

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES EN CIENCIAS VETERINARIAS



**GENERACIÓN DE UNA BIBLIOTECA DE ANTICUERPOS
RECOMBINATORIALES ESPECÍFICOS A *Mycobacterium avium* SUBSP.
paratuberculosis MEDIANTE LA TÉCNICA DE DESPLIEGUE EN FAGOS**

TESIS

**COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS VETERINARIAS**

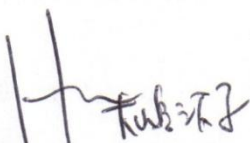
PRESENTA:

LUIS ARMANDO CAMPOS BARBA

MEXICALI, BAJA CALIFORNIA

OCTUBRE DE 2009

Generación de una biblioteca de anticuerpos recombinatorios específicos a *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* mediante la técnica de despliegue en fagos. Tesis presentada por Luis Armando Campos Barba como requisito parcial para obtener el grado de Maestro en Ciencias Veterinarias, que ha sido aprobada por el comité particular indicado:



Dra. Sawako Oshima Hori K.
Director Principal



Dr. Tomas Renteria Evangelista
Asesor



Dr. Gerardo Medina Basulto
Asesor



Dr. José Luis Stephano Hornedo
Asesor

Mexicali, Baja California a 25 de Agosto de 2009

Agradecimientos

A mi compañera incondicional, la mujer que llegó a alegrarme la vida y ha sido mi pilar, gracias por estar a mi lado apoyándome aun en los momentos difíciles, Laura Te Amo.

A mis padres por su amor y por inculcar en mí que no existen obstáculos imposibles de vencer.

A mi hijo Alex que me ha enseñado la difícil tarea de ser padre.

A mi tutora, la Doctora Sawako Oshima una de las personas que más admiro por su inteligencia y conocimientos, gracias por compartir conmigo sus experiencias, por toda la paciencia y su valioso tiempo dedicado.

A los Doctores Eichii Momotani y José Luis Stephano por que la realización de esta investigación fue posible gracias a ustedes.

A mis asesores, los doctores Tomas Renteria y Gerardo Medina gracias por su colaboración y apoyo.

A mis hermanos porque sé que siempre cuento con ellos.

A cada uno de mis maestros, por su ayuda y conocimientos brindados.

A todas las personas que de una u otra forma, colaboraron o participaron en la realización de esta investigación.

Y finalmente a Dios, por llenar mi vida de dicha y bendiciones guiándome por el camino correcto.

CONTENIDO

	Pág.
RESUMEN	I
ABSTRACT	li
LISTA DE ABREVIATURAS	lii
LISTA DE CUADROS	lv
LISTA DE FIGURAS	v
INTRODUCCIÓN	1
REVISIÓN DE LITERATURA	2
Anticuerpos policlonales contra anticuerpos monoclonales	4
Técnicas de producción de mAbs por fusión de células somáticas de ratón	7
<i>Inmunización</i>	7
<i>Fusión</i>	9
<i>Tamizaje</i>	9
<i>Clonación</i>	9
<i>Producción de mAbs de organismos no murínicos</i>	12
<i>Producción de anticuerpos presentados en la superficie de fagos filamentosos</i>	13
<i>Tamizaje</i>	15
<i>Caracterización y expresión de los anticuerpos solubles</i>	15
<i>Fuentes de biblioteca de anticuerpos</i>	16
<i>Biblioteca de anticuerpos policlonales intacta</i>	16
<i>Inmunopatogénesis de la paratuberculosis</i>	18
<i>Técnicas diagnósticas de paratuberculosis</i>	19
<i>Cultivo</i>	19
<i>Detección de anticuerpos</i>	19
<i>Prueba intradérmica</i>	20
<i>Medición de γIFN</i>	20

<i>Medición de anticuerpos contra MAP</i>	20
<i>Anticuerpos monoclonales contra MAP</i>	21
<i>Desarrollo de la técnica de despliegue en fagos para rumiantes</i>	22
MATERIALES Y MÉTODOS	25
Animales	25
Inmunización	25
Monitoreo de títulos de anticuerpos específicos	27
Obtención de genes de anticuerpos	29
<i>Obtención de RNA total</i>	29
<i>Obtención de DNA complementario</i>	30
Amplificación selectiva de genes de anticuerpos	30
<i>Amplificación y purificación de cadena ligera</i>	30
<i>Amplificación y purificación de cadena pesada</i>	32
<i>Amplificación y purificación del fragmento variable de cadena sencilla (scFv)</i>	32
Generación de la biblioteca de genes de anticuerpos recombinatoriales	32
<i>Digestión de DNA de scFv</i>	32
<i>Purificación y digestión del vector pComb3X</i>	33
<i>Preparación del fago ayudador M13</i>	33
<i>Preparación de Escherichia coli electrocompetente</i>	34
<i>Ligación y transformación de la biblioteca</i>	35
RESULTADOS	36
Inmunización y monitoreo	36
Obtención y amplificación selectiva de genes de anticuerpo ...	36
Generación de la biblioteca de genes de anticuerpos recombinatoriales	40
DISCUSIÓN	46
CONCLUSIONES	49
LITERATURA CITADA	50

