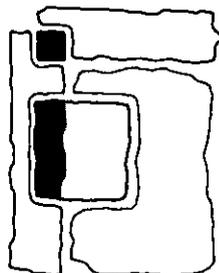


664.94
T314
1993.9.1

R



FONTEC

FONDO NACIONAL
DE DESARROLLO
TECNOLOGICO
Y PRODUCTIVO



**FONDO NACIONAL DE DESARROLLO TECNOLÓGICO Y PRODUCTIVO
FONTEC - CORFO**

**DESARROLLO E IMPLEMENTACION DE
TECNICAS INMUNOQUÍMICAS PARA LA
EVALUCION DE LA CALIDAD TOXICOLÓGICA
EN HARINA DE PESCADO**

92 - 0057

ENERO 1994

PRESENTACIÓN

En el último decenio, se constata que el país ha sabido enfrentar con éxito el desafío impuesto por la política de apertura en los mercados internacionales, alcanzando un crecimiento y desarrollo económico sustentable, con un sector empresarial dinámico, innovador y capaz de adaptarse rápidamente a las señales del mercado.

Sin embargo, nuestra estrategia de desarrollo, fundada en el mayor esfuerzo exportador y en un esquema que principalmente hace uso de las ventajas comparativas que dan los recursos naturales y la abundancia relativa de la mano de obra, tenderá a agotarse rápidamente como consecuencia del propio progreso nacional. Por consiguiente, resulta determinante afrontar una segunda fase exportadora que debe estar caracterizada por una incorporación de un mayor valor agregado de inteligencia, conocimientos y tecnologías a nuestros productos, a fin de hacerlos más competitivos.

Para abordar el proceso de modernización y reconversión de la estructura productiva del país, reviste vital importancia el papel que cumplen las innovaciones tecnológicas, toda vez que ellas confieren sustentación real a la competitividad de nuestra oferta exportable. Para ello, el Gobierno ofrece instrumentos financieros que promueven e incentivan la innovación y el desarrollo tecnológico de las empresas productoras de bienes y servicios.

El Fondo Nacional de Desarrollo Tecnológico y Productivo FONTEC, organismo creado por CORFO, cuenta con los recursos necesarios para financiar Proyectos de Innovación Tecnológica, formulados por las empresas del sector privado nacional para la introducción o adaptación y desarrollo de productos, procesos o de equipos.

Las Líneas de financiamiento de este Fondo incluyen, además, el apoyo a la ejecución de proyectos de Inversión en Infraestructura Tecnológica y de Centros de Transferencia Tecnológica a objeto que las empresas dispongan de sus propias instalaciones de control de calidad y de investigación y desarrollo de nuevos productos o procesos.

De este modo se tiende a la incorporación del concepto "Empresa - País", en la comunidad nacional, donde no es sólo una empresa aislada la que compite con productos de calidad, sino que es la "Marca - País" la que se hace presente en los mercados internacionales.

El Proyecto que se presenta, constituye un valioso aporte al cumplimiento de los objetivos y metas anteriormente comentados.

FONTEC - CORFO

TEPUAL S.A.

PROYECTO FONTEC

*DESARROLLO E IMPLEMENTACION DE TECNICAS INMUNOQUIMICAS PARA LA
EVALUACION DE LA CALIDAD TOXICOLOGICA DE HARINA DE PESCADO CHILENAS*

Informe Técnico Final

MP Ocaranza, C López, JP Hinrichsen, S Lavandero.

*Unidad de Bioquímica y Biotecnología
TEPUAL S.A.*

Diciembre 1993

INDICE

	Página
ABREVIATURAS.....	1
LISTADO DE FIGURAS.....	2
LISTADO DE TABLAS.....	3
1. RESUMEN	4
2. INTRODUCCION.....	5
3. OBJETIVOS.....	6
3.1. Objetivo general.....	6
3.2. Objetivos específicos.....	6
4. PROGRAMA DE TRABAJO DEL PROYECTO.....	7
5. ACTIVIDADES REALIZADAS.....	8
5.1. Parte química.....	8
5.1.1. Síntesis química de conjugados de mollerosina.....	8
5.1.2. Verificación del acoplamiento de mollerosina.....	9
a las proteínas transportadoras.	
5.2. Parte inmunológica.....	10
5.2.1. Obtención de anticuerpos policlonales: Inmunización de conejos con conjugado KLH-mollerosina	10
5.2.2. Estandarización de un método inmunoenzimático (ELISA) para la determinación de los anticuerpos anti KLH-Mollerosina en animales inmunizados.....	10
5.2.3. Evaluación de la respuesta inmune en los animales inmunizados (anticuerpos policlonales)...	12
5.2.4. Caracterización de anticuerpos policlonales. Estudios de especificidad.....	12
5.2.5. Generación de anticuerpos monoclonales: Inmunización de ratones con conjugados BSA-mollerosina, OVO-mollerosina y KLH-mollerosina	13

5.2.6. Estandarización de un método para la determinación de los títulos de anticuerpos anti -mollerosina en animales inmunizados (IRMA)	14
5.2.7. Determinación de la respuesta inmune en los animales inmunizados	15
5.2.8. Evaluación de la especificidad de la respuesta inmune	16
5.2.9. Anticuerpos monoclonales: fusión y producción de hibridomas	16
Preparación de linfocitos esplénicos.....	17
Preparación de células mieloides.....	17
Fusión Somática.....	17
Screening de los hibridomas.....	17
5.2.10. Expansión de hibridomas.....	18
5.2.11. Criopreservación de células.....	18
5.2.12. Clonamiento por dilución limitante.....	18
5.2.13. Caracterización de anticuerpos monoclonales. Estudios de especificidad.....	19
5.2.14. Establecimiento de RIA para la evaluación de mollerosina	19
6. CONCLUSIONES	20
7. FIGURAS Y TABLAS.....	22
8. BIBLIOGRAFIA.....	38

ABREVIATURAS

BSA	: Seroalbúmina de bovino
BOC-ON	: N-terbutoxicarbonil oximino-2-fenil acetonitrilo
DCC	: Diciclohexilcarboimida
D-MEM	: Medio de Eagle modificado por Dulbecco
DMSO	: Dimetilsulfóxido
ELISA	: Ensayo inmunoenzimático
HAT	: Hipoxantina, aminopterina, timidina.
IRMA	: Ensayo inmunorradiométrico
KLH	: Hemocianina de loco
OVO	: Ovoalbúmina
PBS	: Tampón fosfato salino
PVC	: Policloruro de vinilo
SFB	: Suero fetal bovino

LISTADO DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Estructura química de la mollerosina.....	23
Figura 2. Ensayo de ELISA para la determinación de anticuerpos específicos.....	24
Figura 3. Evolución del título de anticuerpos policlonales anti KLH-mollerosina.....	25
Figura 4. Esquema de ensayo inmunorradiométrico (IRMA)...	26
Figura 5. Determinación de los títulos de anticuerpos anti OVO-mollerosina	27
Figura 6. Comparación de la respuesta inmune en animales inmunizados con diferentes conjugados	28
Figura 7. Producción de anticuerpos anti OVO-mollerosina en el tiempo	29
Figura 8. Esquema del ensayo de inhibición de mollerosina	30
Figura 9. Esquema de producción de anticuerpos monoclonales	31

LISTADO DE TABLAS

Tabla 1. Estandarización de un ensayo de ELISA para determinación de los anticuerpos anti KLH-mollerosina.....	32
Tabla 2. Caracterización de anticuerpos policlonales anti-mollerosina mediante ELISA.....	33
Tabla 3. Ensayo de inhibición de mollerosina	34
Tabla 4. Hibridomas seleccionados de la primera fusión para la obtención de anticuerpos monoclonales anti OVO-mollerosina.....	35
Tabla 5. Caracterización de los anticuerpos secretados por los hibridomas H-4 y H-7.....	36
Tabla 6. Hibridomas obtenidos por dilución limitante (3 células por pocillo).....	37

1. RESUMEN DEL PROYECTO

El presente proyecto propuso desarrollar e implementar tecnología alternativa utilizando herramientas inmunoquímicas de vanguardia para la cuantificación de mollerosina en las harinas de pescado. Actualmente, este tipo de metodología se emplea con gran éxito para la determinación de una gran diversidad de compuestos, tales como hormonas, fármacos, pesticidas en muestras complejas (sangre, alimentos, agua).

La estrategia del proyecto consistió en desarrollar anticuerpos policlonales y monoclonales contra mollerosina, generados por la inoculación de inmunógenos de alta antigenicidad, obtenidos por el acoplamiento químico de la mollerosina a una proteína transportadora, a animales de laboratorio.

Una vez obtenidos los anticuerpos, se diseñó un ensayo de para la detección de mollerosina para la evaluación rápida, selectiva y efectiva de esta toxina en las muestras de harinas de pescado.

Se espera que con esta tecnología poder seleccionar masivamente harinas de pescado, permitiendo simultáneamente la decisión respecto al destino final de las harinas y la segmentación del mercado. De esta forma se esperan lograr reales beneficios a nuestra empresa en la selección y certificación de harinas de pescado.

2. INTRODUCCION

En la actualidad nuestro país es uno de los principales productores y exportadores mundiales de harinas de pescado. Sin embargo, esta creciente demanda ha obligado a los productores nacionales a cumplir altas y crecientes exigencias de calidad de los mercados internacionales.

TEPUAL estableció un Programa de Desarrollo para enfrentar el desafío de incrementar, masificar y flexibilizar nuestro servicio de certificación y control de calidad de harinas especiales, destinadas a la nutrición animal. Este Programa considera como objetivos, el mejoramiento de la calidad de servicio en la selección de harinas especiales y la expansión de nuestro mercado objetivo, nacional e internacional, mediante el desarrollo e implementación de rápidos sistemas de selección.

El vómito negro-erosión de molleja, cuadro biotxicológico complejo, producido por la incorporación de harinas de pescado a las dietas de las aves, tiene gran importancia en la comercialización de las harinas. Este cuadro se caracteriza por producción de ulceraciones a nivel de la molleja, aparición de un fluido negro por las fosas nasales, disminución del apetito, menor peso corporal, menor eficiencia de conversión alimentaria y disminución en la producción de huevos. La evaluación biotxicológica de las harinas se realiza mediante un ensayo biológico que permite evidenciar las toxinas presentes, generadas principalmente en el proceso de elaboración.

