β -mercaptoetanol al amortiguador de muestra en una relación 1:10 v/v. Se hirvieron las muestras preparadas durante 15 min.

*ver anexo 10.9-10.14

4.10.2 Electrotransferencia

1. Se colocaron las muestras en su carril correspondiente, incluyendo en cada gel un carril con estándar de pesos moleculares.
2. Se llenó la cámara superior con amortiguador de electroforesis (Tris-glicina) (anexo 10. 14) recién preparado.
3. Se conectó la cámara a la fuente de poder y se ajustó la corriente a 150 volts constantes. Se mantuvo la electroforesis hasta que el frente iónico llegara a medio centímetro del final de la placa.
4. Al terminar la electroforesis se sacó el gel.

Preparación de la cámara y transferencia

1. Se Colocaron fibras Scotch* y papeles filtros Whatman* (grosor 0.16 mm) en un recipiente con suficiente amortiguador de transferencia 30 min antes de transferir.
1. Se cortó la membrana de nitrocelulosa (NC) de acuerdo al tamaño del gel (utilizando guantes) y colocó en otro recipiente que contenía amortiguador de transferencia.
2. Se colocaron dos fibras Scotch en un cartucho para electrotransferencia, sobre las cuales se colocaron dos porciones de papel filtro teniendo cuidado de que no queden burbujas atrapadas entre los papeles; después se colocó el gel y sobre éste la membrana de NC.
3. Con un lápiz se marcó el frente de electroforesis del gel, sobre el papel de NC y señalar el carril número uno de acuerdo a la colocación de las muestras, se colocaron otros dos papeles filtros sobre la NC y otras dos fibras. Se cerró el cassette y se insertó en el contenedor.
4. Se colocó el contenedor en la cámara y se llenó con el amortiguador de transferencia, se tapó y se conectó los electrodos de tal manera que el ánodo (-) quedara del lado del gel y el cátodo (+) del lado de la NC; se

conectó a la fuente de poder y se transfirió durante una hora a 100 volts, cuidando que la temperatura del líquido no se elevará a más de 60° C.

5. Al terminar la transferencia se tomó la membrana de NC con guantes y colocó en un recipiente con rojo de Ponceau (anexo 10.19), para verificar que las proteínas fueron transferidas a la NC; esto se observó con la aparición de bandas de color rojo, momento en el cual se quitó el exceso de colorante y se lavó con agua destilada, aproximadamente de 4 a 5 veces.
6. Se cortó el pedazo de membrana donde se encontraron los marcadores de peso molecular, se dejó secar y guardó para su uso posterior.

Para la reacción inmunoenzimática de la inmunoelectrotransferencia se procedió de la siguiente manera:

1. Se colocó la membrana de NC en un recipiente que contenga 30-50 mL de solución de bloque I (anexo 10.4) y se incubó 2 h a temperatura ambiente en agitación continua.
2. Se eliminó el exceso de solución de bloqueo por decantación y se lavó 3 veces con PBS-T (anexo 10.3) de 5 min cada uno en agitación continua.

Nota: La membrana de NC puede ser procesada de inmediato para la reacción inmunoenzimática o se puede guardar entre dos papeles filtro humedecidos con PBS a -20° C.

3. Se cortó la NC en tiras de 0.3 mm, se incubaron a 4° C durante 12 h, cada tira con 500 µL de sobrenadante de cultivo de los hibridomas. Se eliminó el exceso y se lavó como en el paso 2.
4. Posteriormente se agregó el conjugado anti-IgG de ratón-peroxidasa en la dilución apropiada con PBS-T. Se incubó durante 2 h a temperatura ambiente con agitación continua.
5. Se procedió como en paso 4.

6. Por último se agregó la solución cromógeno/sustrato peroxidasa para inmunoelectrotransferencia (anexo 10.8) y se esperó hasta que aparecieran las bandas del revelado; después se enjuagó con agua y se dejó secar.
7. La solución se detuvo después de 15 minutos con agua bidestilada.

4.11 Inmunofluorescencia Indirecta

Para la IFI, se siguió el método descrito de acuerdo a la técnica de Appassakij et al., 1995 Carpio, 2004 y Agudelo et al., 2006.

1. A 5 ml de cultivo bacteriano de *L. icterohemorrhagiae* fue centrifugado a 12 000 rpm durante 30 minutos, el sedimento fue resuspendido en 100 μ L de solución de PBS (anexo 10.2). Se colocaron 10 μ L de la suspensión en cada pozo de un portaobjetos para inmunofluorescencia.
2. Posteriormente se dejaron secar a 37° C y se fijaron en acetona a – 70 ° C durante 30 minutos.
3. Se adicionó 10 μ L de los siguientes AcMo, 12D5E, 12D7E, 63F10C y 28C6F; en una concentración de 10 μ L / mL y se incubó a 4° C TN, en cámara húmeda.
4. Las laminillas fueron lavadas 3 veces en PBS filtrado durante 5 minutos.
5. Se colocaron 10 μ L de conjugado anti-IgG de ratón, marcado con fluoresceína diluido en PBS 1:50 y se incubó durante 2 horas a 37 ° C en cámara húmeda.
6. Se procedió como paso 4.
7. Se colocaron 10 μ L de colorante de Hoechst, que se une específicamente al DNA y se incubó durante 30 minutos a temperatura ambiente.
8. Se procedió como paso 4.
9. Se realizó el montaje de las laminillas con PBS y glicerol (1:1) y se mantuvieron en cámara húmeda en oscuridad y fueron observadas en un microscopio para epifluorescencia

4. 12 ELISA indirecto para determinar sensibilidad de los AcMo

Se realizó un ELISA indirecto con el fin de determinar la cantidad de bacterias de *Leptospira* que pueden detectar los AcMo producidos.

1. Se utilizó una suspensión de *Leptospira interrogans sr. Icterohemorrhagica*, estandarizada a 1×10^8 bacterias (equivalente al tubo de 0.5 de nefelómetro de MF) en solución amortiguadora de carbonatos (anexo 10.1). A partir de esta solución se realizaron diluciones dobles seriadas hasta llegar a 97 bacterias por pozo para la sensibilizar la placa.
2. Se incubó la placa de ELISA a 4° C durante toda la noche.
3. Se eliminó la solución vertiendo el contenido de los pozos y se secó el exceso sobre una gasa.
4. La placa se lavó 3 veces con 200 μ L/pozo con la PBS-T (anexo 10.3), durante 5 min cada lavado; entre cada uno se sigue el paso 3.
5. Se agregó a la placa 200 μ L/pozo la solución de bloqueo (anexo 10. 4) y se incubó durante 30 minutos a 37° C.
6. Se repitieron los pasos 3 y 4.
7. Se agregaron 100 μ L de AcMo en una concentración de 10 μ g/mL en PBS y los controles (suero hiper inmune y suero prei nmune) a la misma condición y se incubaron 2 horas a 37° C.
8. Se repitieron los pasos 3 y 4.
9. En cada pozo se colocaron 100 μ L del conjugado anti-IgG de ratón-peroxidasa, a una dilución previamente titulada en PBS-T.
10. Se incubó a 37° C durante 2 horas y se procedió como en los pasos 3 y 4.
11. En cada pozo se colocaron 100 μ L de la solución de cromógeno/sustrato peroxidasa (anexo 10.5).
12. Se dejar incubar durante 30 min.

13. Se detuvo la reacción enzimática, añadiendo 100 μL /pozo de ácido sulfúrico 2N (anexo 10.7).
14. Se leyó la absorbancia en un lector de ELISA a 490 nm para peroxidasa/orto-fenilendiamina.

5. Resultados

5.1 Inmunización

Se evaluó la respuesta inmune desarrollada por los diez ratones Balb/c después de ser inmunizados con vacuna LEPTOCAN 25 µg, dos antígenos, uno fue la vacuna LEPTOCAN y el otro, *Leptospira interrogans ser. Interrogans*, ambos a una concentración de 5µg/mL en dos ELISA indirectos.

Como podemos observar en la Figura 10, el reconocimiento antígeno-anticuerpo que se observa entre los anticuerpos policlonales producidos después de tres inmunizaciones, y *L. interrogans sv. Icterohaemorrhagiae* preparada como antígeno total, presenta mayor reconocimiento que con el uso del antígeno de vacuna LEPTOCAN (Figura 11).

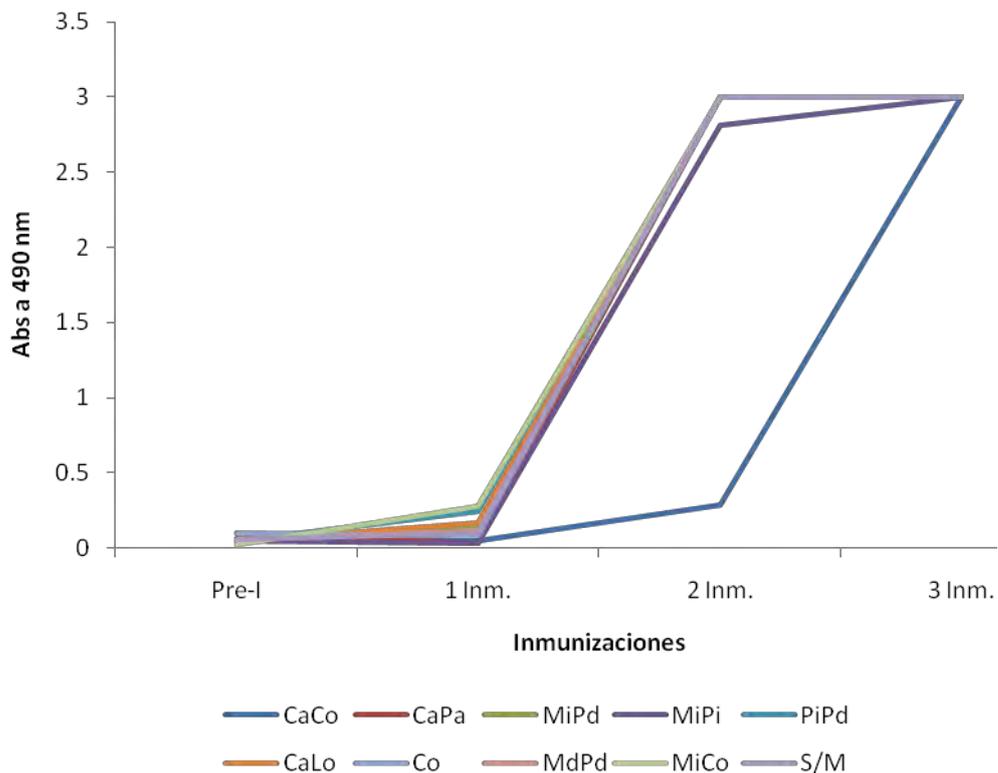


Figura 10. Evaluación de la respuesta inmune humoral de los diez ratones después de tres inmunizaciones con antígeno vacunal. Utilizando como antígeno para la prueba de ELISA *Leptospira interrogans ser. Interrogans* a 5µg/mL y los sueros de ratón a diluciones 1:1000.