LISTA DE CUADROS

Cuadro		Pág.
1	Características de isotipos de los anticuerpos (inmunoglobulinas) ...	6
2	Ventajas y desventajas en producción y aplicación de los anticuerpos monoclonales y policlonales	8
3	Aplicación de los anticuerpos monoclonales	11
4	Resumen de estudios serológicos de PTB	23
5	Iniciadores sintetizados utilizados en el experimento	31
6	Resultados de las transformaciones realizadas para la determinación del tamaño total de la biblioteca	45

LISTA DE FIGURAS

Figura		Pág.
1	Estructura de anticuerpo intacto, fragmento de Fab y fragmento de scFv	3
2	Organización de Genes de Anticuerpos	5
3	Procedimiento de Producción de mAbs mediante fusión de células somáticas (hibridomas)	10
4	Obtención de los genes de inmunoglobulinas mediante la técnica de despliegue en fagos	14
5	Fago filamentoso. Ciclo biológico y estructura proteica	17
6	Instalaciones y animales inmunizados	26
7	Inmunización y muestreo para medición de títulos de anticuerpos ..	28
8	Primer monitoreo de los títulos de anticuerpos específicos a MAP para las gallinas "A" y "B"	37
9	Segundo monitoreo de los títulos de anticuerpos específicos a MAP de las gallinas "A" y "B"	38
10	Obtención de bazo y medula ósea de la gallina "B" para la extracción de RNA total	39
11	Obtención de genes de inmunoglobulina	41
12	Obtención de la biblioteca de genes ligada al vector pComb 3X	42
13	Transformación en <i>E.coli</i> de las muestras ligadas mediante electroporación para la obtención de la biblioteca en el vector pComb 3X	43
14	Colonias de <i>E.coli</i> con plásmido transformadas mediante electroporación	44

LISTA DE ABREVIATURAS

AGID: inmunodifusión en gel de agar

cDNA: DNA complementario

CDR: región determinante de complementariedad

CF: fijación de complemento

C_H: región constante de la cadena pesada

C_L: región constante de la cadena ligera

CMI: Inmunorespuesta mediada por células

DNA: ácido desoxirribonucleico

ELISA: Ensayo inmunoabsorbente ligado a enzima

Fab: fragmento de unión al antígeno

Fc: región constante de inmunoglobulina

FMDV: virus de enfermedad de pie y boca (foot and mouth disease virus)

FR: segmento conservado (framework) de fragmento variable

γ-IFN: gamma interferón

GST: glutathione transferasa

mAb: anticuerpo monoclonal

mRNA: ácido ribonucleico mensajero

MAP: *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*

PCR: reacción en cadena de la polimerasa

PTB: paratuberculosis

RIA: radio inmunoensayo

RNA: ácido ribonucleico

scFv: fragmento variable en cadena sencilla

V_H: región variable de la cadena pesada

V_L: región variable de la cadena ligera

RESUMEN

Generación de una biblioteca de anticuerpos recombinatoriales específicos a *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* mediante la técnica de despliegue en fagos

La paratuberculosis (PTB) es una enfermedad de rumiantes con enteritis crónica, causado por la bacteria *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (MAP). Aunque el mecanismo de transmisión de la enfermedad todavía no se entiende completamente, se considera una enfermedad muy importante dentro de la industria lechera debido a las repercusiones económicas. Los animales infectados secretan MAP en leche y heces desde etapa temprana siendo aparentemente sanos y seronegativos, lo que hace difícil controlar esta enfermedad. La producción de nuevos anticuerpos contra MAP nos podrá ayudar a desarrollar nuevas técnicas de diagnóstico directo, existen pocos estudios donde hayan desarrollado anticuerpos monoclonales (mAb) contra algún epítipo de esta bacteria, por lo anterior en el presente trabajo se construyó una biblioteca de anticuerpos específicos a MAP, para posteriormente poder seleccionar los mAbs de utilidad en diagnóstico e investigación. Para lograrlo se utilizó la técnica de despliegue en fagos logrando obtener una biblioteca de anticuerpos monoclonales en la forma de cadena sencilla de fragmentos variables (scFv). Como fuente de genes de inmunoglobulinas se utilizó una gallina inmunizada con antígenos protoplásmicos de MAP (PPA), la cual tuvo una respuesta elevada de títulos de anticuerpos específicos. Se amplificó el repertorio de los genes de scFv y se ligaron en un vector fagemido pComb3X. Finalmente se transformó en E.coli XL1-Blue y se obtuvo una biblioteca con el tamaño original de 2.3×10^5 . Esta biblioteca servirá para la producción de nuevos mAbs contra antígenos de MAP y con ello será posible el desarrollo de nuevas pruebas diagnósticas con mayor sensibilidad y especificidad por si solas o en conjunto con las demás pruebas existentes, además de tener gran potencial en la investigación de la inmunopatología de la paratuberculosis.