La identificación de las toxinas causantes del vómito negro y erosión de molleja ha sido muy difícil y tan sólo, hace unos años atrás, se logró aislar una molécula, de estructura química muy simple, denominada mollerossina ("gizzerossine") de las harinas de pescado tóxicas (1). Químicamente, la mollerossina o ácido 2-amino-0-(4-imidazoil)-7-azanonaroico, es un derivado de la histamina de masa molecular de 240 daltons y cuya estructura se muestra en la Figura 1 (2).

En el presente proyecto se propuso desarrollar e implementar tecnología alternativa a los bioensayos, utilizando herramientas inmunoquímicas de vanguardia para la cuantificación de mollerossina en las harinas de pescado. Para ello, se propuso desarrollar anticuerpos policlonales y monoclonales anti-mollerossina, producidos por la inoculación de inmunógenos de alta antigenicidad, obtenidos por síntesis química (unión de proteínas transportadoras a mollerossina. Con estos anticuerpos se diseñará un ensayo de captura y detección de mollerossina para la evaluación rápida, selectiva y efectiva de esta toxina en las muestras de harinas de pescado.

3. OBJETIVOS.

3.1. Objetivo general.

Este Proyecto tuvo como objetivo principal diseñar y establecer un nuevo procedimiento para evaluar la calidad toxicológica de las harinas de pescado mediante la detección inmunoquímica de mollerosina.

3.2. Objetivos específicos.

(a) Síntesis de derivados inmunogénicos de mollerosina.

(b) Generación de anticuerpos poli y monoclonales específicos anti-mollerosina.

(c) Diseño de un procedimiento experimental simple para la detección de mollerosina en forma rápida y masiva en muestras de harinas de pescado.

4. PROGRAMA DE TRABAJO DEL PROYECTO.

ETAPA 1 : 1 mes

Planificación general del Proyecto

Contratación de personal

Estudio y diseño de formación de derivados inmunogénicos de mollerosina. Elección de proteínas transportadoras y técnicas de acoplamiento.

ETAPA 2 : 3 meses

Síntesis química y purificación de derivados de mollerosina.

Análisis químicos y físicos de los derivados.

ETAPA 3 : 2 meses

Anticuerpos policlonales y monoclonales anti-mollerosina: inoculación de inmunógenos a conejos y ratones, respectivamente. Estudios de dosis, adyuvantes, vías de inoculación, obtención de sueros y determinación de títulos.

ETAPA 4 : 3 meses

Anticuerpos monoclonales anti-mollerosina : fusión de hibridomas y cultivo. Producción de hibridomas.

ETAPA 5: 3 meses

Anticuerpos monoclonales anti-mollerosina: screening de hibridomas. Expansión y mantención de hibridomas.

ETAPA 6: 2 meses

Caracterización de anticuerpos poli y monoclonales: estudio de especificidad

ETAPA 7 : 3 meses

Establecimiento de las condiciones para la detección inmunoquímica de mollerosina por radioinmunoensayos en fase líquida y fase sólida en muestras de harinas de pescado.

ETAPA 8 : 1 mes

Evaluación final del Proyecto e INFORME FINAL.

5. ACTIVIDADES REALIZADAS

5.1. Parte química.

5.1.1. Síntesis química de conjugados de mullerosina

Después de realizar el estudio para el acoplamiento de las proteínas carrier a mullerosina (ver informe de avance I y II), se eligieron BSA, OVO y KLH. La unión covalente de la mullerosina a estas proteínas se realizó secuencialmente utilizando la siguiente metodología:

a) Protección de los grupos aminos de la proteína.

Dado que la mullerosina presenta dos tipos de grupos reactivos (carboxilo terminal y un amino lateral), en teoría pueden realizarse dos reacciones de unión. Aunque la elección es arbitraria, se optó efectuarla a través del grupo amino terminal. Para dirigir el acoplamiento, se protegió previamente los grupos aminos de las proteínas, utilizando el reactivo N-ter-butoxicarboniloximino-2-fenil acetonitrilo (Boc-on) como describe Itoh et al (3). Se disolvió la proteína en agua con agitación por 3 horas. La reacción se detuvo ajustando el pH de la solución al punto isoeléctrico de la proteína con ácido cítrico, se precipitó con acetona y se lavó 2 veces con este solvente.

b) Activación de los grupos carboxilos de la proteína.

Se usó el protocolo descrito por Pless et al (4), activándose los grupos carboxilo de la proteína con dicitloxilcarbodimida (DCC). Brevemente, la reacción comenzó con la disolución del 2,4,5- tricloro fenol en dimetoxietanol. Posteriormente, se agregó la proteína transportadora con los grupos amino protegidos y se dejó reaccionar por 30 minutos. Luego, se agregó DCC y se dejó toda la noche a 4°C. Después de precipitar la proteína modificada, se lavó con éter y se secó por vacío.

c) Acoplamiento de mullerosina a la proteína modificada.

A la proteína modificada (grupos aminos protegidos y carboxilos activados), disuelta en agua, se le agregó directamente la mullerosina. Después de dejar por 6 horas a 4°C con agitación, se precipitó y se lavó con éter. Finalmente el producto se secó por vacío.

d) Desprotección de grupos amino de la proteína.

Se desprotegieron los grupos aminos de la proteína acoplada a mullerosina para aumentar su solubilidad en solventes polares. Para ello, se disolvió en ácido trifluoroacético y se dejó reaccionar por 45 minutos a temperatura ambiente. Luego, el solvente se eliminó por vacío y el conjugado se lavó con éter, removiéndose el solvente por evaporación.

5.1.2. Verificación del acoplamiento de mullerosina a las proteínas transportadoras.

Para los acoplados BSA-mullerosina y OVO-mullerosina, se usó la reacción de Pauli de acuerdo a Sluyterman et al. (5), que determina colorimétricamente a 530 nm, el grupo imidazol de la mullerosina. La reacción de Pauli reveló cualitativamente una mayor presencia de grupos imidazoles que los controles (OVO y BSA no acoplados). Adicionalmente como controles positivo y negativo se usaron histidina y los solventes de la reacción respectivamente.

Para el acoplado KLH-mullerosina, se midió la absorbancia del acoplado a 220 y 280 nm, las cuales corresponden a las longitudes de onda de máxima absorción del hapteno y del carrier, respectivamente (6). Se obtuvo una razón molar de 60 moléculas de mullerosina por mol de proteína.

En resumen se sintetizaron exitosamente los conjugados propuestos originalmente en el proyecto, los que fueron usados para la posterior generación de anticuerpos policlonales y monoclonales.

5.2. Parte Inmunológica

5.2.1. Obtención de anticuerpos policlonales: Inmunización de conejos con conjugado KLH-mollerosina

Para el desarrollo de esta etapa fue necesario considerar aspectos tales como: especies, adjuvantes, dosis de antígenos y sangrías, los cuales se describen en los los dos informes de avances.

Se inyectaron dos conejos con el conjugado KLH-Mollerosina, realizándose las inmunizaciones y sangrías de acuerdo al siguiente cronograma:

Día 0: Suero preinmune. A cada uno de los animales se les extrajo sangre para obtener la condición basal (sueros preinmunes).

Día 3: Inmunización 1. Cada conejo recibió 100 μ g de antígeno, resuspendido en coadyuvante de Freund completo, en ambos cojinetes plantares.

Día 10: Inmunización 2. Cada animal se reinyectó, en dorso por vía subcutánea, con 100 μ g de antígeno resuspendido en coadyuvante de Freund incompleto.

Día 17: Sangría 1. Para evaluar y comparar la respuesta inmune de cada animal, se obtuvo sangre y se determinaron la concentración de anticuerpos (título) por un ensayo inmunoenzimático en fase sólida (ELISA).

Día 24: Inmunización 3. Cada conejo recibió, nuevamente, 100 ug de antígeno en coadyuvante de Freund incompleto estéril en distintas partes del dorso por vía subcutánea.

Día 31: Inmunización 4. Por último, cada animal se reinyectó por vía intraperitoneal con 100 ug de antígeno, preparado en tampón salino estéril. Al término de esta etapa, se realizaron sangrías cada 7 días. En total se efectuaron 6 sangrías y en cada una de ellas se obtuvieron 50 ml de sangre. Los títulos de anticuerpos se evaluaron por ELISA.

5.2.2. Estandarización de un método inmunoenzimático (ELISA) para la determinación de los anticuerpos anti KLH-Mollerosina en animales inmunizados.

Tanto para la evaluación de la respuesta inmune en los animales inmunizados como el desarrollo de una metodología simple para la posterior cuantificación de mollerosina en muestras de harinas de pescado, se colocó a punto un ensayo inmunoenzimático en fase sólida (ELISA) descrito por Crowter *et al.* (7) (Figura 2). Esta metodología permitió, en forma simple (sin uso de radiactividad) y sensible, establecer la concentración de los anticuerpos en los sueros de los animales inmunizados.

Para estandarizar esta metodología, se evaluaron distintas condiciones experimentales: tiempos de incubación, tipos de proteínas bloqueadoras, etc. Brevemente este protocolo, ilustrado en la Figura 2, consistió en:

- Activar las placas de poliestireno. A cada pocillo se agregaron 50 μ l de KLH-Mollerosina, preparado en tampón carbonato (pH 9,6) en una concentración de 20 μ g/ml. La activación se realizó por 1,5 horas a temperatura ambiente.
- Bloqueo. Todos aquellos sitios libres en los pocillos, se saturaron con una proteína bloqueadora. Para ello, se incubaron las placas con 400 μ l de tampón PBS que contenía seroalbúmina de bovino al 1%, durante 1 hora a temperatura ambiente.
- Incubación con el primer anticuerpo. Las placas activadas y saturadas se incubaron con sueros anti KLH-mollerosina, diluïdos 1/1.000, 1/2.500, 1/5.000, 1/7.500, 1/10.000, 1/25.000 y 1/50.000, por 90 minutos a temperatura ambiente en triplicado.
- Lavado. Para eliminar el exceso de anticuerpos no unidos, se lavó cada placa 4 veces con PBS-Tween 20 al 0,05%
- Incubación con segundo anticuerpo. Finalmente a cada pocillo se le agregaron 50 μ l del anticuerpo cabra anti-IgG de conejo conjugado a fosfatasa alcalina y se incubó por 1,5 horas a temperatura ambiente.
- Lavado. Nuevamente el exceso del segundo anticuerpo no unido, se eliminó siguiendo el procedimiento descrito anteriormente.
- Cuantificación. A cada pocillo se agregó 100 μ l de p-nitrofenilfosfato (sustrato cromógeno), el cual al ser hidrolizado por la fosfatasa alcalina produce un color cuantificable espectrofotométricamente en un detector ELISA.