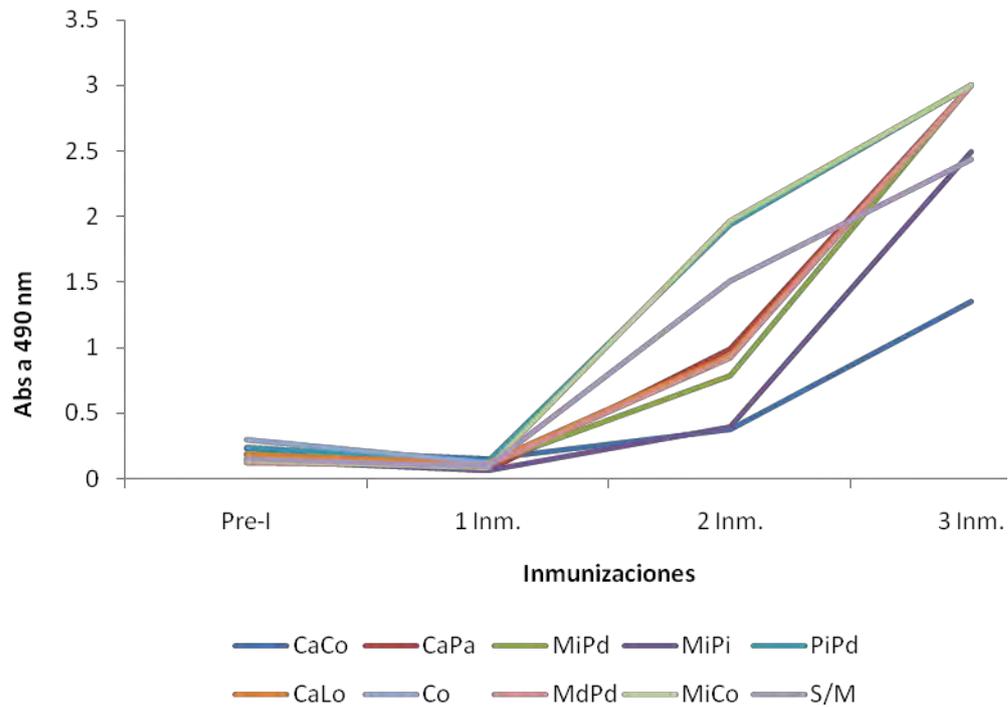


Figura 11. Evaluación de la respuesta humoral de los diez ratones después de tres inmunizaciones, con antígeno vacunal. Utilizando como antígeno para la prueba de ELISA, vacuna LEPTOCAN en una concentración de 5µg/mL y los sueros de los ratones diluidos 1:1000.

5.2 Titulación de anticuerpos

Se determinó el título de los sueros de los diez ratones inmunizados mediante ELISA indirecta con los sueros obtenidos después de la tercera inmunización.

Al determinar el título de los anticuerpos anti *Leptospira* presentes en los sueros de ratones, se observó que con la vacuna LEPTOCAN como inmunógeno, se obtuvieron títulos de anticuerpos de alrededor de 1:16,000 (Figuras 12 y 13).

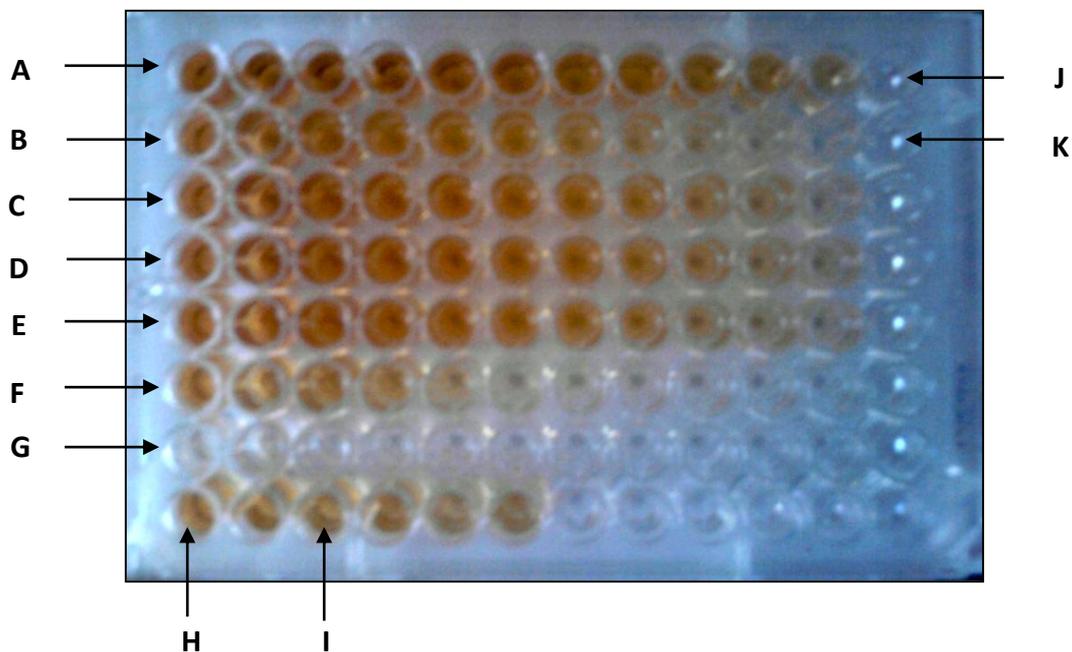


Figura 12 .Placa de ELISA de la titulación de sueros de ratón (respuesta humoral), partiendo en una dilución 1: 1000. Donde A) suero de MiCo B) suero de CaPa C) suero de PiPd D) suero de S/M E) suero de MdPd F) suero de G) suero pre- Inmune H) Control positivo suero hiperinmune, I) Control positivo: suero directo, J) Control negativo pozo sin antígeno y K) Control negativo: solución de PBS.

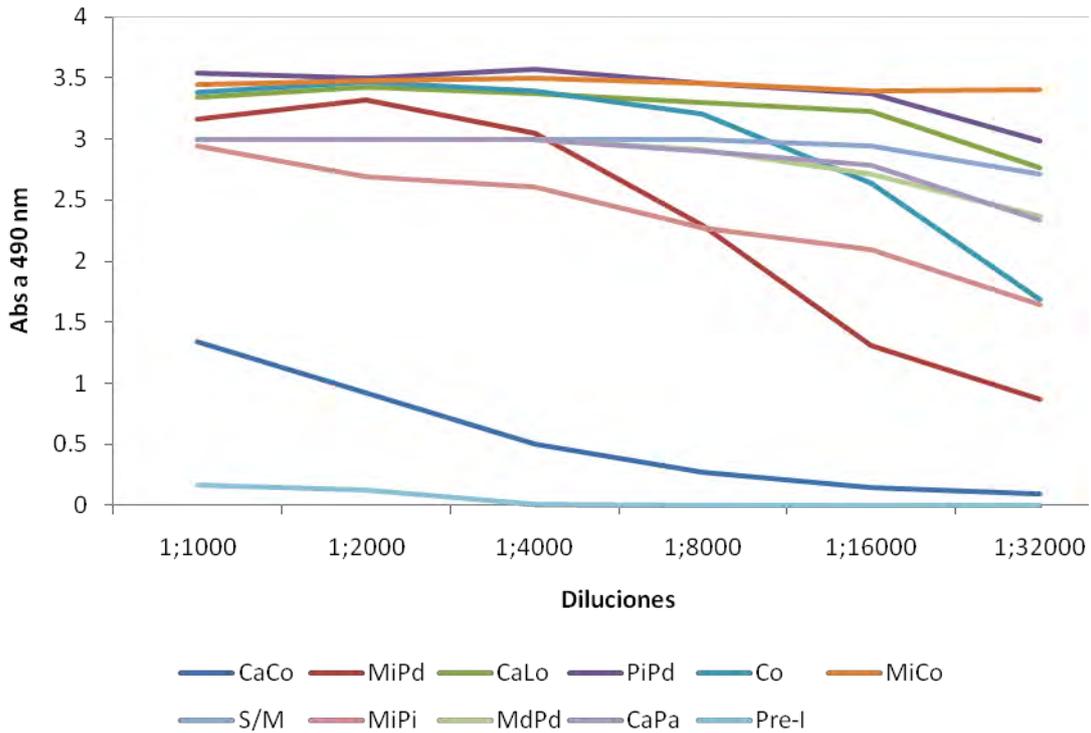


Figura 13. Titulación de sueros de ratón después de tres inmunizaciones con la vacuna LEPTOCAN, por medio de ELISA indirecta utilizando antígeno de vacuna a 5µg/mL y cada uno de los sueros del grupo de los diez ratones a partir de diluciones 1:1,000.

5.3 Fusión celular y selección de hibridomas positivos

En la Figura 14 se observan las células de mieloma X63Ag8.653 en crecimiento exponencial en medio RPMI complementado al 12 % con SFB, previo a la fusión celular, con las características requeridas tales como una forma definida con una delgada circunferencia que demuestra la presencia de la membrana celular.

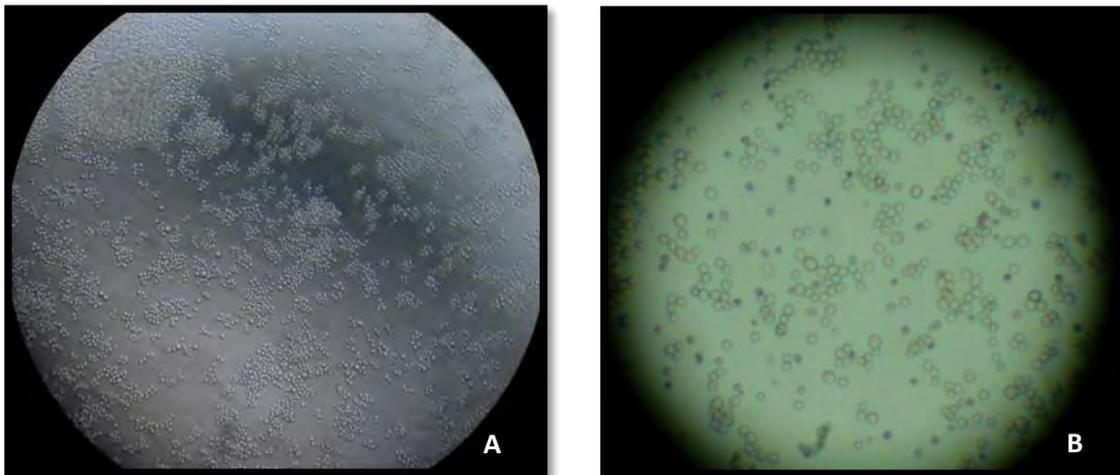


Figura 14. Células de mieloma X63Ag8.653 en cultivo celular con medio RPMI-1640 complementado con SFB 12% A) 40X y B) 100X

Se continuó con la fusión celular, para lo cual las suspensiones celulares se sembraron en seis placas de cultivo de 96 pozos, obteniendo 29 hibridomas considerados como positivos (Figura 15).

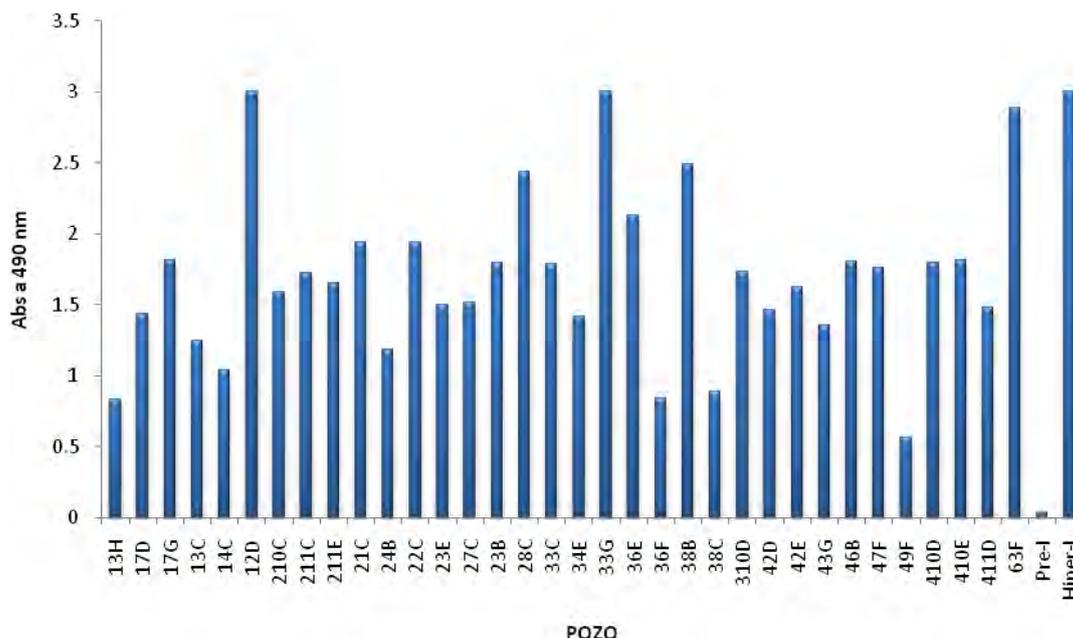


Figura 15. Valores de absorbancias del sobrenadante de los hibridomas evaluados por ELISA indirecta, para la selección de células productoras de anticuerpos específicos. Utilizando como antígeno vacuna LEPTOCAN a 5 µg/mL y sobrenadante de cultivo directo.