Palabras Claves: paratuberculosis, mAb, desplegamiento en fagos

ABSTRACT

Generation of a recombinant antibody library specific to *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* by using the phage display technique.

Paratuberculosis (PTB) is one of the chronic enteritis diseases in ruminants, which is caused by the bacteria *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (MAP). Although the immunopathology of the disease is not well described yet, PTB is one of the most important diseases in the dairy industry because of its significant economic loss. The infected animals excrete MAP in milk and feces in initial stages of infection being apparently healthy and seronegatives, which makes it difficult to control this disease. Production of novel antibodies against MAP would be helpful to develop new diagnostic techniques by direct detection of pathogen; however, very few studies have been reported so far as respect the novel anti-MAP monoclonal antibody (mAb). The objective of this study was to construct an antibody library specific to MAP for future use in selecting appropriate mAbs for diagnosis and research. We employed the phage display technique to produce monoclonal antibodies in the form of single-chain variable fragment (scFv). As a source of immunoglobulin genes we used one chicken immunized with protoplasmic antigen of MAP (PPA) which showed the elevated response of specific antibody titer. Total repertoire of scFv genes were amplified and ligated to the phagemid vector pComb3X. Finally E.coli XL1-Blue was transformed and the library with the original titer 2.3×10^5 was obtained. This library will be used to produce new mAbs against MAP and together with them contribute to develop new diagnostic assays which will be more sensitive and specific by alone or in combination with other assays. Furthermore there is a potential use of new monoclonal antibodies in immunopathological research of PTB.

Key Words: paratuberculosis, mAbs, phage display

INTRODUCCIÓN

La paratuberculosis (PTB) es una enfermedad muy común de los bovinos con enteritis crónica, causada por la bacteria *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (MAP) (Olsen et al., 2002). Tiene repercusiones económicas significativas en los animales severamente infectados. Los más afectados son los becerros menores de seis meses y la ruta de infección más común es la ingestión de la bacteria excretada en heces de animales infectados (oral-fecal) (Jorge et al., 2005). También hay secreción de bacterias en calostro, leche y semen (Collins, 1994), lo que hace difícil su tratamiento ya que los signos clínicos no se manifiestan hasta los dos a cinco años después de la infección por MAP, durante este periodo de incubación, que es la etapa de infección latente, los animales siguen secretando MAP, contaminando los establos e infectando a otros animales.

Para el diagnóstico de la PTB existen diferentes pruebas de laboratorio como reacción Johnina o prueba de la tuberculina, tinción para ácido-resistentes, cultivo celular, pruebas serológicas (ELISA) y pruebas moleculares como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), sin embargo no existe prueba que pueda diagnosticar todas las etapas de PTB con solo una prueba por la variación de la respuesta inmune (Harris y Barletta 2001).

La producción de nuevos anticuerpos monoclonales (mAbs) contra MAP nos puede ayudar bastante ya que pueden ser utilizados como otra prueba diagnóstica sola o en conjunto con las demás pruebas aumentando la sensibilidad y especificidad de estas ya que detectaríamos animales enfermos a edades tempranas, además nos ayudaría a estudiar la inmunopatogenesis de la enfermedad, el desarrollo de una vacuna y el emplear tratamientos adecuados a tiempo.