Como controles se realizaron incubaciones omitiendo el antígeno o el primer anticuerpo.

La Tabla 1 muestra los resultados de la estandarización del ELISA para la evaluación de la respuesta inmune en los animales de experimentación. Los valores de las lecturas en los sueros inmunes fueron mayores que las de los sueros preinmunes, indicando la presencia de anticuerpos específicos.

5.2.3. Evaluación de la respuesta inmune en los animales inmunizados (anticuerpos policlonales).

El ensayo de ELISA, anteriormente expuesto, permitió evaluar la respuesta inmune de los 2 conejos inmunizados con KLH-Mollerosina. Se analizaron los sueros de todas las sangrías en diluciones entre 1/1.000 a 1/50.000. Los títulos de anticuerpos del conejo 2 de cada una de las sangrías se muestran en la Figura 3. Como controles negativos se realizaron incubaciones sin primer anticuerpo o sin antígeno. La comparación de los títulos de las sangrías respecto al suero preinmune, mostró el aumento progresivo de la concentración de anticuerpos anti-KLH-mollerosina en el tiempo (Figura 3).

El título del antisuero, definido como la dilución a la cual se obtiene la mitad de la lectura máxima, fue 1/10.000 para el conejo 2 (Figura 3, cuarta sangría).

5.2.4. Caracterización de anticuerpos policlonales. Estudios de especificidad.

Dado que la inmunización con el complejo hapteno-transportador, además de producir anticuerpos anti-hapteno, también se pueden generar anticuerpos anti-transportador y anti reactivo de acoplamiento, se caracterizó la respuesta inmune en los sueros correspondientes y se evaluó si estaba dirigida contra nuestro antígeno (mollerosina) o contra la proteína transportadora KLH. Igualmente se evaluó la correactividad hacia otras proteínas transportadoras (BSA y OVO).

Mediante un ensayo de ELISA se determinó en el suero del conejo 2 (cuarta sangría), diluido 1/10.000, el reconocimiento de los anticuerpos hacia los antígenos KLH, KLH-mollerosina, BSA, BSA-mollerosina, OVO y OVO-mollerosina (20 µg/ml). Como controles se usaron suero preinmune y ausencia de antígeno o primer anticuerpo.

Los resultados mostrados en la Tabla 2, indican la presencia de anticuerpos dirigidos contra la mollerosina, pues las lecturas para los acoplados mollerosina-transportador son mayores que del transportador. Además este suero no presentó una respuesta importante contra otras proteínas acoplantes (BSA y OVO). Sin embargo, tal como se esperaba si se detectaron anticuerpos anti KLH, transportador usado en la inmunización.

Estos resultados nos permiten concluir que se produjeron anticuerpos policlonales anti mollerosina, los que serán de gran utilidad para emplearlos como sondas de reconocimiento para la determinación de mollerosina en muestras de harinas de pescado.

5.2.5. Generación de anticuerpos monoclonales: Inmunización de ratones con conjugados BSA-mollerosina, OVO-mollerosina y KLH-mollerosina.

Tal como se planteó en el proyecto, para la producción de anticuerpos monoclonales anti-mollerosina, se contrataron los servicios del Centro de Referencia de Anticuerpos Monoclonales de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile, bajo la dirección del inmunólogo Prof Dr Arturo Ferreira.

Se inmunizaron grupos de animales (ratones Balb/c), con los conjugados sintetizados. Las inmunizaciones y sangrías se realizaron de acuerdo al siguiente cronograma:

Día 0. Obtención de sueros preinmunes: a cada uno de los ratones, provenientes del Bioterio de la P. Univewrsidad Católica de Chile, se les extrajo sangre para obtener los correspondientes sueros preinmunes (condición basal).

Día 3. Primera inmunización: cada ratón recibió una dosis de 10 μ g de antígeno en coadyuvante de Freund completo, estéril, en ambos cojinetes plantares.

Día 11. Segunda inmunización: cada ratón recibió nuevamente una dosis de 10 μ g de antígeno pero en coadyuvante de Freund incompleto estéril. Se inyectó la mezcla en distintas partes del dorso del animal por vía subcutánea.

Día 15. Sangría primaria: para evaluar y comparar la respuesta de los grupos experimentales a los antígenos, cada uno de los animales se sangraron. Los títulos de los sueros se determinaron por ensayo inmunorradiométrico (IRMA).

Día 18. Tercera inmunización: cada ratón recibió por vía intraperitoneal, una dosis de 10 μ g de antígeno, preparado en tampón salino estéril.

Día 22. Sangría secundaria: la evaluación de las respuestas de los ratones se determinó por el mismo protocolo descrito en la sangría primaria.

Al término de las etapas de inmunización, sólo aquellos ratones que presentaron mayores títulos contra nuestro antígeno (mollerosina), fueron reinoculados por vía intravenosa, 4 días antes de realizar la fusión somática.

5.2.6. Estandarización de un método para la determinación de los títulos de anticuerpos anti-mollerosina en animales inmunizados (IRMA).

Para la evaluación de la respuesta inmune se colocó a punto un ensayo inmunorradiométrico (IRMA), que se ejemplifica en la Figura 4. Este ensayo es muy sensible y permitió cuantificar la concentración de los anticuerpos en los sueros de los animales inmunizados.

Para estandarizar esta metodología, se evaluaron distintas condiciones experimentales como: tiempos de incubación, tipos de proteínas saturantes, detergentes, etc. Los sueros preinmunes e inmunes, correspondientes a las sangrías primarias y secundarias, se evaluaron de acuerdo al protocolo descrito por Lavandero et al. (8). Brevemente este protocolo, ilustrado en la figura 4, consistió en:

i. Activación de las placas de policloruro de vinilo (PVC): a cada pocillo de la placa, se le agregaron 50 μ l de uno de los siguientes antígenos BSA, OVO, KLH, BSA-mollerosina, OVO-mollerosina y KLH-mollerosina, preparados en tampón carbonato (pH 9,6) en una concentración de 20 μ g/ml. La activación se realizó toda la noche a 4°C.

ii. Bloqueo: todos aquellos sitios inespecíficos libres se saturaron con una proteína irrelevante. Para ello, se incubaron las placas con 300 μ l de tampón PBS que contenía proteína de soya al 1%. por toda la noche a 4°C.

iii. Incubación con el primer anticuerpo: los sueros anti OVO-mollerosina, anti BSA-mollerosina y anti KLH-mollerosina, correspondientes a las sangrías primarias y secundarias se diluyeron 1/100, 1/1000, 1/5000, 1/10000 y 1/100000.

iv. Lavado : para eliminar el exceso de anticuerpos no unidos, se lavó cada placa 4 veces con PBS-Tween 80 al 0,01%.

v. Incubación con segundo anticuerpo (detención): finalmente, a cada pocillo se le agregaron 50 μ l (100.000 cpm) del anticuerpo cabra anti-Igc de ratón radiomarcado con yodo-125 y se incubó por 2 horas a temperatura ambiente.

vi. Lavado : se eliminó el exceso de anticuerpo radiomarcado no unido, siguiendo el procedimiento descrito en el punto iv.

vii. Cuantificación de la radioactividad. Las cuentas por minuto (cpm) asociadas a cada pocillo se determinaron en un contador gamma. Como controles se utilizaron placas sin antígeno o sin primer anticuerpo. Nuestros resultados demostraron la estandarización exitosamente un IRMA que permite evaluar la respuesta inmune.

5.2.7. Determinación de la respuesta inmune en los animales inmunizados.

El IRMA permitió evaluar la respuesta inmune de los ratones inmunizados con los acoplados BSA-mollerosina, OVO-mollerosina y KLH-mollerosina. Se evaluaron los sueros provenientes de las sangrías primarias y secundarias en diluciones entre 1/100 a 1/100.000. Los resultados de las sangrías secundarias con OVO-Mollerosina se muestran en la Figura 5. Como controles negativos se ensayaron incubaciones sin primer anticuerpo o sin antígeno. La respuesta de cada ratón se comparó en relación a su suero preinmune.

Para determinar si la respuesta inmune en los animales era contra nuestro antígeno (mollerosina) o contra las proteínas transportadoras (BSA, OVO o KLH), se evaluaron los sueros de las sangrías primarias y secundarias de los ratones inmunizados con los distintos acoplados.

El análisis de los títulos de los ratones inmunizados, indicó que sólo algunos ratones del grupo inoculado con el acoplado OVO-Mollerosina y KLH-mollerosina presentó una respuesta satisfactoria contra el antígeno. En los ratones inmunizados con el antígeno BSA-Mollerosina no se observó diferencia entre los sueros preinmune e inmune. En la Figura 6 se muestran como ejemplo las diferencias al emplear dos proteínas transportadoras. También en la Figura 7 se muestra que los títulos de anticuerpos anti OVO-Mollerosina aumentan en el tiempo.

Dado que la mollerosina presenta semejanzas estructurales con histamina, se verificó si este suero reacciona con un conjugado histamina-BSA. Los resultados indicaron que este suero no reconoce la histamina.

En resumen, algunos sueros anti OVO-Mollerosina y KLH-mollerosina parecen reconocer específicamente la mollerosina. Controles con antígenos estructuralmente similares demuestran especificidad en el reconocimiento y el título del suero, en dilución 1/1000, es satisfactorio para la generación de anticuerpos monoclonales.

5.2.8. Evaluación de la especificidad de la respuesta inmune.

Para confirmar que los sueros antes mencionados reconocían específicamente a la mollerosina y no a la proteína transportadora, se realizó un ensayo de inhibición. Este ensayo consistió en inhibir con mollerosina, el reconocimiento del suero anti OVO-Mollerosina por BSA-mollerosina, basado en la siguiente hipótesis: si el suero es específico contra mollerosina se producirá inhibición pues todos los anticuerpos anti OVO-Mollerosina reaccionarán con la mollerosina en solución y no habrá, entonces, anticuerpo disponible para reaccionar con BSA-mollerosina. Como control positivo de la reacción se hizo reaccionar el antígeno BSA-mollerosina con el suero anti OVO-mollerosina en ausencia de mollerosina.