Como observamos en la Tabla 8, al momento de la fusión se tuvieron 0.42×10^6 células de mieloma y 1.68×10^6 células de bazo; esto es, una proporción de células de 5:1. Al sembrar 6 microplacas de cultivo, la eficiencia de la fusión obtenida fue de 4.6%.

Tabla 8. Resumen de resultados de fusión

	RESULTADOS
Título de Ac anti-leptospira al fusionar	1:16000
Número de células de bazo	1.68×10^6
Número de células de mieloma X63Ag8.653	0.42×10^6
Relación células de bazo: mieloma	5:1
Número de placas sembradas	6
Eficiencia de fusión	4.6 %
Número de hibridomas positivos a <i>Leptospira</i>	34

5.4 Clonación celular

La técnica de clonación celular por dilución limitada garantiza el poder obtener una sola célula que al proliferar forme una colonia (Figura 16), con las mismas características que la célula de origen tanto genotípicamente como fenotípicamente.

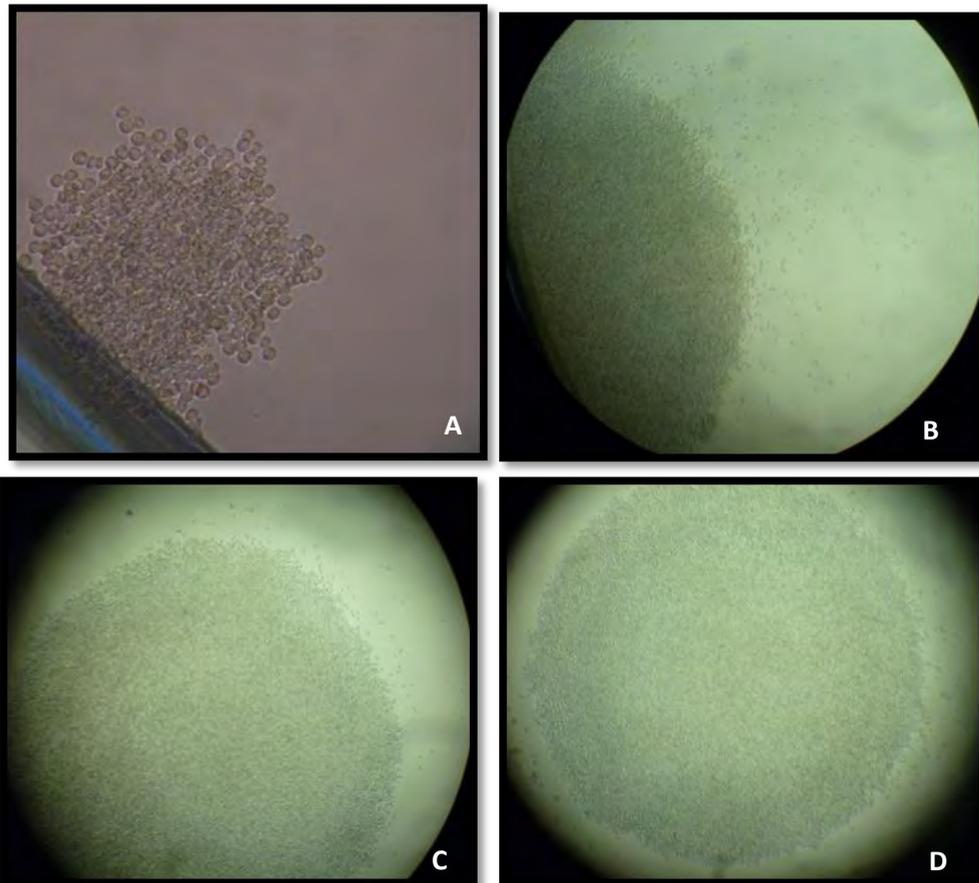


Figura 16. Colonias de hibridomas. A) Colonia de hibridomas después de 4 días de división 100x, B) colonia de hibridomas después de 8 días de división, C) Colonias de hibridomas después de 12 días de división, D) Colonias de hibridomas después de 15 días de división, observadas en microscopio invertido a 40x.

De la fusión celular se obtuvieron seis hibridomas, que al ser clonados para garantizar la estabilidad de estas células, dio como resultado nueve clonas productoras de anticuerpos específicos (Tabla 9) las cuales continuaron con su estabilidad a lo largo de los ensayos realizados.

Tabla 9. Híbridos originales y los grupos de clonas obtenidos

Híbridos	Clonas obtenidas	AcMo
1.2D	7E	1.2D.7E
	5E	1.2D.5E
	8G	1.2D.8G
1.6F	9G	1.6F.9G
	6B	1.6F.6B
1.3D	2G	1.3D.2G
2.1H	4D	2.1H.4D
2.8C	6F	2.8C.6F
6.3F	10C	6.3F.10C

5.5. Determinación del isotipo

Mediante ELISA de captura se determinó la subclase de Inmunoglobulina G, de los nueve AcMo obtenidos, utilizando las subclases IgG1, IgG2a, IgG2b e IgG3 (Figura 17).

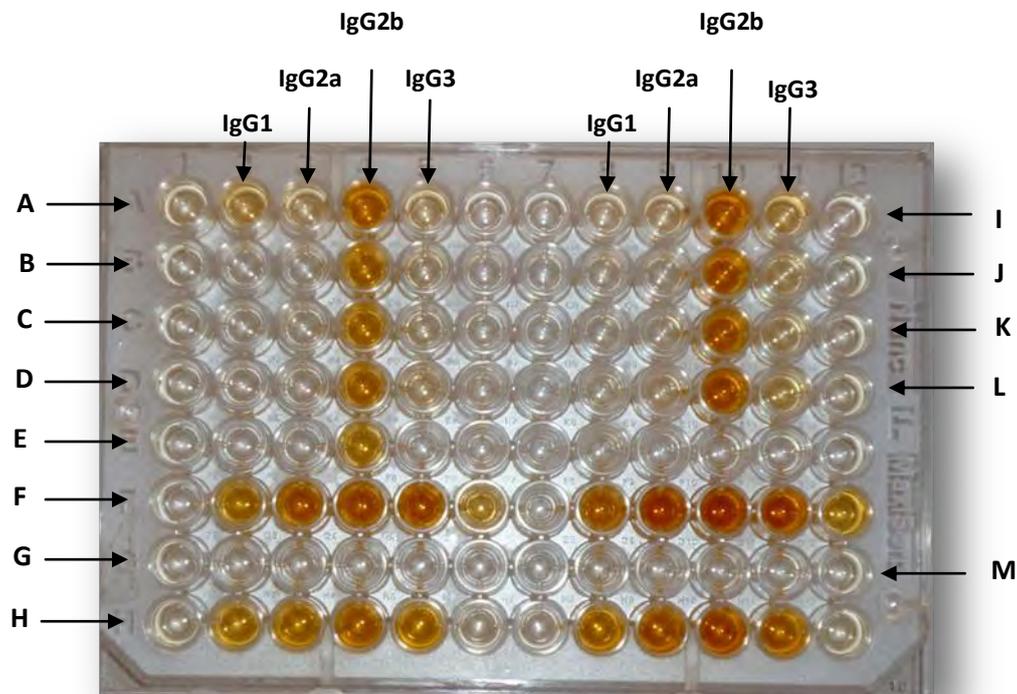


Figura 17. Distribución de ELISA de captura para la determinación de subclases, utilizando sobrenadantes de cultivo de las clonas. Donde A) 1.2D.7E, B) 1.2D.5E, C) 1.2D.8G, D) 1.6F.9G, E) 1.6F.6B, F) control positivo: suero hiper- inmune, G) control negativo: solución de PBS, H) control positivo: suero pre- inmune I) 1.3D.2G, J) 2.1H.4D, K) 2.8C.6F, L) 6.F3.10C y M) control negativo: medio de cultivo.

En el ensayo de ELISA de captura se observa la reacción indirecta entre el anticuerpo monoclonal unido a la subclase IgG2b, que al leerse en espectrofotométricamente a 490 nm se obtuvieron las absorbancias que se muestran graficadas en Figura 18.

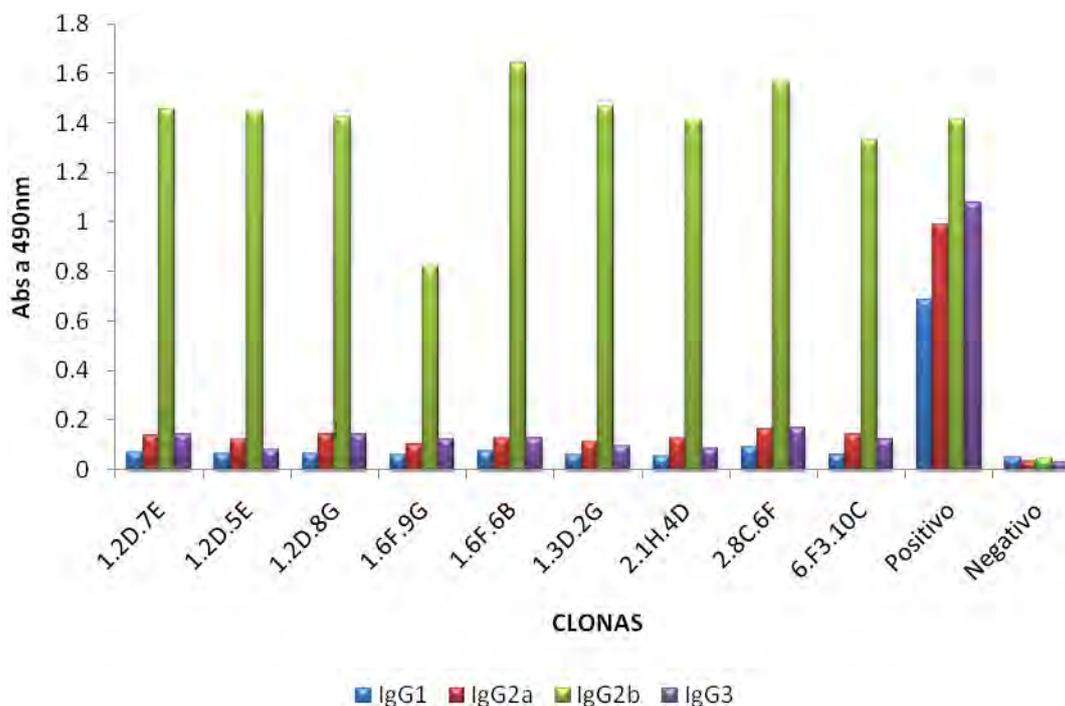


Figura 18. Valores de absorbancias obtenidas para la caracterización de subclases de IgG de las clonas. Se evaluó con un ELISA de captura utilizando las subclases de las inmunoglobulinas IgG1, IgG2a, IgG2b e IgG3 y el sobrenadante de cultivo directo de los nueve AcMo, como control positivo suero de ratón pre- inmune y control negativo solución de PBS.