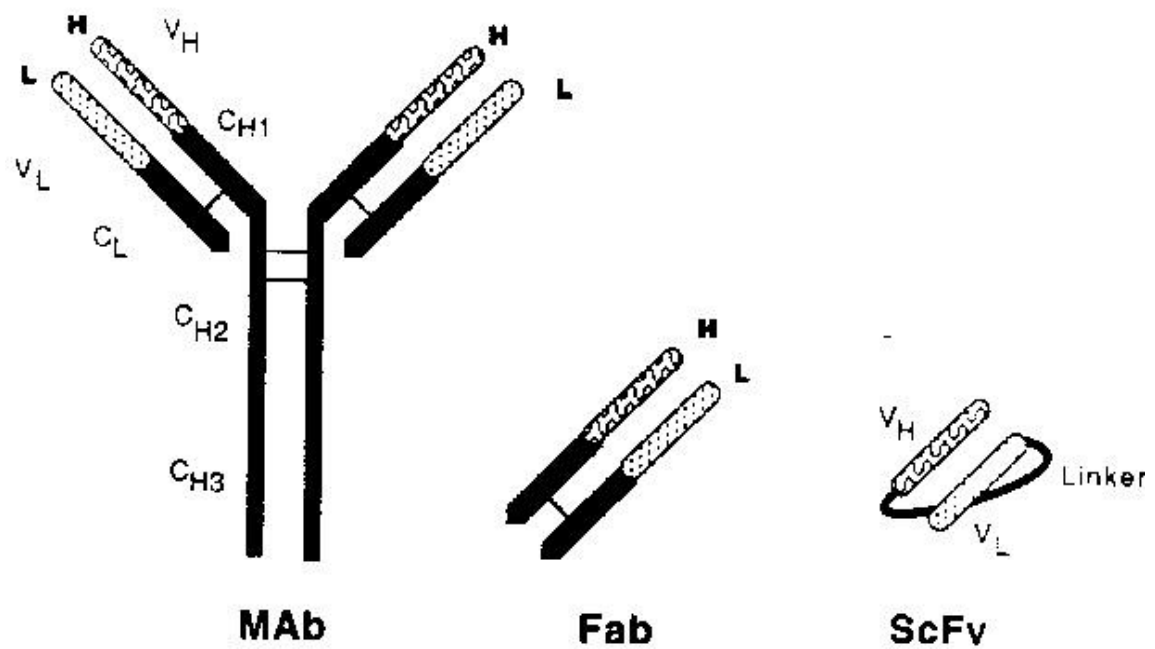
En base a lo anterior el objetivo del presente trabajo fue: construir una biblioteca de anticuerpos recombinatoriales específicos a *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* mediante la técnica de despliegue en fagos.

REVISIÓN DE LITERATURA

Los anticuerpos son un grupo de glicoproteínas también llamadas inmunoglobulinas o gammaglobulinas que forman parte de la inmunidad humoral dentro del sistema inmunológico. Aunque los anticuerpos son muy específicos en su reconocimiento a una estructura de antígeno particular (epítipo), por cristalografía de rayos X se demostró que todos los anticuerpos comparten características estructurales similares (Alzari et al., 1988; Padlan, 1994).

Los anticuerpos están contruidos por dos cadenas pesadas (C_H) y dos cadenas ligeras (C_L). Los anticuerpos intactos contienen dos sitios combinados, los cuáles permiten unirse a antígenos polivalentes o antígenos unidos a una superficie con la fuerza de unión alta. En la figura 1 se muestra un diagrama con la estructura de anticuerpo intacto, así como los fragmentos derivados de anticuerpos intactos utilizados como herramientas en investigación; fragmento de Fab (fragmento para unión de antígeno) y fragmento de scFv (fragmento variable de cadena sencilla).

El fragmento de Fab consiste de los dominios variables y los primeros dominios constantes correspondientes; V_H - C_{H1} y V_L - C_L (Figura 1). Se pueden preparar los fragmentos de Fab por digestión del anticuerpo monoclonal (mAb) con papaína o por la expresión de secuencias recombinantes de Fab en la bacteria *Escherichia coli*. El fragmento de Fab proteolítico y recombinante usualmente tiene la misma afinidad de unión al antígeno (Anand et al., 1991) y termo estabilidad (Alfthan et al. 1993) comparable al anticuerpo intacto. El fragmento de scFv está compuesto solo por los dominios variables de V_H y V_L . El scFv es la estructura más pequeña que mantiene la misma propiedad de unión al antígeno que posee el anticuerpo intacto original. Es difícil producir scFv a partir de anticuerpos intactos, solo se produce scFv estable como un polipéptido expresado en *E.coli* mediante la unión de los dos dominios V_H y V_L con un adaptador de 14-16 aminoácidos (Bird et al., 1988). Las dos cadenas C_H y C_L están compuestas por las regiones variables en su terminal amino (V_H , V_L), seguidos por los aminoácidos iguales o constantes



(Karu et al. 1995)

Mab: anticuerpo monoclonal intacto, Fab: fragmento de unión a antígeno, scFv: fragmento variable (Fv) en cadena sencilla.