El protocolo realizado que se ilustra en la Figura 8, fue el siguiente: se activaron placas de PVC con 50 μ l de BSA 20 μ g/ml o BSA-Mollerosina 20 μ g/ml. La activación se realizó toda la noche a 4 °C. Los sitios libres a los cuales el antígeno no se unió, se bloquearon con una solución de PBS-soya al 1% por toda la noche a 4 °C. Luego, las placas se incubaron con 50 μ l del suero anti OVO-mollerosina diluido 1/1000 en tampón PBS-soya al 1%. Simultáneamente, se preincubó el suero con 5 μ g de mollerosina por 1 h a 25 °C. Finalmente, esta mezcla se agregó a la placa y se incubó toda la noche a 4 °C. Como control positivo se usó suero en la misma dilución, preincubado sin mollerosina. Los controles negativos se usaron sueros preinmunes en la misma dilución, con y sin preincubación con mollerosina. La placa se lavó 4 veces con PBS Tween 80 0.05%. Finalmente, se agregaron 50 μ l (1000.000 cpm) de cabra anti IgG de ratón radiomarcado con yodo-125 y se incubó por 2 horas a temperatura ambiente. El exceso de anticuerpo no unido se eliminó y se determinó la radioactividad.

Los resultados de la Tabla 3, muestran la inhibición del suero anti OVO-Mollerosina por la mollerosina, pues las cuentas obtenidas fueron significativamente menores que las obtenidas con el control positivo. Por otra parte, los controles negativos mostraron que esta reacción es específica, confirmando que la respuesta del ratón inmunizado con el acoplado OVO-Mollerosina es contra nuestra toxina.

Estos resultados nos permitieron continuar a la etapa siguiente de fusión somática, pero, previo a ello, cinco días antes los ratones se reinmunizaron por vía intravenosa con 5 μ g del antígeno para aumentar el título de anticuerpos.

5.2.9. Anticuerpos monoclonales: fusión y producción de hibridomas.

Para la generación de anticuerpos monoclonales se debió seguir una serie de etapas que se muestran en la Figura 9 y que correspondieron a las siguientes:

- Preparación de linfocitos esplénicos.

Tres días después de la última inmunización por vía intravenosa, los ratones que presentaron título contra los conjugados OVO-Mollerosina y KLH-mollerosina fueron sacrificados. Se disectaron los bazo y se disgregaron mecánicamente, en una placa Petri con 10 ml de medio D-MEM completo sin suero. La suspensión celular de esplenocitos, libre de agregados, se centrifugó a 1.000 rpm por 10 minutos a temperatura ambiente y se lavó 3 veces con medio D-MEM.

- Preparación de células mieloides.

Se utilizaron células de la línea mieloides no secretora NSO/2, mantenidas en crecimiento exponencial en medio RPMI-1640, suplementado con suero fetal de bovino (SFB) al 10%, aminoácidos no esenciales 1mM, estreptomycin y penicilina 200 U/ml.

- Fusiones somáticas.

Se realizaron un total de 3 fusiones para lo cual, los linfocitos esplénicos de los ratones inmunizados con OVO-mollerosina y KLH-mollerosina se fusionaron con células mieloides de la línea NSO/2, según la técnica descrita por Kohler y Milstein (10). Se usó como agente fusógeno polietilenglicol 4000. Para asegurar sólo el crecimiento de los híbridos celulares resultantes de la fusión, se resuspendieron en medio de cultivo que contenía Hipoxantina, Aminopterina y Timidina (HAT) y se colocaron en placas de 96 pocillos a una densidad celular 10^6 células/ml. Quince días después de la fusión se inició la selección de los hibridomas.

- Screening de los hibridomas.

Los sobrenadantes de los pocillos en que se observó crecimiento de hibridomas, se analizaron por IRMA. Para esto las placas de PVC fueron activadas con OVO-mollerosina y KLH-mollerosina, respectivamente, de acuerdo a los protocolos ya descritos y posteriormente se les agregó sobrenadante de los hibridomas. Como controles negativos del ensayo, se incubaron pocillos con un anticuerpo monoclonal no relacionado, o en ausencia de sobrenadante o del antígeno. Como control positivo se usó suero inmune del ratón usado en la fusión.

En la primera, segunda y tercera fusión se obtuvieron 480,850 y 840 hibridomas respectivamente, en cuyos sobrenadantes se determinó la presencia de anticuerpos anti-mollerosina mediante IRMA. Sólo 9 hibridomas provenientes de la primera fusión fueron positivos (Tabla 4), los cuales pasaron a la etapa siguiente de expansión.

Las fusiones 2 y 3 llegaron sólo hasta la etapa de screening pues ninguno de los clones presentó una alta afinidad por la mollerosina cuando se comparó esta respuesta con la producida frente a la molécula usada como carrier

En ninguna de las 3 fusiones realizadas, se obtuvieron clones con respuestas claras y categóricas, sino que por el contrario estas fueron vagas y poco claras.

5.2.10. Expansión de hibridomas

Los hibridomas secretores de anticuerpos que reaccionaron con BSA-Mollerosina, se transfirieron a placas de 24 pocillos, cada uno de los cuales contenía 1 ml de medio D-MEM completo, 20% de FBS. Una vez, alcanzada un 70% de confluencia, se transfirieron a frascos de cultivo con 5 ml de medio, en presencia de linfocitos esplénicos (2.5×10^7 linfocitos de ratón Balb/c no inmune en 40 ml de medio).

El panel de 9 hibridomas se congeló para asegurar su viabilidad y el sobrenadante de medio de cultivo se utilizó en las pruebas de especificidad frente a BSA y BSA-mollerosina (Tabla 4).

5.2.11. Criopreservación de células

Las células se centrifugaron a 1000 rpm por 10 min y se resuspendieron en solución crioprotectora (90% FBS, 10% DMSO), a una concentración de $1-3 \times 10^6$ células/ml. Las células se distribuyeron en alícuotas de 1 ml en criotubos y se dejaron por 24 horas a -80°C en ultrafreezer. Posteriormente se almacenaron en nitrógeno líquido.

5.2.12. Clonamiento por dilución limitante

Los anticuerpos monoclonales son secretados por una progenie de células que pueden producir sólo un tipo de anticuerpos. El clonamiento es necesario para evitar problemas de poliespecificidad y riesgos de sobrecrecimiento de poblaciones de células no productoras de anticuerpos. En general se realizó clonamiento por dilución limitante ya que de esta forma nos aseguramos que sólo una población homogénea de células produce un sólo tipo de anticuerpos. El protocolo consistió en realizar diluciones de modo de tener finalmente 1 célula por pocillo, las que secretarán finalmente un sólo tipo de anticuerpos.

5.2.13. Caracterización de anticuerpos monoclonales. Estudios de especificidad.

De los 9 hibridomas elegidos en la primera fusión, se seleccionaron sólo 2 de ellos (H-4 y H-7), pues presentaron diferencias en el reconocimiento entre BSA y BSA-mollerosina (Tabla 4). Sólo en estos 2 clones, se evaluó la especificidad frente a las distintas proteínas acoplantes y los resultados se resumen en la tabla 5. En base a estos resultados se eligió el clon H-4, el cual pasó a la etapa siguiente de dilución de 10 y 3 células por pocillo. De la dilución de 3 células por pocillo se seleccionaron los clones resumidos en la Tabla 6, los cuales se caracterizaron con los antígenos BSA y BSA-mollerosina. Los resultados mostraron que sólo dos hibridomas (E-1 y F-6) reconocieron levemente la mollerosina, siendo insuficiente su discriminación para nuestros objetivos.

De acuerdo a lo anteriormente expuesto no se ha cumplido con el objetivo de generar anticuerpos monoclonales anti mollerosina a pesar que para su ejecución se contrataron los servicios del centro de referencia de anticuerpos monoclonales de la Universidad de Chile. Esta entidad a cargo del Dr Arturo Ferreira cuenta con una vasta experiencia en la generación de anticuerpos monoclonales. Sin embargo en nuestro caso ha sido imposible hasta a fecha lograr señales positivas (ver carta adjunta del Dr Ferreira).

A pesar que existen en la literatura trabajos que dan cuenta de la generación de anticuerpos monoclonales contra moléculas de baja masa molecular, no existen hasta la fecha anticuerpos monoclonales anti mollerosina. Posibles explicaciones para esto puede deberse a que esta molécula es producto de la unión de sólo 2 aminoácidos por lo que su masa molecular es de sólo de 240, lo cual hizo imprescindible la formación de derivados inmunogénicos. Es importante aclarar que en la etapa de formulación del proyecto era imposible predecir los inconvenientes de esta molécula en la producción de anticuerpos monoclonales tal como lo indica el Dr Ferreira en la carta adjunta.

5.2.14 Establecimiento de RIA para la evaluación de mollerosina.

A pesar que no se pudo obtener con un anticuerpo monoclonal anti mollerosina, se pudo generar un excelente anticuerpo policlonal producido en conejo, cuya reactividad cruzada con otras proteínas acoplantes es casi nula (Tabla 2). Es posible que estos anticuerpos anti mollerosina sean de gran utilidad para ser usados como sondas de reconocimiento en la determinación de esta toxina en muestras de harinas de pescado.



UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS

CENTRO PARA LA GENERACION DE
REACTIVOS INMUNOLOGICOS
(PROYECTO FONDEF-023)
CASILLA 2. CORREO 15, LA PINTANA
SANTIAGO-CHILE
FAX. 5417357

Santiago, 29 de Diciembre de 1993.

DR. SERGIO LAVANDERO
Jefe Proyecto FONTEC
TEPUAL S.A.
General Ekdhal 159
Santiago - Chile

Estimado Dr. Lavandero:

Informo aquí las labores realizadas por nuestra Unidad en relación al Proyecto FONTEC titulado: "Desarrollo e Implementación de Técnicas Inmunoquímicas para la Evaluación de la Calidad Toxicológica de Harina de Pescado Chilena".

Las actividades relacionadas con este servicio se iniciaron en Diciembre de 1992 y han implicado, a la fecha, aproximadamente 50 horas hombre mensuales.