Todos los anticuerpos corresponden a la clase IgG y la subclase IgG2b, datos resumidos en la Tabla 10.

Tabla 10. Isotipos de los anticuerpos producidos por las diferentes clonas

clona	Clase	Subclase
1.2D.7E	IgG	IgG2b
1.2D.5E	IgG	IgG2b
1.2D.8G	IgG	IgG2b
1.6F.9G	IgG	IgG2b
1.6F.6B	IgG	IgG2b
1.3D.2G	IgG	IgG2b
2.1H.4D	IgG	IgG2b
2.8C.6F	IgG	IgG2b
6.F3.10C	IgG	IgG2b

5.6 Concentración, purificación de anticuerpos y determinación de proteínas por el método de Bradford

Una vez determinado el isoptipo de los AcMo, se seleccionaron los siguientes cuatro AcMo 1.2D.E5, 1.2D.7E, 2.8C.6F y 6F3.10C para llevar a cabo la concentración, la purificación y la determinación de proteínas. Se procedió a concentrar los sobrenadantes de cultivo reduciendo el volumen a la mitad del volumen inicial y se determinó la concentración de las proteínas presentes con el método de Bradford. Se obtuvieron concentraciones entre 100 y 600 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y un total de AcMo de 2 a 14 gramos (Tabla 11).

Los datos de volumen y del total de AcMo obtenidos evidencia la diferencia de crecimiento entre las células productoras de los cuatro AcMo utilizados, así como la variabilidad de secreción de los AcMo.

Tabla 11. Resultados del cultivo y concentración de los AcMo anti-Leptospira

Clona	Volumen de sobrenadante antes de concentrar (mL)	Volumen de sobrenadante después de concentrar (mL)	Concentración de proteínas en $\mu\text{g}/\text{mL}$	Total de AcMo Obtenido en gramos
1.2D.5E	50	25	550.8 $\mu\text{g}/\text{mL}$	13.77
1.2D.7E	35	12	328.8 $\mu\text{g}/\text{mL}$	3.94
2.8C.6F	50	22	364.6 $\mu\text{g}/\text{mL}$	8.02
6.F3.10C	50	18	144.7 $\mu\text{g}/\text{mL}$	2.60

En la Figura 19, se muestran los perfiles de elución representativo de las purificaciones de los AcMo por cromatografía de afinidad. Se utilizaron las fracciones recolectadas en un volumen entre 38 y 40 mL, que es donde se eluyó el AcMo.

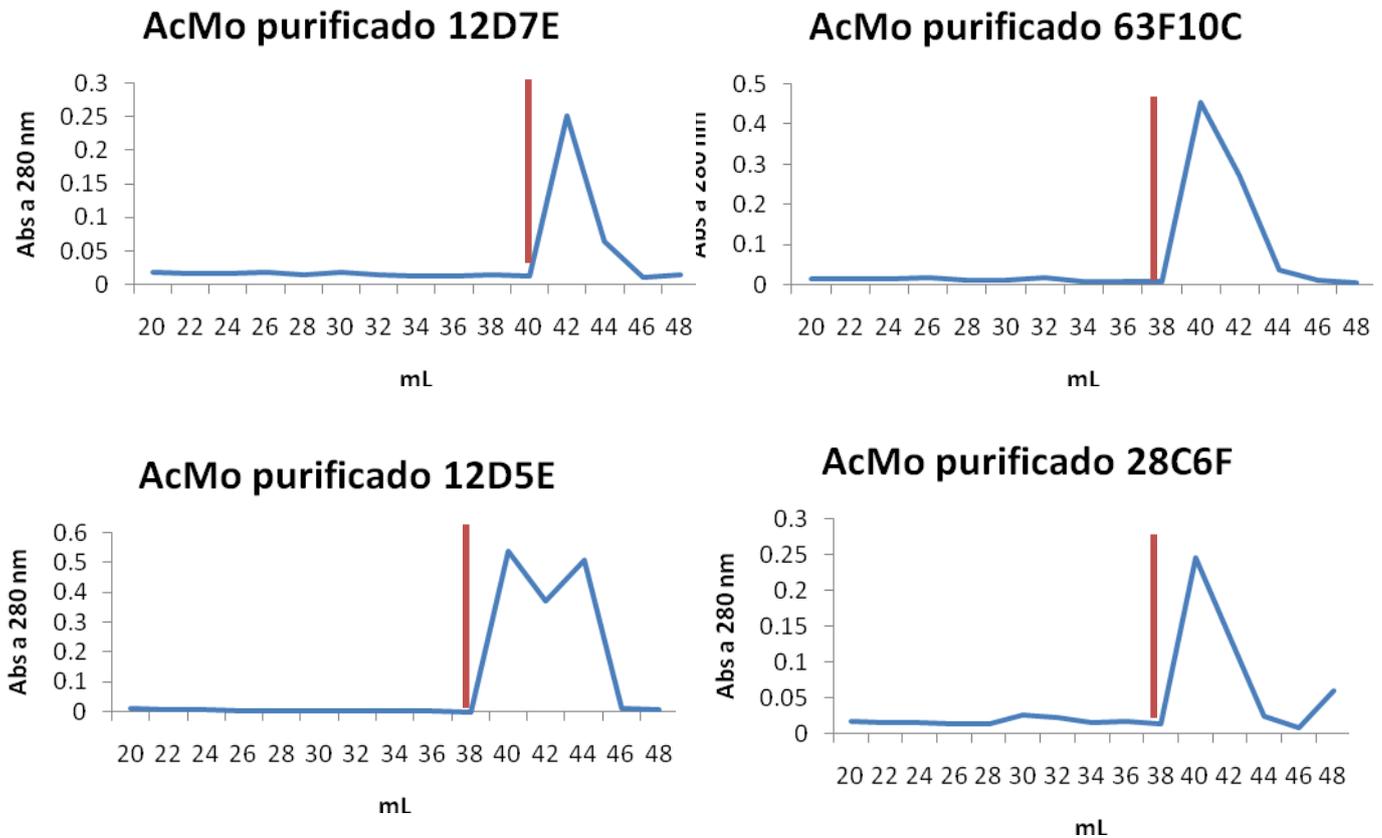


Figura 19. Purificación de los AcMs anti- Leptospira. Se muestra el perfil de elución de la purificación de los AcMo con proteína A-sefarosa con columna no comercial. La línea vertical en cada grafico indica el punto donde se inicio la elución de los anticuerpos.

Para verificar la purificación de los AcMo con el uso de columna casera, se realizó un corrimiento en gel de poliacrilamida al 11% con y sin condiciones reductoras. En la Figura 20 se puede observar la presencia de proteínas contaminantes de un peso molecular aproximado de 40 KDa, por lo que se decidió realizar una nueva purificación basada en los mismos fundamentos pero con columna comercial MILLIPOR. De igual manera se preparó un gel de poliacrilamida con las mismas condiciones (Figura21) en la cual es evidente que se eliminó la contaminación presente en los AcMo.

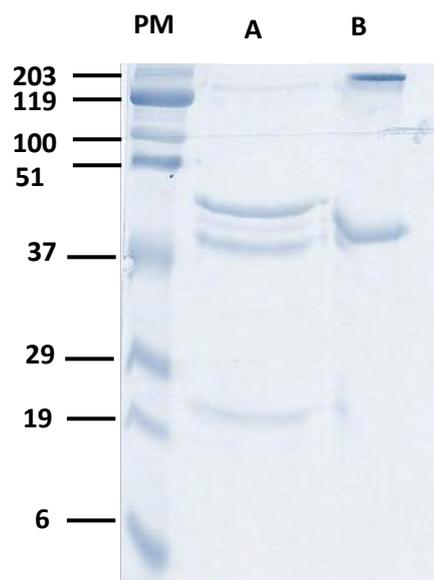


Figura 20. Gel de poliacrilamida al 11% de purificación por cromatografía de afinidad con columna casera. A) AcMo 10 μ g con β - mercapto etanol y B) AcMo 10 μ g sin agente reductor.

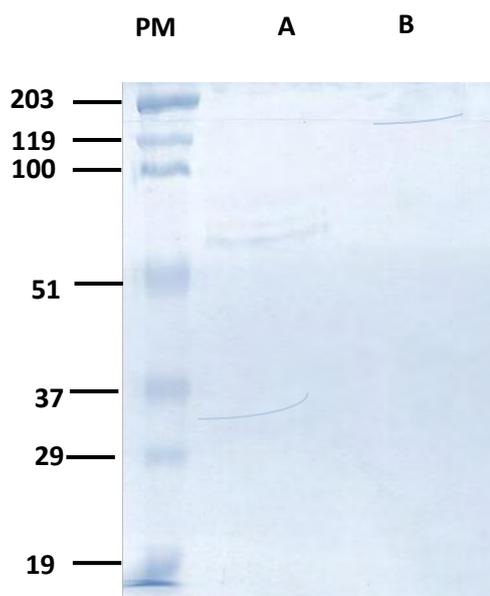


Figura 21. Gel de poliacrilamida al 11% de purificación por cromatografía de afinidad con columna comercial MILLIPOR. A) AcMo 10 μ g con β - mercapto etanol y B) AcMo 10 μ g sin agente reductor.

5.7 Caracterización inmunoquímica

5.7.1 Reactividad de los AcMo con diferentes serovariedades de *Leptospira interrogans*

La reactividad de los AcMo 1.2D.E5, 1.2D.7E, 1.2D.8G, 1.6F.9G, 1.6F.6B, 1.3D.2G, 2.1H.4D, 2.8C.6F y 6F3.10C se confirmó mediante ELISA indirecta, utilizando como antígeno diferentes serovariedades de *Leptospira*. Se puede observar la variación del reconocimiento de los nueve AcMo.

Primeramente en la Figura 22, se utilizaron antígenos correspondientes a las serovariedades incluidas en la preparación vacunal, es decir, las serovariedades que se utilizarán para la inmunización. Como se observa, existe reconocimiento antígeno-anticuerpo que da valores de absorbancia superiores a 0.5, lo que significa especificidad del AcMo 13D2G hacia la serovariedad *L. icterohaemorrhagiae*, seguido por *L. tarassovi* y *L. grippityphosa*, mientras que el AcMo 2.8C.6F reconoce a las serovariedades *L. icterohaemorrhagiae*, *L. pomona*, *L. tarassovi*, *L. grippityphosa*, *L. wolffi* y *L. canicola*, sin evidenciar alguna especificidad a estas seis serovariedades.