Figura 1. Estructura de los anticuerpos.

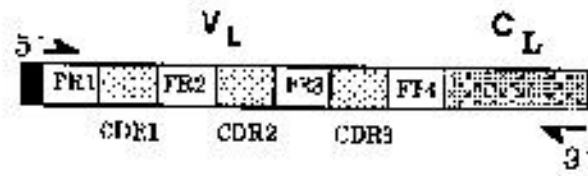
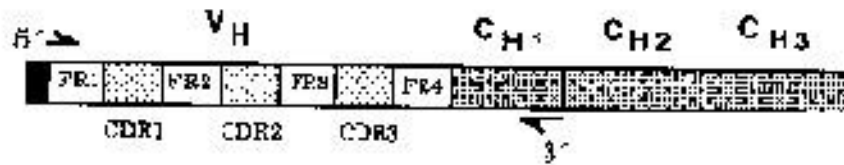
su terminal amino (V_H , V_L), seguidos por los aminoácidos iguales o constantes (C_H , C_L) dentro de la misma clase de anticuerpos (C_H , C_L). Cada V_H y V_L están hechos por los cuatro segmentos relativamente conservados (FR) dividiendo tres regiones hipervariables en secuencia llamadas regiones determinantes de complementariedad (CDRs) (Figura 2). La afinidad y especificidad de los anticuerpos está basada casi totalmente en el tamaño y la secuencia de las regiones CDRs. Los anticuerpos están divididos en clases (isotipos) y subclases como IgG_1 , IgG_{2a} , IgG_{2b} , IgG_3 , IgM , IgA , IgD , IgE (en el caso de ratón), basando sus secuencias y funciones en la región constante (Fc). IgM es producida por los linfocitos B en una forma acoplada a la membrana y actúa como receptor de antígenos. Los otros anticuerpos se secretan por los linfocitos B, los cuáles son estimulados por el antígeno, entre ellos IgG es el principal en la defensa contra infecciones por su memoria de inmunidad. En el cuadro 1 se comparan algunas funciones de anticuerpos de diferentes isotipos (Abbas y Lichtman, 2003).

Anticuerpos policlonales contra anticuerpos monoclonales

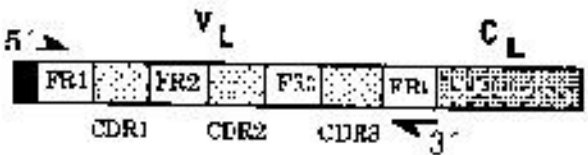
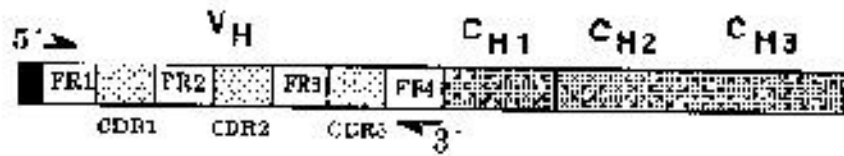
El suero de animales inmunizados por un antígeno contiene gran cantidad de anticuerpos específicos para este antígeno. Estos anticuerpos son heterogéneos ya que son producidos por numerosos clones de linfocitos B y por ello se denominan anticuerpos policlonales (Roitt, 1994).

Es relativamente sencillo producir sueros (anticuerpos policlonales) en grandes cantidades y las técnicas de inmunoensayos han sido basadas en sueros policlonales hiperinmunes obtenidos de conejos, ovejas, u otros mamíferos. Por razones prácticas, el conejo es la mejor opción para producir anticuerpos policlonales, obteniéndose hasta 500ml. de suero de manera segura y fácil. Los anticuerpos policlonales de conejos son bien caracterizados y fácil de purificar (Harlow y Lane ,1988), sin embargo, no ofrecen la consistencia requerida para la aplicación a gran escala o para la producción comercial, además tienen problema por su heterogenicidad.

Fab



Fv



(Karu et al. 1995)

Cuatro regiones constantes (FR) y tres ruedas de determinante de complementariedad en regiones variables (CDRs), dominios constantes de cadena pesada y ligera (C_H y C_L). Las flechas indican las posiciones y direcciones de los iniciadores de oligonucleótidos para la reacción de PCR.

Figura 2. Organización de genes de anticuerpos.

Cuadro 1. Características de isotipos de los anticuerpos (inmunoglobulinas).