El Objetivo General de nuestro servicio ha sido la generación de anticuerpos monoclonales contra mollerósina.

Los Objetivos Específicos se resumen como sigue:

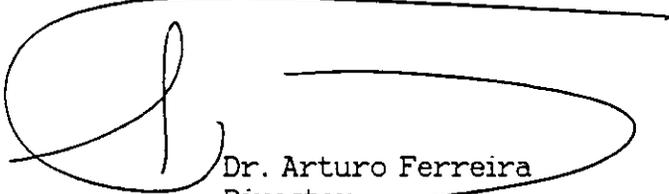
Fase I	:	Inmunización y Desarrollo de Ensayos Inmunométricos.
Fase II	:	Fusión.
Fase III	:	Evaluación.
Fase IV	:	Clonamiento, Isotipificación y análisis de actividad.
Fase V	:	Producción de 200 ml de medio de cultivo y de 50 ml de líquido ascítico.

A la fecha, se han realizado tres fusiones. En todas ellas se logró animales con un grado de inmunidad humoral tal que fue posible diluir los sueros 1 / 1000 y lograr señales positivas en ensayos inmunoradiométricos. Este es un requisito esencial que debe cumplir el suero del donante prospectivo del bazo ya que, en los sobrenadantes de los cultivos la concentración de anticuerpos específicos rara vez supera a la del suero diluido 1 / 1000. En la primera fusión se llegó a la etapa de clonamiento (fase IV), oportunidad en que se perdieron las señales positivas. En la segunda y tercera fusión se llegó a la etapa de evaluación, en que no se detectaron clones positivos (VER ANEXO 1).

Los experimentos realizados indican que en los ratones existen linfocitos B con receptores para mollerossina, ya que se ha generado, en cuatro oportunidades, respuestas humorales (anticuerpos policlonales) contra el complejo transportador - mollerossina, muy superiores a las obtenidas contra el transportador solo. Sin embargo, las respuestas generadas han sido relativamente modestas, comparadas con las obtenidas recientemente en nuestro laboratorio contra otros antígenos (TNF α , IFN γ , Pili K99 y antígeno Tc45 de T. cruzi). Es probable que el pequeño tamaño de la mollerossina se refleje en la existencia de pocos clones específicos y en la generación de anticuerpos de muy baja afinidad.

Estos factores pueden explicar las dificultades encontradas para aislar y estabilizar hibridomas monoclonales productores de anticuerpos contra este antígeno, lo que nos ha impedido cumplir con el objetivo general de nuestro servicio. Como se estableció en un inicio, esta situación era imposible de predecir sin realizar los experimentos pertinentes.

Le saluda muy cordialmente.



Dr. Arturo Ferreira
Director
Centro para la Generación
de Reactivos Inmunológicos

AF/ocs
Serg.Lav
FACS

ANEXO 1 :

Experimentos en curso, intentan aumentar operacionalmente la inmunogenicidad del preparado antigénico. Para ello, recientemente se han inmunizado animales provenientes de tres cepas certificadas de ratones: A.CA (H2^b), B10.M (H2^d) y B10.S (H2^k). Estos animales representan una combinación de dos trasfondos genéticos y dos haplotipos H-2. Siendo la mollerosina una molécula pequeña, es esperable que su inmunogenicidad sea variable, de acuerdo a la constitución genética del receptor, especialmente en H-2. Los resultados obtenidos a la fecha, muestran que un animal A.CA y un B10.S han respondido muy bien, en anticuerpos policlonales. Como última actividad, incorporada a este informe, se ha dado un "boost" y, de acuerdo a la respuesta generada, se procederá a una fusión (4^{ta}).

6. CONCLUSIONES

1. El acoplamiento de mollerosina a tres proteínas diferentes (BSA, OVO y KLH) fue completamente exitoso. Todas estas proteínas se utilizaron como transportadores para aumentar la escasa inmunogenicidad teórica de la mollerosina.

2. Los antisueros de algunos animales inoculados con los conjugados OVO-mollerosina y KLH-mollerosina, presentan títulos satisfactorios de anticuerpos.

3. Se estandarizó un ensayo inmunorradiométrico (IRMA) para evaluar los títulos de anticuerpos en los sueros de los animales y en los medios de incubación de los híbridos somáticos (células productoras de anticuerpos monoclonales anti-mollerosina).

4. Los animales, en general, presentaron mejor respuesta inmune contra el conjugado KLH-mollerosina que contra OVO-mollerosina y BSA-mollerosina

5. Los ensayos mostraron que el suero anti KLH-mollerosina reconoce a la toxina y su reactividad cruzada con otras moléculas es casi nula.

6. Después de tres intentos realizados en el Centro de Referencia de Anticuerpos Monoclonales de la Universidad de Chile no fue posible generar anticuerpos monoclonales anti-mollerosina.

7. Los sueros inmunes de los conejos inmunizados con el conjugado KLH-Mollerosina presentan anticuerpos específicos para la toxina (anticuerpos policlonales anti-mollerosina). Estos pueden ser usados como sondas de reconocimiento de mollerosina en muestras de harinas de pescado.

8. Se desarrolló un ensayo inmunoenzimático (ELISA) para evaluar los títulos de anticuerpos anti-mollerosina en los sueros de animales inmunizados. Esta técnica será de gran utilidad para la posterior cuantificación de la toxina en muestras problema.

Del desarrollo de este proyecto se perfilan como beneficios directos para nuestra empresa los siguientes aspectos:

(a) Se espera que el posterior uso de los anticuerpos policlonales generados en este Proyecto permitan el establecimiento de un ensayo inmunológico que mejore la calidad del servicio de selección toxicológica de harinas de pescado especiales. La implementación de estas herramientas inmunológicas permitirá evaluar la calidad toxicológica de harinas de pescado en forma masiva, rápida y certera.

(b) Igualmente se podrá expandir nuestro mercado objetivo nacional e internacional al poder seleccionar una mayor cantidad de harinas especiales, resultando en un aumento de divisas que ingresan al país. También esto incidirá en una reducción de los costos de selección de harinas de pescado por disminución de los ensayos biológicos. El

desarrollo de esta técnica para la detección de mollerosina será una alternativa fácil y económica comparada al actual ensayo biológico utilizado en nuestra Empresa.

(c) Por último, el desarrollo e implementación de esta tecnología de vanguardia en nuestra empresa permite aplicarla a la detección de otras moléculas que sean de nuestro interés.

7. Figuras y Tablas

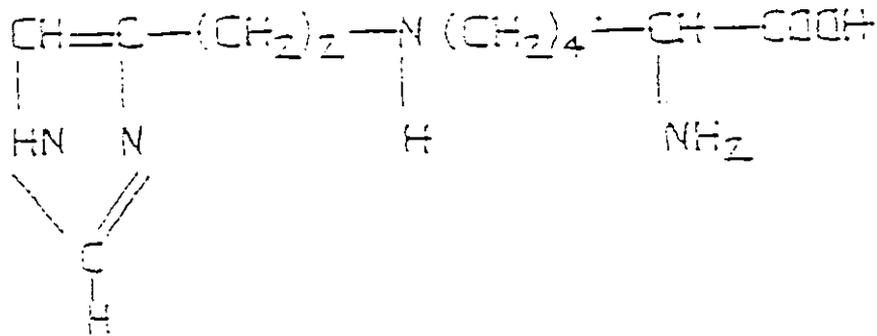


Figura 1. Estructura química de la mollerosina.

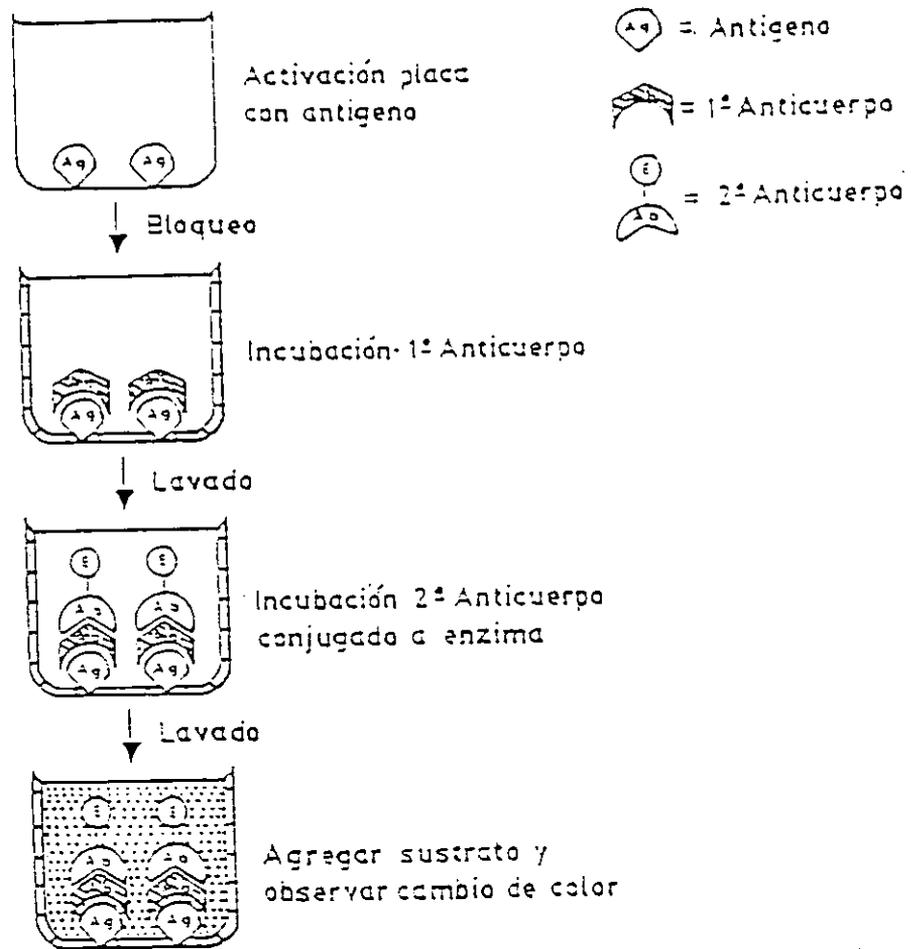


Figura 2. Ensayo de ELISA para la determinación de anticuerpos específicos.