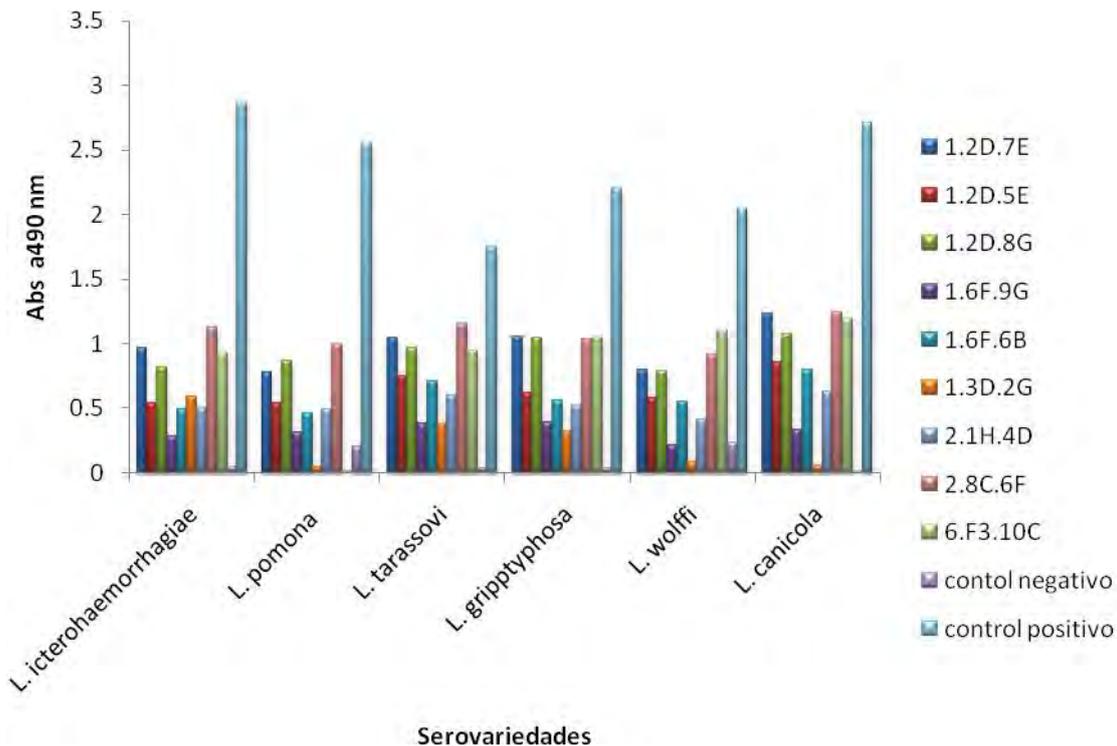


Figura 22. Valores de absorbancia presentados por el reconocimiento de los nueve AcMo con del las serovariedades de *Leptospira* (*L. icterohaemorrhagiae*, *L. pomona*, *L. tarassovi*, *L. grippityphosa*, *L. wolffi* y *L. canicola*); presentes en la vacuna LEPTOCAN utilizada para la inmunización. Se realizó un ELISA indirecto utilizando AcMo a una concentración de 10µg/ mL, como control positivo suero hiperinmune de ratón 1:1000 y control negativo solución de PBS.

Al utilizar antígenos de serovariedades distintas a las implicadas en la inmunización, la respuesta antígeno-anticuerpo se vio disminuida, presentando en los ELISA indirectos valores de absorbancia menores a 0.5, a pesar de lo cual hubo reconocimiento mayor en comparación con el control negativo. Se evidenció el reconocimiento del AcMo 1.2D.5E solo hacia la serovariedad *L. cynopteri*, lo cual podría indicar una posible especificidad de este anticuerpo a tal serovariedad. Además de que los nueve AcMo producidos reconocen un epítipo común entre las bacterias de género *Leptospira* saprofita y las patógenas, al encontrar el reconocimiento de los AcMo hacia la serovariedad *L. biflexa* que no es patógena para el humano y animales.

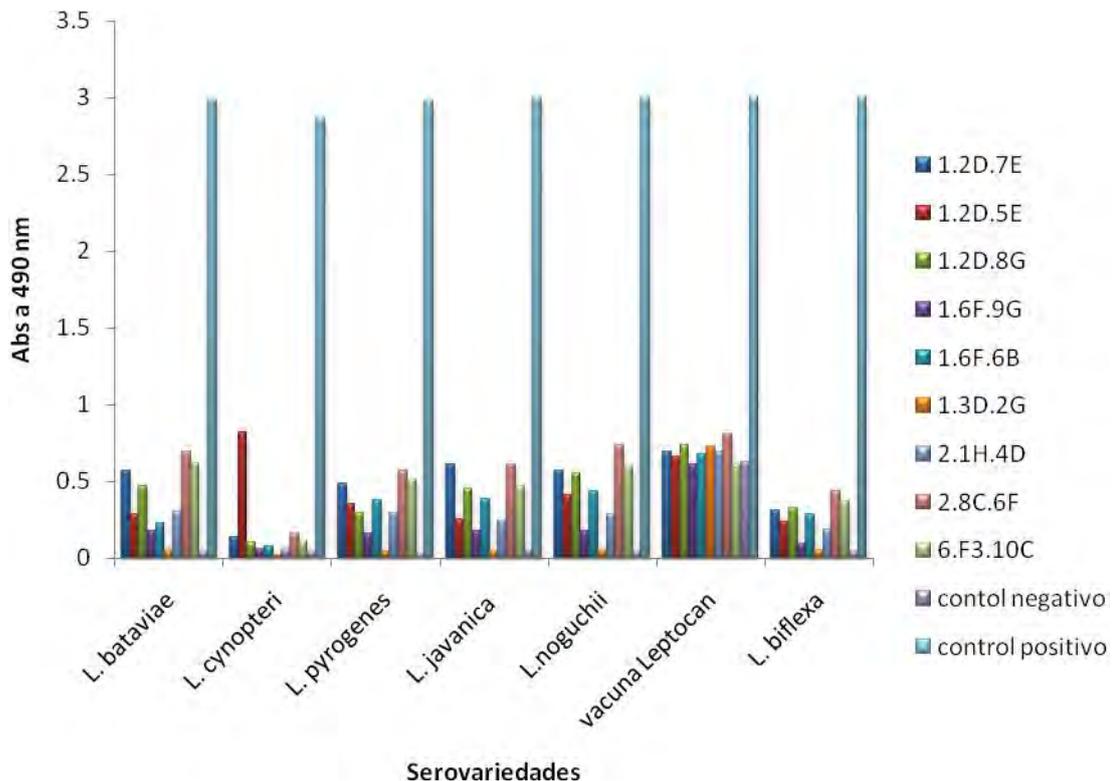
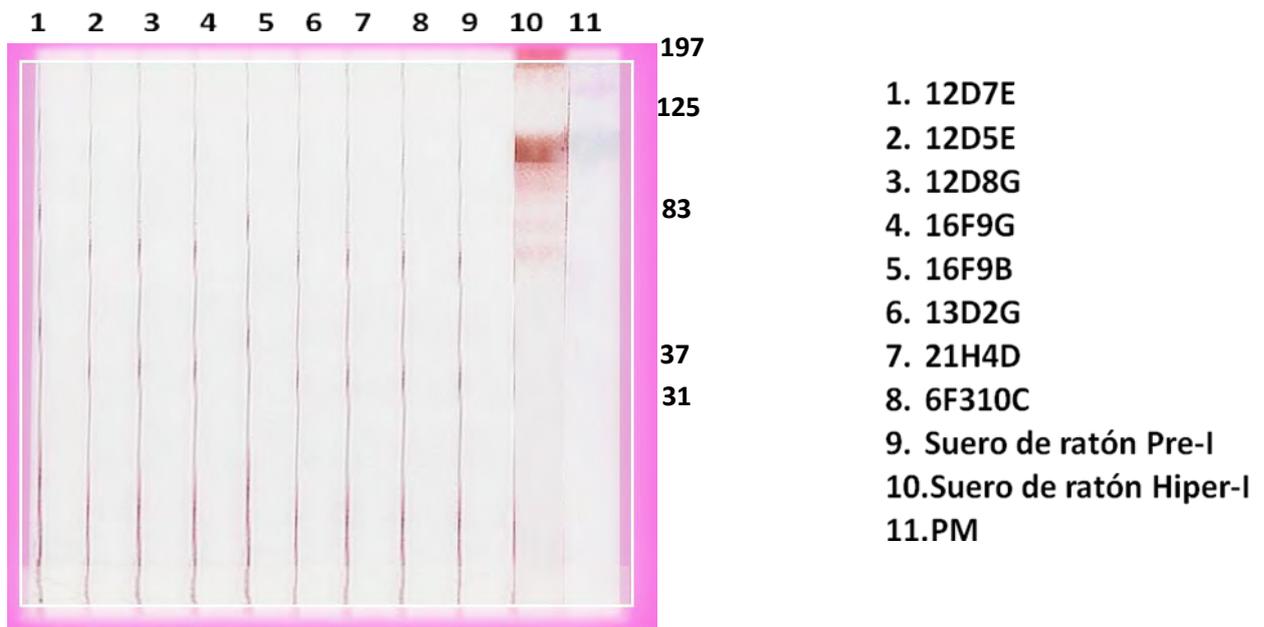


Figura 23. Valores de absorbancia presentados por el reconocimiento de los nueve AcMo con serovariedades de *Leptospira*, (*L. bataviae*, *L. cynopteri*, *L. pirogenes*, *L. javanica*, *L. noguchii* y *L. biflexa*) y vacuna LEPTOCAN. Se realiza un ELISA indirecta utilizando AcMo a una concentración de 10µg/ mL, como control positivo suero hiperinmune de ratón 1:1000 y control negativo solución de PBS.

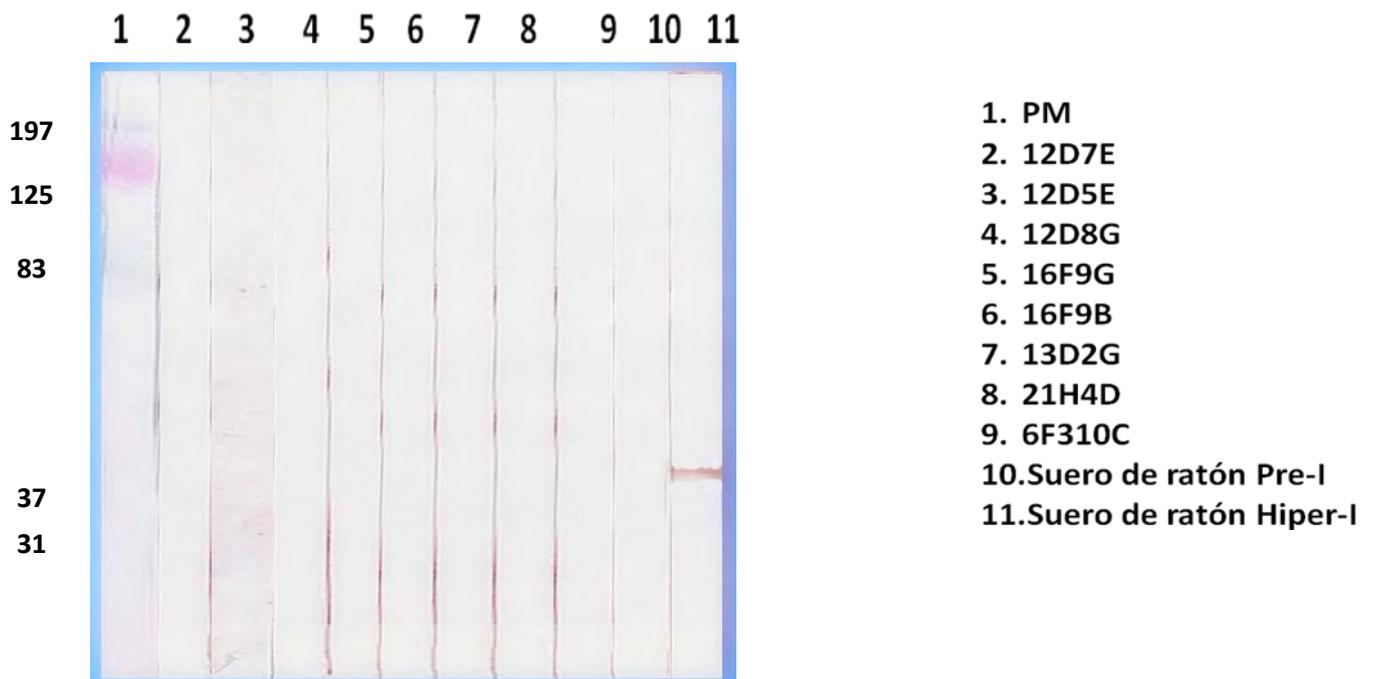
5.7.2 Inmunoelctrotransferencia

Demostrada la reactividad de los AcMo, se pretendió evidenciar el epítipo de reconocimiento, o la presencia de una o varias proteínas antigénicas, para lo que se llevo a cabo la técnica de inmunoelctrotransferencia con antígenos de bacteria tratados para la liberación de las proteínas presentes en la membrana celular, en condiciones desnaturalizantes y con geles de poliacrilamida en gradiente de densidad para asegurar la separación de dichas proteínas.