	IgG	IgA	IgM	IgD	IgE
Porcentaje total en suero	80%	13%	6%	1%	0.002%
Promedio de vida en suero(días)	23	6	5	3	2.5
Atraviesa la placenta	Si	No	No	No	No
Fijación a complemento	Si	No	Si	No	No
Unión con Fc	Fagocitos	Fagocitos	Linfocitos B	Linfocitos B	Basófilos y Células Mast
Función biológica	Inmunidad a largo plazo, anticuerpos de memoria	Secreción de anticuerpos en membranas mucosas	Primer respuesta al antígeno, puede ser receptor de células B	Receptor sobre las células B	Alergias e infecciones por parásitos

(Modificado de Park y Talaro, 2002.)

Los anticuerpos monoclonales (mAbs) son aquellos que se sintetizan a partir de un único clon de linfocito B además de tener una especificidad única y definida. Debido a su homogeneidad, especificidad y disponibilidad en cantidades sin límite, los mAbs son usados extensamente en investigación, diagnóstico y tratamiento de enfermedades infecciosas y cáncer (Roitt, 1994) (Cuadro 2).

Técnicas de producción de mAbs por fusión de células somáticas

En 1975 Köhler y Milsten describieron un método para la immortalización de linfocitos B murínicos secretores de anticuerpos con especificidad predeterminada mediante la fusión con células murínicas de mieloma.

Este descubrimiento revolucionario fué fundamental para la producción de anticuerpos monoclonales (mAbs) específicos a amplio espectro de complejos de antígenos o péptidos. Su teoría y protocolos se han discutido en varias revisiones. El ratón es la mejor opción de fuente de híbrido y es el hospedador más comúnmente utilizado para generar mAbs. La rata también ha sido exitosa y es buena como una segunda opción (Harlow y Lane, 1988).

Barbas et al., (2001), describe el procedimiento esquemático representativo de la fusión de células somáticas o híbrido de la siguiente manera:

Inmunización. Ratones de laboratorio (generalmente la línea BALB/c) son inmunizados en un pie con antígenos combinados con adyuvantes. A tres semanas se realiza la segunda inmunización vía intraperitoneal. Diez días después se analizan los sueros por Radio Inmunoensayo (RIA) o Ensayo de Inmunoabsorbente-Ligado a Enzima (ELISA) para determinar la respuesta inmune. Una vez obtenidos los títulos aceptables en suero, se realiza la última inmunización de refuerzo por vía endovenosa en la cola.

Cuadro 2. Ventajas y desventajas en producción y aplicación de los anticuerpos monoclonales y policlonales

	Anticuerpos Monoclonales	Anticuerpos Policlonales
Equipo y experiencia requeridos	Considerable	Sencillo
Horas de trabajo	Considerable	Pocas
Cantidad de Anticuerpos	Abundante	Moderado
Durabilidad de la Fuente	Permanente	Temporal
Pureza de los Anticuerpos	Alta	Baja
Especificidad y Afinidad	Puede ser alta ó baja	Varios productos y la mayoría con alta especificidad
Como inmunoabsorbente	Excelentes parámetros operacionales	Hay problemas relacionados al rango de afinidad