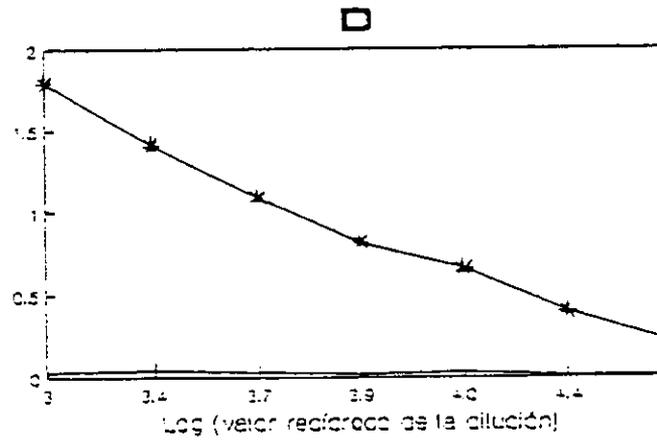
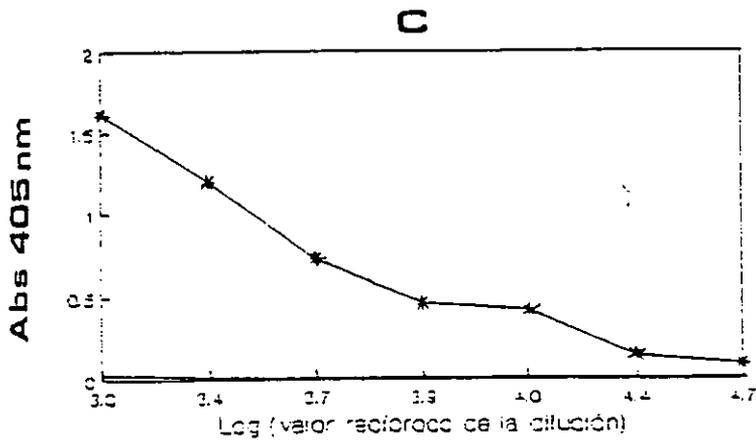
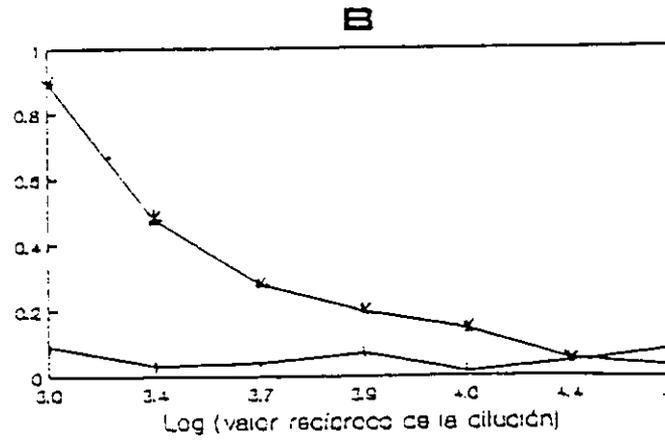
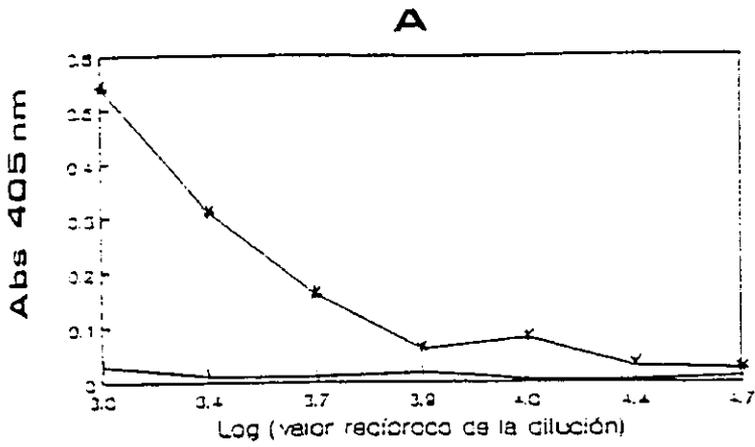


Figura 3. Evolución del título de anticuerpos policlonales anti KLH-mollerosina. Simbología: A: Sangría 1, B: Sangría 2, C: Sangría 3, D: Sangría 4, + : suero preinmune, * : suero inmune.

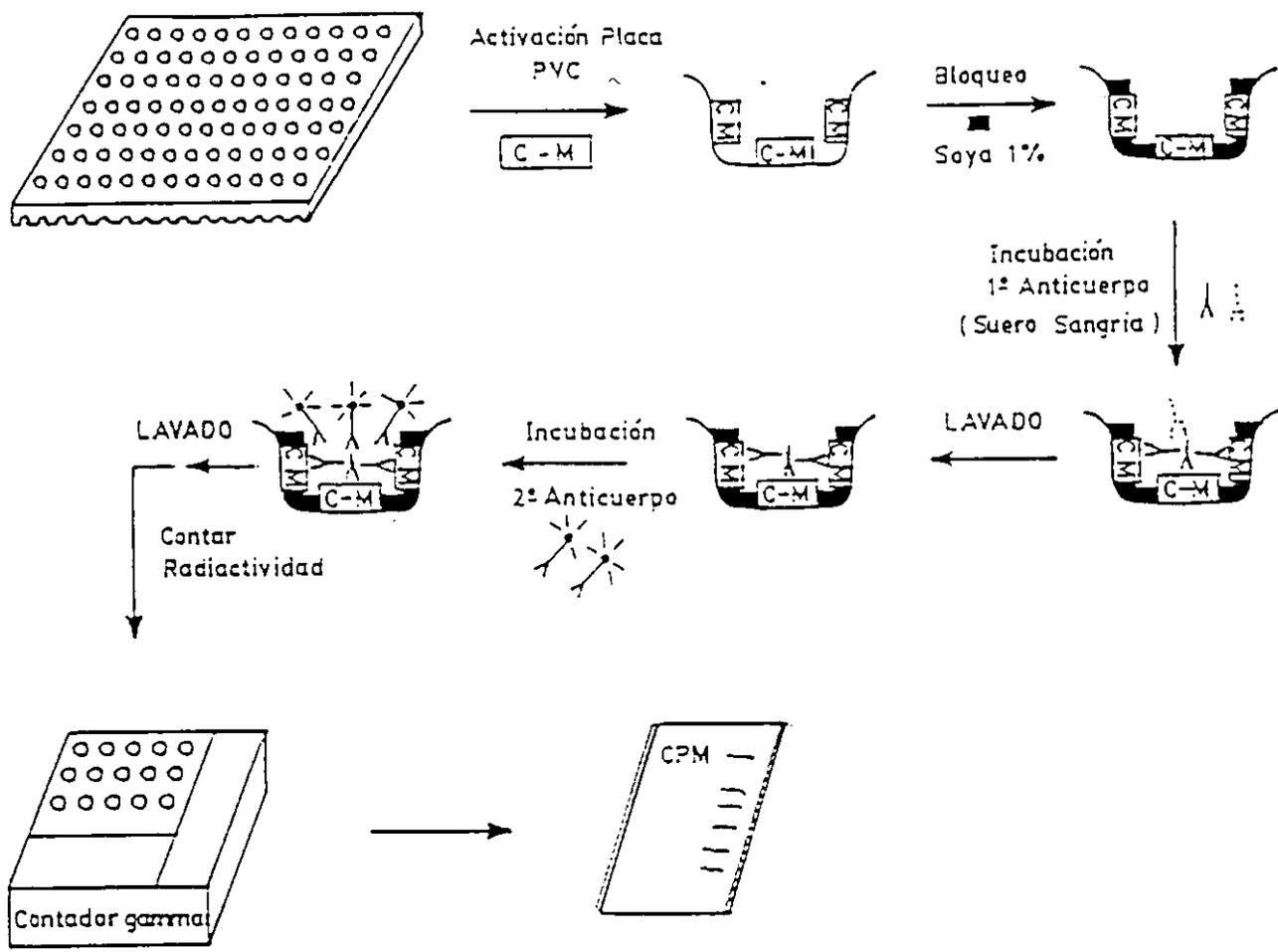


Figura 4. Esquema del ensayo inmunorradiométrico (IRMA).

UNION ANTICUERPO ANTI IUGS DE RATON MARCADO CON 125-I (CFM X10-3)