La Figura 24 muestra la inmunoelctrotransferencia realizada. Se observa que no hubo reconocimiento de los AcMo hacia las proteínas de las bacterias expuestas con el tratamiento realizado.



(A)



(B)

Figura 24. Inmunoelctrotransferencia de antígenos de *L. icterohemorrhagiae* (A) y vacuna LEPTOCAN (B) con sobrenadantes de cultivo concentrado, utilizando como control negativo solución de PBS y control positivo suero de ratón hiper-inmune.

5.7.3 Inmunofluorescencia indirecta

Al procesar los AcMo mediante IFI con cultivo de *L. icterohaemorrhagiae* fijadas con acetona fría, se observó que todos los anticuerpos fueron capaces de reconocer a la *Leptospira*, haciendo suponer que el reconocimiento de los anticuerpos estuvo dirigido hacia componentes de la membrana externa de las bacterias. Al utilizar el colorante de Hoects, el cual se intercala en el material genético que está distribuido a todo lo largo de la bacteria, se demuestra que en la preparación estaban presentes las bacterias.

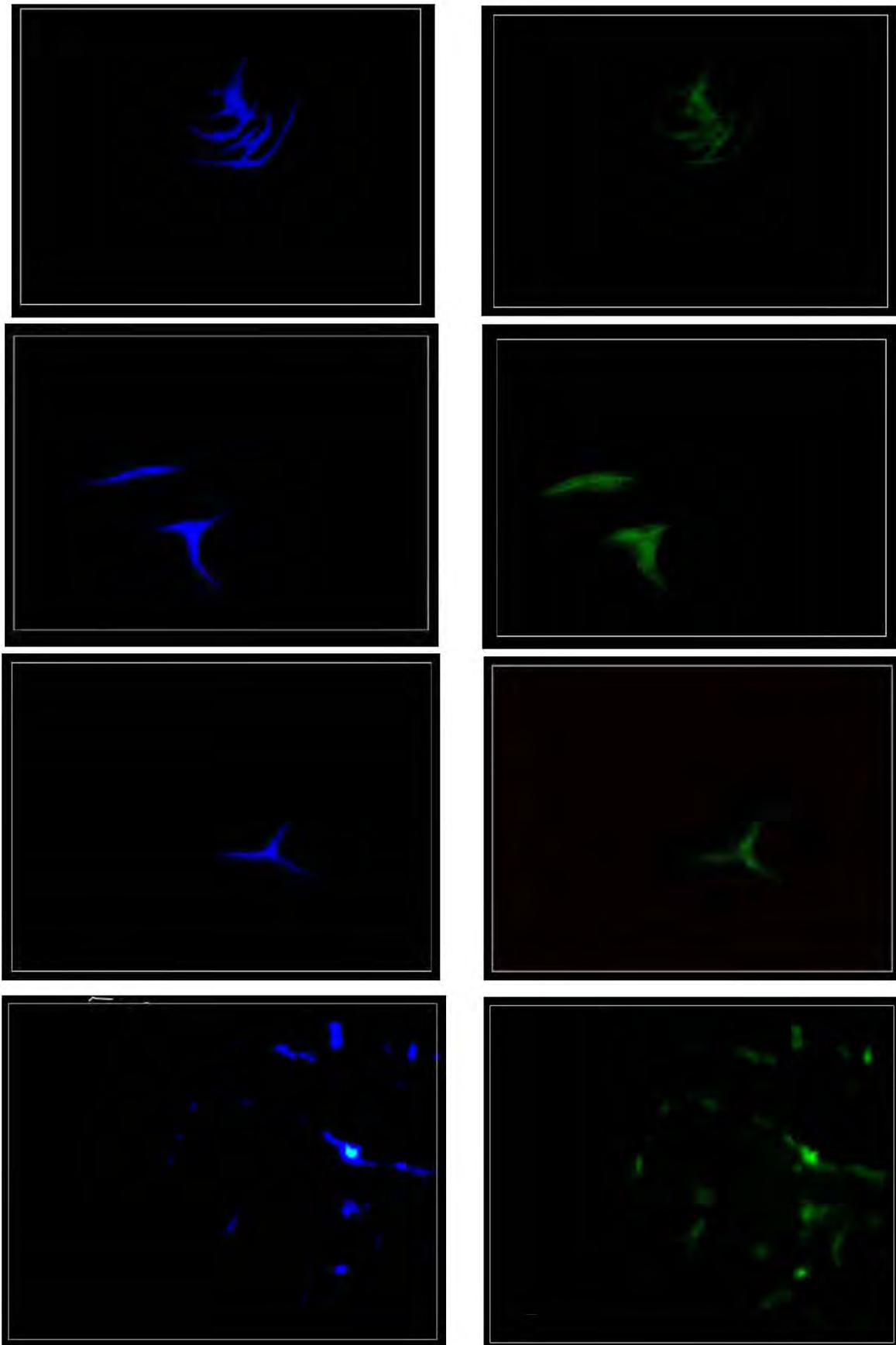


Figura 25. Inmunofluorescencia indirecta de los AcMo con bacterias del genero *Leptospira icterohaemorrhagiae* fijadas con acetona fría. Tinción de Hoechts (azul) y AcMo (verde).

5.7.4 Determinación de la sensibilidad de los AcMo

La Figura 26 muestra los límites de reconocimiento de los AcMo 1.2D.5E, 1.2D.7E, 2.8C.6F y 6.F3.10C, donde a una cantidad mayor de aproximadamente 150,000 bacterias, hubo un comportamiento de saturación del sistema por el cual se inhibió el reconocimiento del anticuerpo en prueba de ELISA indirecta. Los AcMo evaluados presentaron una sensibilidad para detectar aproximadamente como mínimo 3000 bacterias atenuadas.

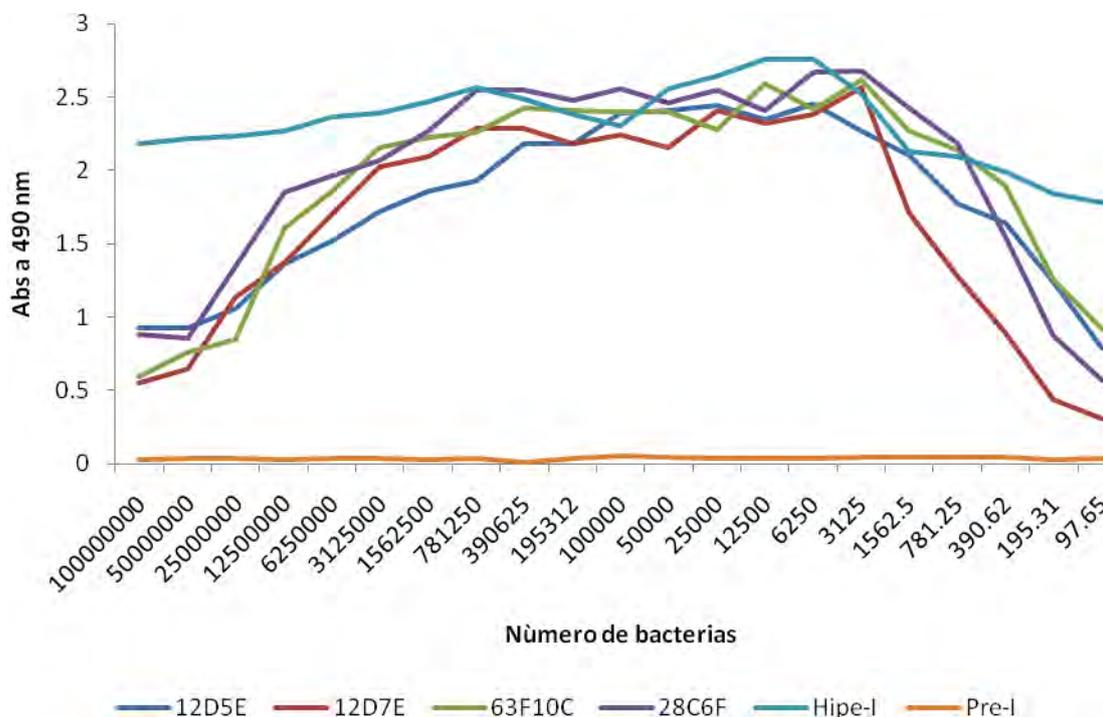


Figura 26 Curva de sensibilidad de los AcMo, utilizando cultivo de bacterias de *Listeria monocytogenes* en una ELISA indirecta. Donde la concentración de bacterias varía desde 100, 000 000 hasta aproximadamente 97 bacterias y los AcMo a una concentración constante de 10 µg /mL, como control negativo se utilizo suero Pre-inmune de ratón y control positivo suero Hiper-inmune de ratón.

6. Discusión

La leptospirosis es una zoonosis que para prevenirse y controlarse requiere de acciones conjuntas de los sectores público, social y privado a través de promoción de la salud, saneamiento básico, atención médica, capacitación del personal de salud y vigilancia epidemiológica (Acosta et al., 1994).

Los AcMo producidos contra diferentes serovariedades de leptospiras han sido relevantes para el desarrollo e implementación de nuevas técnicas de diagnóstico (Berry, 2005). Bajo este concepto y ante la necesidad de contar con mejores pruebas de diagnóstico, en el presente trabajo se obtuvieron AcMo anti-leptospira. Para esto, se utilizó la vacuna LEPTOCAN para la inmunización; al cabo del esquema de inmunización, se encontró que resultó un excelente inmunógeno, dando títulos de anticuerpos anti-leptospira superiores a 16, 000, lo que corrobora que las vacunas contra la leptospirosis para uso veterinario, con suspensiones de una o más cepas patógenas de *Leptospira* inactivadas, conservan la actividad inmunógena (Bey & Johnson, 1986).

Al evaluar la respuesta producida por la vacuna y analizar el reconocimiento de los anticuerpos producidos contra epítomos de leptospiras atenuadas en comparación con los de las serovariedades presentes en la vacuna LEPTOCAN, se encontró que a pesar de ser polivalente al atenuar las bacterias incluidas en la vacuna se pierden epítomos. Por el contrario, al utilizar como antígenos a *L. interrogans* sv. *Icterohaemorrhagiae* obtenidos en cultivo reciente, la respuesta fue más amplia ya que se exponen epítomos membranales inmunogénicos no presentes en la vacuna (Cullen et al., 2005). Es así que aumentan el reconocimiento de los anticuerpos producidos en estas condiciones por lo que en estudios en humanos, se debe considerar que el uso de *L. interrogans* sv. *Icterohaemorrhagiae* como los antígenos de elección para el diagnóstico serológico de la leptospirosis, aún cuando esté producida por otras especies y serovares de *Leptospira*, ya que tienen todas una reacción cruzada muy importante. (Arias D, Arauz S, 1999).