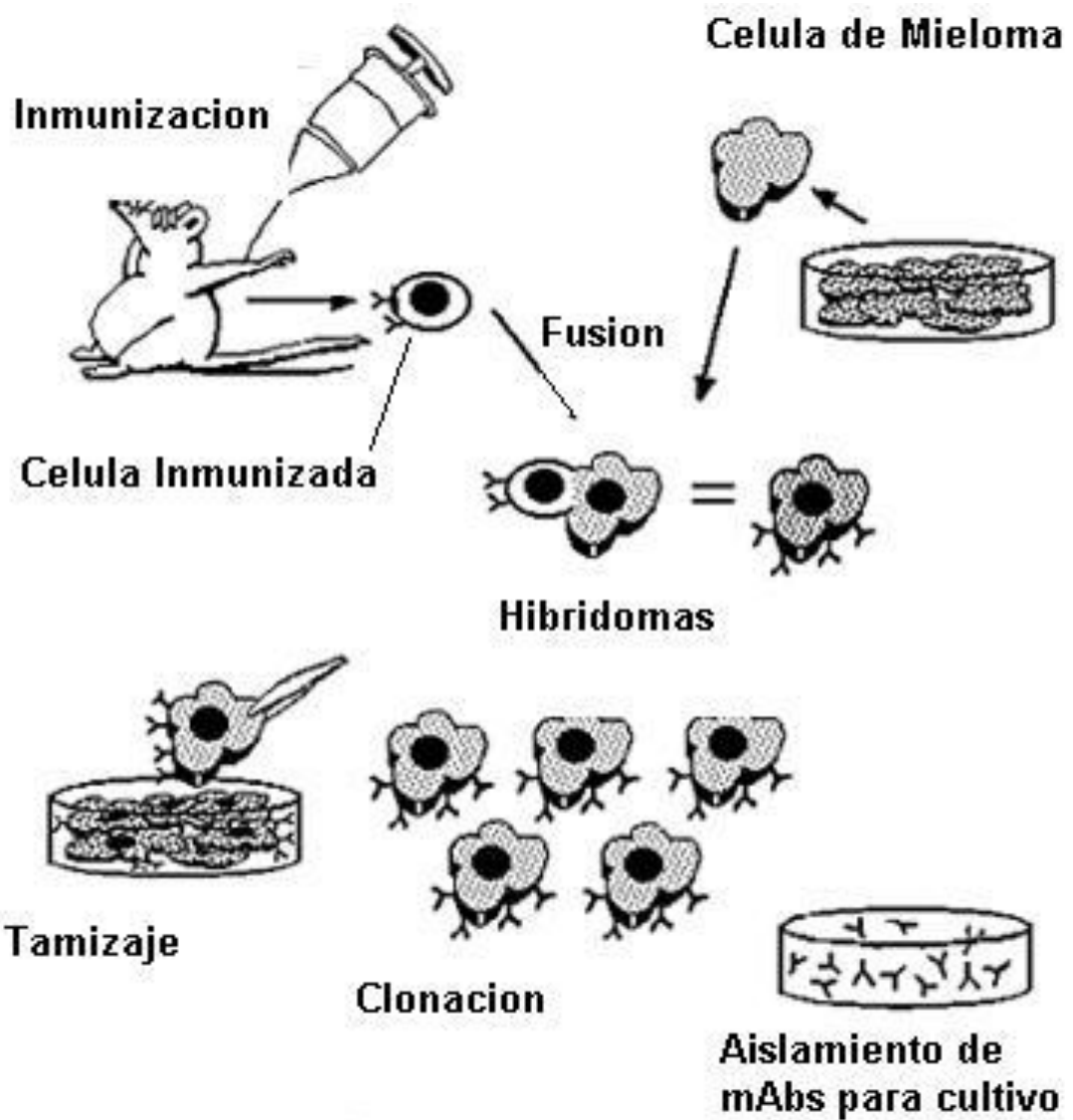
(Modificado de Scopes, 1994)

Fusión. Cuatro días después, se sacrifica el ratón y se obtiene esplenocitos y se fusionan con la cepa de mieloma utilizando polietilenglicol (PEG) para producir las células híbridas de linfocitos B y mieloma, llamadas hibridoma. Los hibridomas resultantes se cultivan en un medio especial que contiene Hipoxantina, Timidina, y Aminopterina (medio de HAT), mientras otras células no fusionadas no sobreviven en el medio de HAT debido a que son deficientes de una enzima requerida para la vía rescate de síntesis de nucleótidos y no pueden utilizar Hipoxantina ni Timidina cuando la vía normal está bloqueada por Aminopterina.

Tamizaje. En dos semanas, se obtiene suficiente cantidad de cultivo de hibridoma en cada pozo de la placa de ELISA, y se seleccionan sus sobrenadantes para identificar clones secretores de mAbs específicos al antígeno. Para este tipo de ensayo existen numerosos métodos dependiendo del interés de los investigadores, como ELISA directa, indirecta o de célula total, inmunoprecipitación, e inmunoblot.

Clonación. A partir de los pozos positivos, se clonan un tipo de hibridomas por el método de dilución limitada o de fase de agar. Este proceso se realiza generalmente dos veces para asegurar la homogeneidad del hibridoma (Figura 3).

Una vez que se obtenga un clon de hibridoma, se debe congelar para su almacenamiento, y por otro lado se producen gran cantidad de mAbs por cultivo celular o por amplificación de hibridomas en el fluido peritoneal de ratón. La cantidad de mAbs sintetizadas en hibridoma es variable y su concentración en el sobrenadante del cultivo varía desde 10-20 µg/ml hasta 100µg/ml, pero en el caso de hibridomas cultivados en la cavidad peritoneal de ratón de la misma compatibilidad de MHC (Complejo Mayor de Histocompatibilidad) pueden llegar hasta una concentración de 10mg/ml (Grimaldi y French, 1995). Posteriormente se caracterizan las propiedades estructurales y químicas de mAbs obtenidos, como determinación de



(Hybridoma shared facility, <http://www.mssm.edu/>)