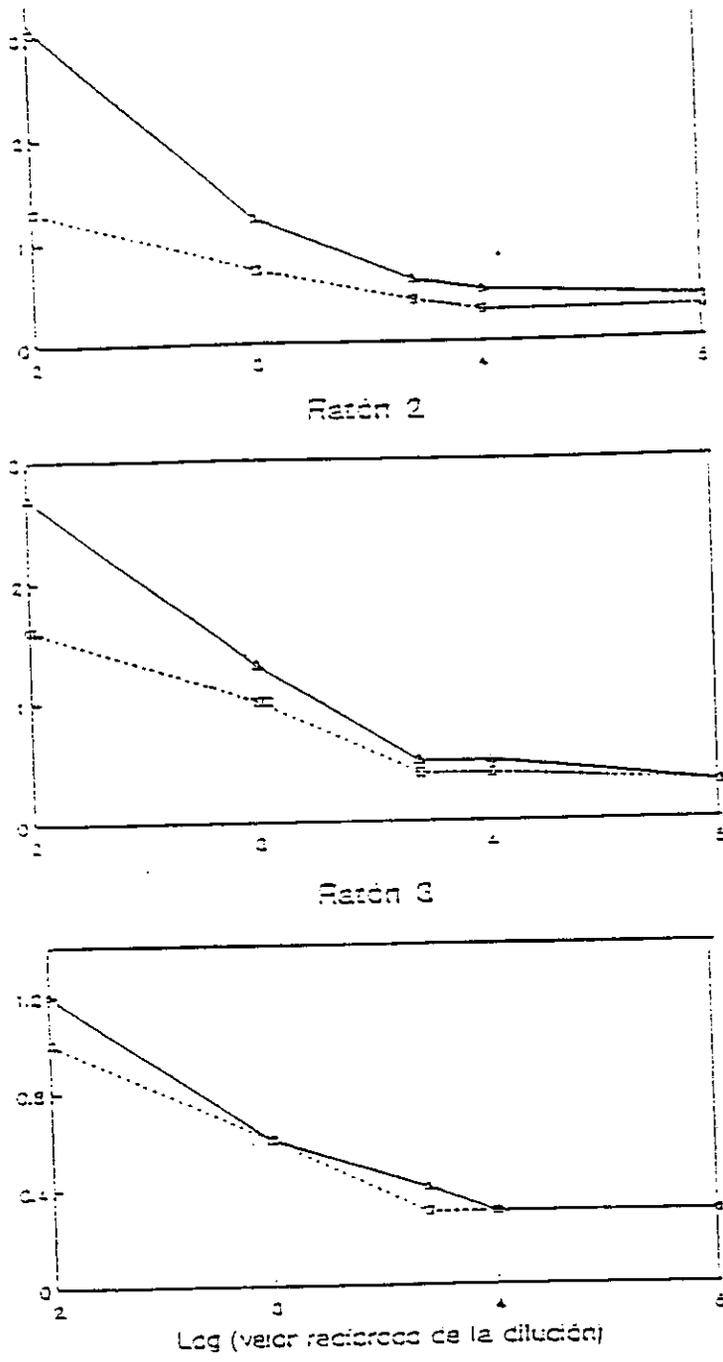


Figura 5. Determinación de los títulos de anticuerpos anti OVO-Mollerosina. Los títulos indicados corresponden a los sueros preinmune (---) e inmune (—) de las sangrias secundarias de los ratones inmunizados con el conjugado OVO-Mollerosina. Cada valor representa el promedio de tres determinaciones con un SEM < 5%

UNIDAD ANTIHUEPO ANTI IgG DE RATON MARCAJO CON 125-I (CPI X 10⁻³)

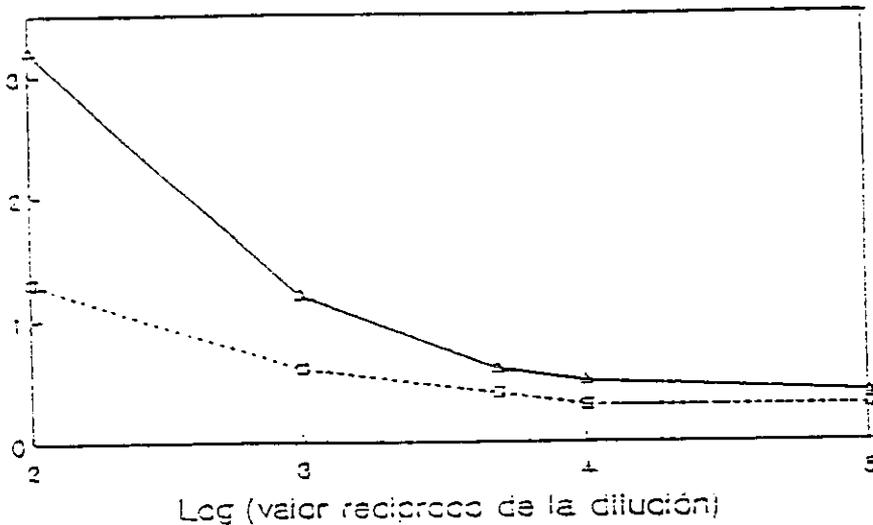
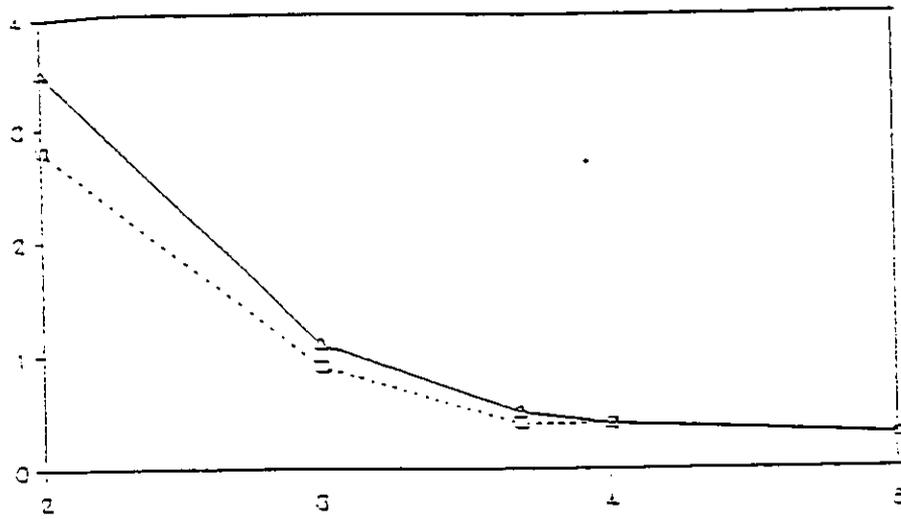


Figura 6. Comparación de la respuesta inmune en animales inmunizados con diferentes conjugados. Los resultados corresponden a los títulos, obtenidos por la inmunización del conjugado BSA-Mollerosina (A) y OVO-Mollerosina (B), en las sangrías preinmune (---) e inmune (—). Cada valor representa el promedio de tres determinaciones con un SEM < 5%

UNION ANTICUERPO ANTI LOG DE RATON 125-I
(CPM X10-3)

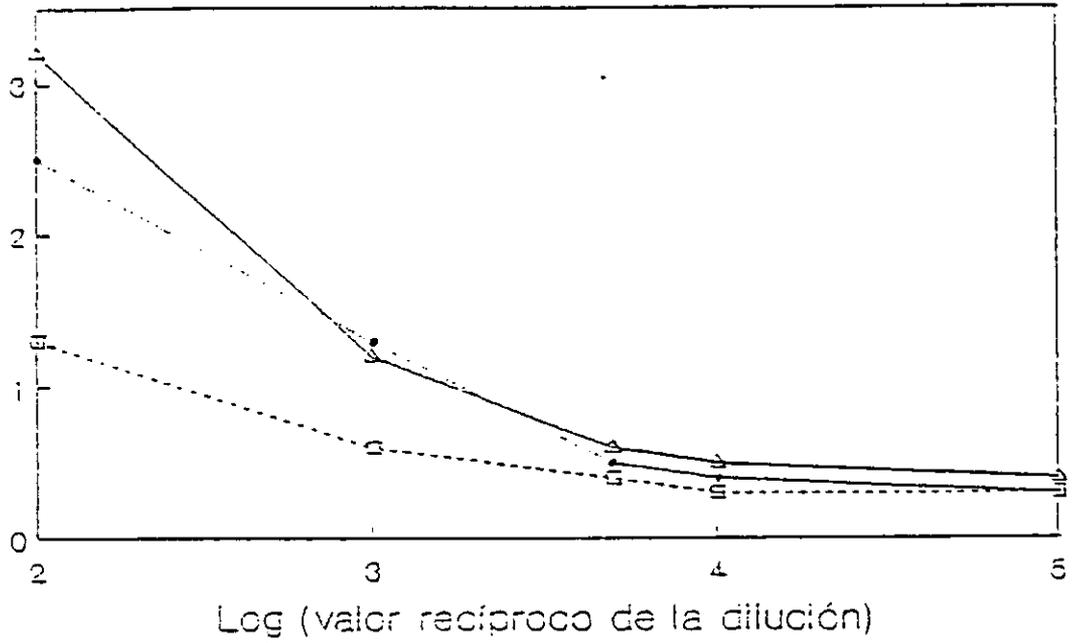
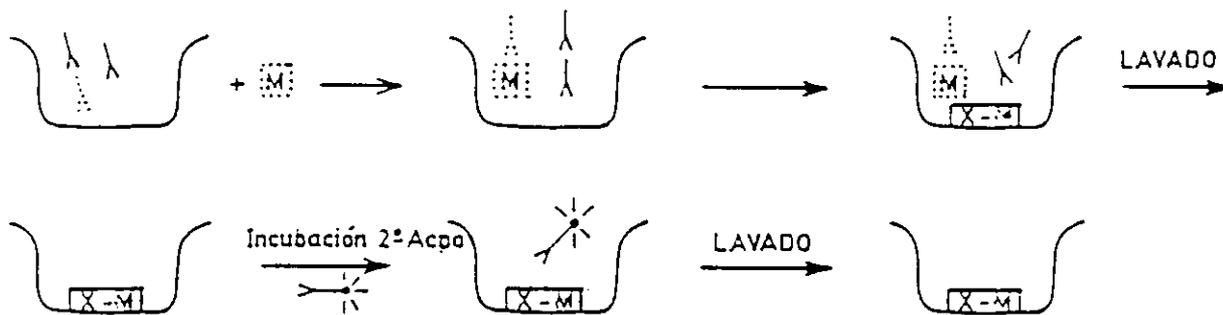


Figura 7. Producción de anticuerpos anti OVO-Mollerosina en el tiempo. Los resultados muestran los títulos de anticuerpos anti OVO-Mollerosina de las sangrías preinmune (□), inmune primaria (●) e inmune secundaria (Δ). Cada valor representa el promedio de tres determinaciones con un SEM < 5%

1- Preincubación Suero con Mollerosina



2- Sin Preincubación

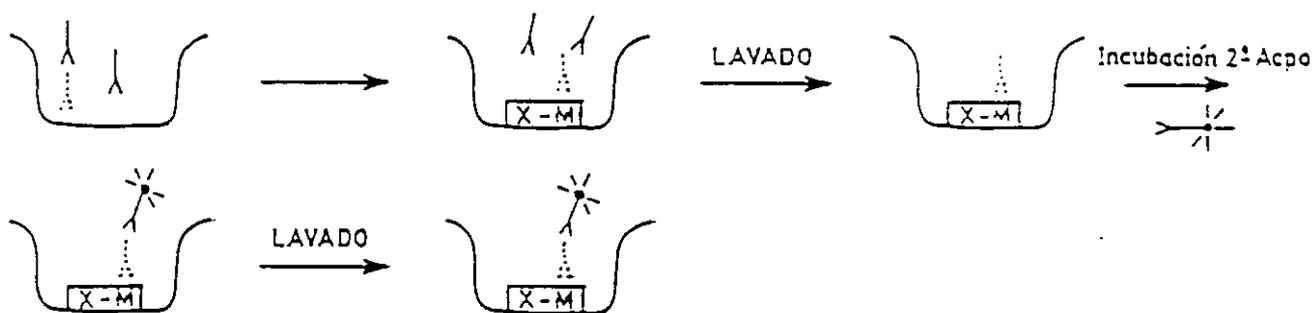


Figura 8. Esquema del ensayo de inhibición de mollerosina.