La determinación de la subclases de AcMo se realizó con ELISA de captura, técnica utilizada en previos ensayos (Beatriz C et al, 2003), donde los AcMo producidos son de

la clase IgG y subclase IgG2b, lo cual concuerda con los resultados obtenidos por otros autores como los AcMs IgG2b anti-Lip 32 (Loner M, 2005 y Beatriz et al., 2003) y los AcMo contra las proteínas membranales LigA y LigB (Seyffert N, 2007), aun que también se ha reportado la producción de AcMo de la subclase IgM contra Lip32 (Seyffert N, 2007) e IgG2a e IgG3, contra otras proteínas membranales (Loner M, 2005).

Las concentraciones de anticuerpo que se pueden obtener del sobrenadante de cultivo de los hibridomas son de 10 a 100 µg/mL de medio cosechado (Gavilondo, 1997). Al concentrar el sobrenadante de cultivo se garantizó recuperar concentraciones de anticuerpos mayores a las estimadas. Al realizar la purificación de los anticuerpos con cromatografía de afinidad con columnas acopladas a proteína A-sefarosa, la cual tiene una capacidad de purificación de 5 a 20 mg de anticuerpo/mL (Medina, 2009). El uso inicial y posterior de columnas comerciales MILLIPOR garantizó la eliminación de proteínas contaminantes de los anticuerpos, que no se eliminaron al utilizar sólo el método no comercial. Esto se demostró con la electroforesis en gel de poliacrilamida al 11%, en la cual del primer producto de purificación se obtuvieron bandas de peso molecular aproximadamente de 40 kDa y en la electroforesis del producto de la segunda purificación donde sólo se muestran las bandas correspondiente a la cadena pesada 50 KDa y a la cadena ligera 25 KDa, de los anticuerpos. Por lo tanto al aumentar el número de paso en la purificación aumenta la pureza de los anticuerpos, pero disminuye el rendimiento (Gavilondo, 1997).

Los AcMo fueron probados contra otras leptospiros mediante ELISA indirecta, en particular contra las serovariedades *L. icterohaemorrhagiae*, *L. pomona*, *L. tarassovi*, *L. grippityphosa*, *L. wolff*, *L. canicola*, *L. bataviae*, *L. cynopteri*, *L. pirogenes*, *L. javanica*, *L. noguchii* y *L. biflexa*, no nativas. Su reconocimiento por todos los AcMo obtenidos, sugiere la presencia de un epítipo común entre las serovariedades patógenas probadas, así como en leptospiros saprofitas. Las variaciones en la reactividad de los AcMo producidos ante cada serovariedad, puede tener origen en la cantidad de epítipos presentes o expuestos por cada una de las serovariedades de leptospiros analizadas.

Se evidenció una probable especificidad del AcMo 1.2D.5E hacia la serovariedad *L.cynopteri*, así como el reconocimiento más potente del AcMo 2.8C.6F hacia las serovariedades *L. icterohaemorrhagiae*, *L. pomona*, *L. tarassovi*, *L. grippityphosa*, *L. wolffi* y *L. canicola*.

Los AcMo obtenidos reconocen epítomos de tipo conformacional, que son superficiales expuestos, ya que por *Western blot* con geles de poliacrilamida de gradiente de densidad, en condiciones reductoras, desnaturalizantes y con antígenos tratados para la liberación de proteínas de membrana (Beatriz C et al, 2003), no se observa el reconocimiento hacia alguna proteína expuesta por este método. A diferencia del suero policlonal obtenido del ratón inmunizado con la vacuna LEPTOCAN que reconoció a otras bandas de peso de 197 kDa, 125 kDa y 80 kDa correspondientes a la *L.pomona* y una banda de 37 kDa de la vacuna LEPTOCAN.

La IFI es una prueba género específica que puede usarse como prueba de tamizaje de la infección antigua por la detección de IgG y como prueba de diagnóstico de la infección reciente monitorizando IgM (Agudelo et al., 2006). Al realizar IFI en la serovariedad *L. icterohaemorrhagiae* inactivada con los AcMo obtenidos, se observó una banda fluorescente de reconocimiento a lo largo de la membrana de la bacteria. El colorante de Hoechts que tiñe DNA y que se usó como testigo, muestra un patrón similar al del AcMo lo cual es compatible con la posibilidad de que el epítomo de reconocimiento de los AcMo se ubican en la membrana externa de las bacterias del genero *Leptospira* y que al ser tratadas para su fijación con acetona se incrementa y/o mantiene la exposición de las proteínas membranales, tal como indican los estudios realizados por Agudelo et al., 2006. Para la IFI se puede utilizar cultivo de *L.biflexa* (Agudelo et al., 2006) o *L. interrogans* (Seyffert, 2007) como antígeno.

Los AcMo producidos, al ser evaluados por ELISA indirecto utilizando un cultivo atenuada de *Leptospiras*, ofrecen una capacidad de detección dentro de límites entre 3,000 a 150,000 bacterias. Para completar este ensayo se sugiere utilizar *Leptospiras* no atenuadas para comprobar su reconocimiento y así puedan ser aplicados los AcMo en un ELISA de captura (Arias et al., 1999).

7. Conclusiones

- 1.1 La inmunización con antígeno vacunal permite la producción y caracterización de AcMo útiles para el diagnóstico por ELISA indirecta de las serovariedades de *Leptospira* *L. icterohaemorrhagiae*, *L. pomona*, *L. tarassovi*, *L. grippityphosa*, *L. wolffi*, *L. canicola*, *L. bataviae*, *L. cynopteri*, *L. pirogenes*, *L. javanica*, *L. noguchii* y *L. biflexa*.
- 1.2 Algunos AcMo dan reactividad cruzada entre diferentes serovariedades y otros reconocen un epítipo de *Leptospira* común entre las leptospirosis patógenas y las no patógenas.
- 1.3 De acuerdo a las características inmunoquímicas de los AcMo se plantea la posibilidad de desarrollar un ELISA de captura y/o una IFI para el tamizaje rápido de muestras clínicas de pacientes con sospecha de leptospirosis.
- 1.4 La técnica de microaglutinación (MAT) con antígenos vivos, quedaría reservada para las muestras que resulten positivas con la prueba de tamizaje propuesta, en caso de que se requiera la identificación de serovares con fines epidemiológicos.
- 1.5 La sensibilidad de los AcMo permiten la detección de la leptospirosis en un estadio temprano ofreciendo un diagnóstico y un tratamiento oportuno.

8. Perspectivas

- 1.1 Comprobar mediante un ensayo diferente al presentado en este trabajo de inmunoelectrotransferencia la presencia de una proteína inmunogénica en la bacterias del genero *Leptospira*.
- 1.2 Determinar reacciones cruzadas contra otras espiroquetas patógenas como *Borrelia spp* y *Treponema*; así como con otros agentes causantes de síndromes febriles e icterohemorrágicos.
- 1.3 Estandarizar una técnica inmunoenzimática con los AcMo que permita la detección de la leptospirosis de manera oportuna.
- 1.4 Probar los AcMo con muestras de pacientes positivos a leptospirosis, identificados por MAT (estándar de oro).

9. Referencias

- Acha PN, Szyfres B. Leptospirosis Zoonosis y enfermedades trasmisibles comunes al hombre y los animales. 2a ed. Púb Científica No 503. Washington DC: Organización Panamericana de la Salud; 112-120. 1992.
- Acosta H, Moreno C, Viáfara D. Leptospirosis: Revisión del tema. Colombia Médica. 25: 36-42. 1994.
- Agudelo- P, Restrepo M, Lotero MA. Evaluación de la prueba de inmunofluorescencia indirecta para el diagnóstico de leptospirosis humana. Biomédica; 26:216-23. 2006
- Appassakij H, Silpapojakul K, Wansit R, Woodtayakorn J. Evaluation of the immunofluorescent antibody test for the diagnosis of human leptospirosis. Am J Trop Med Hyg ;52:340-3. 1995.
- Arias D, Arauz S, Stornelli A, Stanchi N, Renner E, Martino EP, Gatti M. Comparación de cuatro antígenos para la determinación de anticuerpos antileptospiras en serología por ensayo inmunoenzimático (ELISA) en leptospirosis canina. Rev Biomed 10:167-172. 1999.
- Arzate MM. Diagnóstico serológico de leptospirosis en canideos atendidos en consultorios veterinarios de la zona sur del Distrito Federal. Informe final del servicio social legal. Universidad Autónoma Metropolitana-Xochimilco. México DF. 2001
- Beatriz L, Loner C, Dorneles J, Nunes M, Hartleben, Soares B, Haake, Icksang J. Monoclonal antibodies against an outer membrane protein from pathogenic leptospira. Braz J Microbiol 34 (Supl.1):1-4. 2003
- Berry JD. Rational monoclonal antibody development to emerging pathogens, biothreat agents and agents of foreign animal disease: The antigen scale. The Veterinary Journal 170: 193 – 211. 2005.
- Bey RF & Johnson RC. Current status of leptospiral vaccines. Prog. Vet. Microbiol. Immunol., 2, 175–197.1986.

Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein –dye binding Anal Biochem 72: 248-254. 1976.

Caino H. Leptospirosis. Revista de la Facultad de Ciencias Medicas. 1(3): 30-36, octubre 2006.

Campbel, AM Monoclonal and immunosensor technology. Amsterdam: Elsevier, 1991.

Carpio-Pedroza JC. Anticuerpos monoclonales anti-longus: caracterización y su utilidad en el diagnostico de *Escherichia coli* enterotoxigenica. Tesis de licenciatura IPN, México. 2004.

Cinco M. Evaluation of antibodies monoclonal F9-4 as immunological probe for leptospira interrogans. J Clinical Microbiol. v. 28, p. 2154-2155, 1990.

Clinical microbiology reviews, Apr., p. 296–326 Vol. 14, No. 2. American Society for Microbiology. All Rights Reserved. 2001.

Coutinho ML. Producao e caracterizacao de anticorpos monoclonais contra LipL32, uma proteina de membrana de leptospiras patogenicas, Braz. Dissertacao (Mestrado em Ciencias)- Centro de Biotecnologia, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas. 2005

Cullen PA, Matsunaga J, Sanchez, Haake D, Adler B. Surfaceome of Leptospira spp. Infection and Immunity 73 (8): 4853 – 4863. 2005.

Faine S, Adler B, Bolin C, Perolat P. Leptospira and Leptospirosis, 2ª ed. Melbourne: MediSc. 1999.

Galayanee D, Worachart S, Albert I, Suraphol Kongtim, Pimjai Naigowit and Visith Thongboonkerd. Use of immunoblotting as an alternative method for serogrouping Leptospira. J Microbiol. 56: 587-592. 2007.

Gavilondo CJ V. Anticuerpos Monoclonales Ed. Elfos. La Habana. pp 180. 1997.

Goding J W. Monoclonal Antibodies: Principles and Practice. 3a ed. Academic Press. San Diego1- 442. 492 pp. 1996.

Harlow D and Lane D. Antibodies. A laboratory manual. Cold Spring Harbord Laboratory.USA.726. 1988

http://www.ops-oms.org.ve/site/-pwr/docs/CCS_MS_OPS.pdf. Acceso: octubre de 2009.

Kohler G, Milstein C: Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. Nature; 256:495-497.1975.

Levett P, Branch, SL. Evaluation of two enzyme-linked immunosorbent assay methods for detection of immunoglobulin M antibodies in acute leptospirosis. American Journal of Tropical Medical Hygiene 66 (6): 745 – 748. 2002.

Levett PN, and Whittington CU. Evaluation of the indirecthemagglutination assay for diagnosis of acute leptospirosis. J. Clin. Micro-biol. 36:11-14. 1998.

Levett, P. Leptospirosis. Clinical Microbiology Reviews, n. 14, v. 2, p. 296-326, 2001.