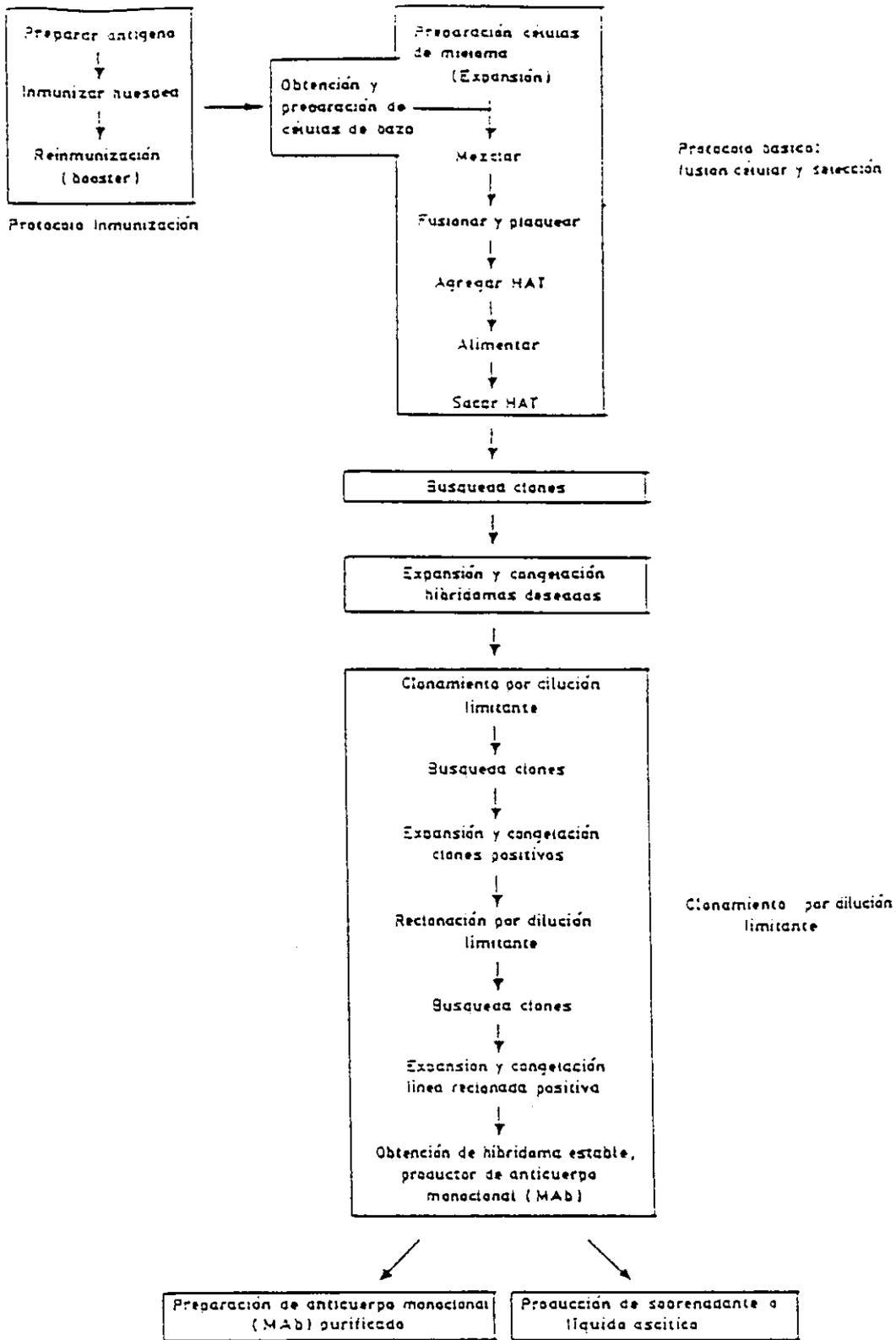


Figura 9. Esquema de producción de anticuerpos monoclonales.

Tabla 1. Estandarización de un ensayo de ELISA para la determinación de los anticuerpos anti KLH-mollerosina.

Dilución suero	Absorbancia 405 nm	
	Suero preinmune	Suero inmune
1/1.000	0,03	1,61
1/2.500	0,02	1,20
1/5.000	0,01	0,73
1/7.500	0,01	0,47
1/10.000	0,01	0,42
1/25.000	0,01	0,14
1/50.000	0,01	0,09

Controles

		Absorbancia 405 nm
Ausencia de antígeno		
	Suero preinmune 1/1.000	0,02
	Suero inmune 1/1.000	0,05
Ausencia del primer anticuerpo		0,00
Control positivo	Suero normal de ratón 1/1.000	1,74

Tabla 2. Caracterización de anticuerpos policlonales anti-mollerosina, mediante ELISA

Antígeno (20 µg/ml)	Absorbancia a 405 nm	
	Suero Preinmune	Suero Inmune
BSA	0	0.02
BSA-mollerosina	0	0.13
OVO	0.05	0.06
OVO-mollerosina	0.05	0.25
KLH	0	0.32
KLH-mollerosina	0	0.45

Se usó el suero inmune del conejo #2 correspondiente a la 4ª sangría en dilución 1/10.000. El reconocimiento de los anticuerpos presentes en este suero a los antígenos señalados, se evaluó por ELISA. Cada valor corresponde al promedio de 3 determinaciones

Tabla 3 . Ensayo de inhibición de mollerossina

Antígeno (20 ug/ ml)	Sueros	CPM
BSA	Preinmune	397
"	Preinmune + Mollerossina	411
"	Inmune	489
"	Inmune + Mollerossina	515
BSA + Mollerossina	Preinmune	657
"	Preinmune + Mollerossina	739
"	Inmune	1869
"	Inmune + Mollerossina	1118

Cada punto corresponde al promedio de 6 determinaciones.

Tabla 4. Hibridomas seleccionados de la primera fusión para la obtención de anticuerpos monoclonales anti OVO-mollerosina.

Hibridoma	cpm anticuerpo radiomarcado	
	BSA	BSA-Mollerosina
H-4	911	1264
H-8	940	1086
H-3	876	925
H-6	657	762
H-7	816	1119
G-10	681	853
H-11	1051	985
H-5	1000	1064

Los linfocitos esplénicos del ratón 1, inmunizado con OVO-mollerosina, se fusionaron con células miéloides tal como se indica la sección correspondiente. Después de quince días de cultivo en medio de selección HAT, se evaluó en los sobrenadantes la presencia de anticuerpos anti BSA-mollerosina mediante el ensayo de IRMA descrito en el primer informe de avance. Cada valor corresponde al promedio de 3 determinaciones. Se utilizaron como controles positivos y negativos, los sueros inmunes y preimmune del mismo ratón, respectivamente. Adicionalmente se uso como control negativo un anticuerpo monoclonal no relacionado.

Tabla 5. Caracterización de los anticuerpos secretados por los hibridomas H 4 y H 7.

Hibridoma	OVO	cpm anticuerpo radiomarcado		
		OVO-Mollerosina	BSA	BSA-Mollerosina
H-4	2392	3193	2937	3443
H-7	2093	2372	2569	2929

Los linfocitos esplénicos del ratón 1, inmunizado con OVO-mollerosina, se fusionaron con células mieloides tal como se indica la sección correspondiente. Después de quince días de cultivo en medio de selección HAT, se seleccionaron los hibridomas H-4 y H-7, se expandieron, evaluándose después de cinco días en los sobrenadantes el reconocimiento de los anticuerpos hacia los antígenos indicados, mediante un ensayo IRMA. Cada valor corresponde al promedio de 3 determinaciones. Se utilizaron como controles positivos y negativos, los sueros inmunes y preinmune del mismo ratón, respectivamente. Adicionalmente se uso como control negativo un anticuerpo monoclonal no relacionado.

Tabla 6. Hibridomas obtenidos por dilución limitante (3 células por pocillo).

Hibridoma	cpm anticuerpo radiomarcado	
	BSA	BSA-mollerosina
A-1	545	520
E-1	385	614
F-9	475	494
F-12	513	470
G-8	559	413
H-8	631	565
H-12	865	403
B-4	731	434
B-12	510	568
F-6	453	654
G-4	502	494

El híbrido H-4, mostrado en la tabla 4, se expandió y se llevó a dilución limitante con tres y diez células por pocillo. En los sobrenadantes de las diluciones se determinó por IRMA la presencia de anticuerpos anti-mollerosina empleando los dos antígenos señalados en esta tabla. Los valores corresponden al promedio de tres determinaciones con una desviación standard inferior al 5%.

BIBLIOGRAFIA

1. Okasaki T, Noguchi T., Igarashi, Sakagami, Y., Seto, H., Mori, K. Gizzerosine, a new toxic substance in fish meal causes severe gizzard erosion in chicks. *Agric Biol Chem* 47:2949-2952, 1983
2. Ito Y, Noguchi T, Naito H. Fluorometric determination of gizzerosine, a histamine H₂-receptor agonist discovered in feedstuffs, employing high-performance liquid chromatography. *Anal Biochem* 151:28,1985
3. Itoh, M., Hagiwara, D., Kamiji, T. *Tetrahedron lett* 4393, 1975
4. Pless, J., Boissonnas, R.a., *Helv Chim Acta* 46:1609, 1963
5. Sluyterman, L.A. *Biochem Biophys Acta* 38:218, 1960
6. Catty D. *Antibodies (volume I). A practical approach* (1988). IRL Press, Oxford, England.
7. Crowter, JR., Abu-Elzein, EM. Detection of antibodies against food and mouse diseases virus using purified staphylococcus A protein conjugated with alkaline phosphatase. *J Immunol Methods* 34: 261-267, 1980.
8. Lavandero, S., Ferreira, A. use of Silica Octadecyl as an alternative non- conventional solid phase in immunoradiometric assays. *J. Immunol Meth* 114:261-265, 1988.
9. Kholer G., Milstein, C. Continuous culture of fused cells secreting antibodies of predefined specificity. *Nature* 256: 495-497, 1975.