Medina Y., Carpio J. C., Medina E., Mata O., y Zavala A. Producción de Anticuerpos Monoclonales contra agentes infecciosos. Secretaria de Salud. México D.F. 2009

Milner A. Enzyme linked immunosorbent assay for determining specific immunoglobulin M in infection caused by *Leptospira interrogans* sv hardjo. J Clin Microbiol; 22:539-42.1985.

MS_OPS-OMS. Estrategia de cooperación de OPS-OMS con Venezuela 2006-2008.

Myers D M. Manual de Métodos para el diagnóstico de laboratorio de la leptospirosis. Centro Panamericano de Zoonosis, OPS/OMS. Nota técnica N° 30. 2008.

Navarrete EJ, Acevedo VJA, Huerta HE, Torres BG, Gavaldon RG, Prevalencia de anticuerpos contra dengue y leptospira en la población de Jaltipan, Veracruz. Salud Pública de México. Instituto Nacional de Salud Publica Cuernavaca México año/vol 48 número 003, 220-228 pp. Mayo-junio 2006.

Norma Oficial Mexicana NOM-029-SSA2-1999, Para la vigilancia epidemiológica, Prevención y control de la leptospirosis en el humano. 1999.

Rivera FA, Peña MA, Roa MA, Ordollez B L, Seroprevalencia de leptospirosis en perros callejeros del norte de la ciudad de México., UNAM. DF. Año/ vol 30 número 001., 105-107 pp. Enero –marzo 1999.

Rodríguez I, Fernández C, Obregón AM, Zamora Y, Rodríguez J, Rodríguez NM., Berdaquera D, Llop A. Confirmación microbiológica de dos brotes emergentes de leptospirosis humana en Cuba Rev. Cubana Med. Trop. (59) No.1.2007.

Sharma R, Tuteja U, Khushiramani R, Shukla J, Batra HV. Application of monoclonal antibodies in a rápido sándwich dot- enzyme linked immunosorbent assay for identification and antigen detection of leptospiras serovars. Hybridoma Vol.27 número 2. 113-121 pp. 2008.

Surujballi O, Elmgren C. Monoclonal antibodies suitable for incorporation into a competitive enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the detection of specific antibodies to *Leptospira interrogans* serovar Pomona. Veterinary Microbiology 71: 149-159. 2000.

Yan KT, Ellis WA, Mackie DP, Taylor MJ, McDowell S, Montgomery JM. Development of an ELISA to detect antibodies to a protective lipopolysaccharide fraction of *Leptospira borgpetersenii* serovar hardjo in cattle. Veterinary Microbiology 69: 173 -187. 1999.

ANEXO 1 PREPARACION DE SOLUCIONES

10.1. Solución amortiguadora de carbonatos 0.1M, pH 9.6

- Pesar 3.18 g de carbonato de sodio (Na_2CO_3) más 5.86 g de bicarbonato de sodio (NaHCO_3)
- Disolver los carbonatos en 800 mL de agua bidestilada
- Ajustar el pH a 9.6
- Aforar a 1000 mL
- Mantener a 4°C.

10. 2. Solución salina de fosfatos (NaCl 0.15M, fosfatos 0.01M, pH 7.2 [PBS])

- Medir 800 mL de agua destilada
- Agregar 100 mL de *PB 10X y 8.75 g de NaCl
- Disolver las sales ya justar el pH a 7.2.
- Aforar a 1000 mL con agua bidestilada.
- Guardar a 4°C.

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

10. 3. Amortiguador de lavado (PBS-tween 20, 0.05%)

- A un litro de PBS pH 7.2 (sol. 2)
- Añadir 500 μL de Tween 20.
- Guardar a 4°C.

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

- Pesar 5 g de leche descremada en polvo
- Disolver en 100 mL de PBS-Tween (**sol. 3**)
- Guardar a -20°C .

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

- Pesar 4 mg de orto-feniléndiamina (OPD)
- Añadir 5 mL de ácido cítrico 0.1M y 5 mL de citrato de sodio 0.1 M
- Adicionar 4 μL de H_2O_2 al 30%.

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

10.7. Solución ácido sulfúrico 2N

Cálculos tomando los siguientes datos del H_2SO_4 :

Peso Mol: 98

Pureza: 95%

Densidad: 1.84 g/mL

- Tomar 56.06 mL de ácido sulfúrico (H_2SO_4)
- Añadir cuidadosamente a 850 mL de agua bidestilada y aforar a 1000 mL

10.8. Solución de boratos/ NaCl, pH 8.0

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

10.8. Solución cromógeno/ sustrato (dot ELISA e inmunoelectrotransferencia)

- Pesar 30 mg de 3, 3'-Diaminobenzidina
- Añadir 60 mL de PBS (sol. 2)
- Agregar 6 μ L de peróxido de hidrógeno al 30%

Nota: Esta solución se prepara inmediatamente antes de usarla

10.9. Acrilamida 30%-bis-acrilamida 0.8%

- Pesar 29.2 g de acrilamida* (99.9% pureza) más 0.8% g de bis-acrilamida.
- Disolver en agua bidestilada y aforar a 100 mL.
- Filtrar con papel Whatman 1
- Guardar en frasco color ámbar a 4^oC.

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

10.10. Amortiguador del gel separador: Tris-Base 1.5M, pH 8.8

- Disolver 18.17 g de Tris-base (hidroximetil aminometano) en 85 mL de agua bidestilada.
- Ajustar el pH poco a poco con HCl concentrado hasta que se alcance un pH de 8.8.
- Aforar a 100 mL con agua bidestilada.
- Guardar a 4^oC.

10.11 Lauril sulfato de sodio (dodecil sulfato de sodio) SDS 10%

- Pesar 10 g de SDS y aforar a 100 mL con agua bidestilada.
- Fraccionar y mantener a 4^o C hasta su uso.

10.12 Persulfato de amonio al 10%

- Pesar 100 mg de persulfato de amonio
- Disolver en 1 mL de agua bidestilada

Nota: Se prepara al momento de usarse

10.13. Amortiguador del gel concentrador: Tris-HCl 0.5M pH 6.8

- pesar 6.05g de Tris en 85 mL de agua bidestilada
- Ajustar el pH con HCl 1N. hasta que el pH sea de 6.8.
- Aforar a 100 mL con agua bidestilada.
- Guardar a 4⁰C.

10.14. Amortiguador para electroforesis (tris-glicina-SDS)*

- Medir 200 mL de tris-glicina-SDS 5X*
- Aforar a 1000 mL con agua bidestilada.
- Guardar a 4⁰ C.

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

Nota: Este Amortiguador se puede usar 2 o 3 veces en la cámara inferior. Después de cada uso se filtra con papel Whatman 1

10.15. Amortiguador de muestra

- Agua destilada 4.0 mL
- 0.5M Tris-HCl, pH 6.8 1.0 mL
- Glicerol 0.8 mL
- SDS 10% 1.6 mL
- 2-beta-mercaptoetanol 0.4 mL
- Azul de bromofenol 0.05% (p/v) 0.2 mL

Cuando no se requiera 2-b-mercaptoetanol se sustituye por agua destilada.

Hacer alícuotas de 1 mL y almacenar congelado.

10.16. Azul de Coomassie 0.06% (*para la tinción de geles*)

- Pesar 300 mg de azul de Coomassie, añadir 150 mL de metanol al 30% y 50 mL de ácido acético glacial al 10%.
- Aforar a 500 mL con agua bidestilada.
- Guardar en frasco color ámbar.
- Mantener a temperatura ambiente.

Nota: Esta solución debe dejarse madurar una semana y filtrarse a través de papel Whatman 1 antes de usar. Puede todas las veces que se desee.

10.17. Soluciones decolorante para geles de acrilamida 1 (*metanol-acético-agua*)

- Medir 500 mL de metanol absoluto.
- Añadir 100 mL de ácido acético glacial.
- Aforar a 1000 mL con agua bidestilada.
- Mantener en frasco color ámbar a temperatura ambiente.

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

- Medir 12.5 mL de Trizma-base 1.5M (sol.13), agregar 14.49 g de glicina y añadir 200 mL de metanol.
- Aforar a 1000 mL con agua bidestilada.
- Guardar a 4^oC.

NOTA: No ajustar el pH. El Amortiguador oscila entre pH 8.1 y 8.4, dependiendo de la calidad del Tris, la glicina y el metanol. El metanol debe ser de grado analítico, de lo contrario contiene contaminantes metálicos que interfieren con las láminas de los electrodos. Este amortiguador se puede usar 3 veces, después de cada uso se filtra con papel Whatman 1.

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

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

10.20. Medio RPMI 1640

- Disolver un sobre de medio RPMI 1640 (GIBCO BRL No. Cat. 31800-022) en 800 mL de agua tridestilada y desionizada.
- 2 g de bicarbonato de sodio (GIBCO BRL No. cat. 895-18101P)
- 2 g de HEPES (Sigma No cat. H 3375)
- 10 mL de antibióticos-antimicótico 100X (GIBCO BRL, 15240-062) o sustituirse por:
- penicilina G sódica (ampolleta de 1,000,000 UI) 1 mL
- Estreptomicina (ampolleta de 1g) 1 mL
- Anfotericina B 100X 10 mL

- 16 mL L-Glutamina 200 mM*
- 1 mL 2beta-mercaptoetanol 50 mM estéril
- 10mL de aminoácidos esenciales 100X (GIBCO,)
- 0.2g de piruvato de sodio o:
- Piruvato de sodio 100 mM 18.2 mL
- 1 mL de tilosina 1000X
- Ajustar el pH a 6.8 (con NaOH 1N o con HCl 1N).
- Aforar a 1000 ml con agua tridestilada y desionizada
- Esterilizar por filtración en membrana de 0.22 μ m.
- Almacenar en frascos estériles de 100 mL y guardar a 4° C.

***Solución de L-glutamina 200 mM**

- Pesar 14.615 g de L-glutamina, calidad cultivo celular (Gibco BRL No cat.21051-016) Disolverlos en 500 mL de agua bidestilada.
- Esterilizar por filtración en membrana de 0.22 μ m.

Hacer fracciones de 20 mL y almacenarlas a -20⁰ C hasta su uso.

10.21. Suero Fetal Bovino descomplementado

- Suero de ternera fetal grado cultivo celular (Hyclone No. cat. SH30070-03).
- Calentar durante 30 min a 56⁰C en baño María para descomplementarlo.
- Fraccionar en tubos estériles de 50 mL y almacenarlos a -20⁰C.

10.22. Solución de criopreservación

- Mezclar 9 partes de suero fetal descomplementado con 1 parte de dimetil-sulfóxido (DMSO, calidad cultivo celular) estéril, v/v.
- Conservar a 4⁰ C

10.23. Solución de polietilenglicol (PEG 1300-1600 (Sigma No. Cat. P7777)).

- Derretir el reactivo en baño María a 50-60⁰C
- Diluir al 42-43% con medio de cultivo Eagle modificado por Dulbecco (DMEM, preparar como lo indica el fabricante y esterilizar por filtración) sin suero a 45⁰C
- Ajustar el pH a 7.5-8, hasta que el reactivo, después de 10 min adquiriera una coloración rojizo-violeta.
- Fraccionar en volúmenes de 0.5 mL.
- Almacenar a 4⁰C (hasta 6 meses)

10.24. Medio selectivo con hipoxantina, aminopterina y timina (HAT)

- Agregar 2 mL de HAT 50X (Sigma N-0262) a 100 mL de RPMI complementado
- Conservar a 4⁰ C

10.25. Medio selectivo con hipoxantina y timina (HT)

- Agregar 2 mL de HT 50X (Sigma No. Cat. H-0137) a 100 mL de RPMI complementado (sol. 26) con SFB.
- Conservar a 4⁰ C