Figura 3. Procedimiento de producción de mAbs mediante fusión de células somáticas (hibridomas)

Cuadro 3. Aplicación de los anticuerpos monoclonales

Uso en:	Función:
Investigación	• Marcadores inmunofluorescentes de la superficie celular (marcadores de CD) • Inmunohistoquímica • Separación celular mediante muerte o tamiz • Separación inmunoquímica (afinidad cromatográfica) • Estudio de la estructura del complejo antígeno-anticuerpo mediante difracción de rayos X • Estudio de la diversidad de anticuerpos • Estudio de los ideotipos de anticuerpos
Clínica	• Usos terapéuticos en cáncer, trasplantes o enfermedades autoinmunes • Usos terapéuticos, ingeniería genética de anticuerpos
Diagnóstico	• Ensayos mediante ELISA o RIA • Diagnóstico por inmunohistoquímica /inmunofluorescencia

(Modificado de Osaki, 1994)

isotipos, estudio cinético de la afinidad y la fuerza de unión de anticuerpos, y sus posibles aplicaciones diagnósticas y terapéuticas (Cuadro 3).

En algunos casos, los mAbs son los más deseables, particularmente cuando la meta a largo plazo es su utilización como agentes terapéuticos. Desde el acercamiento al desarrollo del hibridoma, un gran número de mAb de ratón con antígenos de interés terapéutico específico han sido generados y caracterizados. Sin embargo, existen límites severos en su aplicación clínica por el hecho de que los anticuerpos de ratón son altamente inmunogénicos en humanos, especialmente cuando se requiere repetir una administración terapéutica. Una alternativa para superar esta limitación es obtener mAbs de ratones inmunizados y convertir las secuencias de anticuerpos de ratones en secuencias de anticuerpos humanas (humanización) sin que tengan una respuesta inmune anti-inmunoglobulina cuando es administrado en humanos como terapia inmunopasiva, y que mantengan su afinidad al antígeno, aunque es usualmente una tarea tardada y costosa aun utilizando las estrategias más recientes de humanización (Rader et al., 1998).

Producción de mAbs de organismos no murínicos

En el campo de la inmunología comparativa, mAbs derivados de especies de organismos hospederos ofrecen varias ventajas sobre la tecnología de hibridoma convencional de ratón. Primeramente, los determinantes antigénicos reconocidos por el sistema inmune natural del hospedero pueden ser diferentes de aquellos inducidos en animales experimentales por vacunación. Por ejemplo, un epítotope de virus de papiloma humano (PV-16) de célula T ayudante en algunas cepas de ratón vacunados no fue reconocido por el huésped natural humano (Frazer y Tindle 1992). Así que mAbs derivados de huésped natural pueden reflejar respuesta inmune auténtica y más precisa que un huésped no natural como ratón. Adicionalmente, estos mAbs pueden ser utilizados como reactivos de opción en experimentos y ensayos diagnósticos si muestran una alta afinidad contra el antígeno. En segundo lugar, un procedimiento utilizado

comúnmente en modelo experimental de ratón, es la administración de mAbs específicos *in vivo* y la observación auténtica *in vitro*. No se puede realizar este tipo de experimento con los mAbs de ratón en los animales no murínicos debido a que existe una reacción causada por el reconocimiento de anticuerpos inmunogenéticos y por la eliminación rápida por el sistema inmune.

En humano se han intentado generar mAbs humanos mediante la tecnología de hibridoma, sin embargo, los datos fueron insatisfactorios debido a baja eficiencia de fusión de las líneas de mieloma humana con células B y baja estabilidad de hibridomas resultantes (Reichert, 2001).

Hubo algunos éxitos para producir mAbs humanos sin utilizar hibridomas, donde se immortalizaron las células mediante la transformación por virus, por ejemplo, virus de Epstein-Barr (Cole et al. 1984). Sin embargo, esta estrategia fue comprobada difícil de aplicar a los animales de producción de importancia económica, especialmente bovinos. En bovinos se encuentran escasos reportes donde hayan producido mAbs mediante la generación de líneas de heterohibridomas, los cuales resultaron con inestabilidad de cultivo (Groves y Tucker, 1989; Suter 1992).

Producción de anticuerpos en la superficie de fagos filamentosos

La tecnología de despliegue en fagos tiene amplias posibilidades de ser utilizada en el diseño de anticuerpos monoclonales dirigidos contra antígenos de patógenos, tanto para vacunas como para sueros de interés (Winter et al., 1994). La base teórica y los protocolos se han discutido profundamente por Barbas III et al. (2001) (Figura 4). Los principales pasos son; la obtención de los genes de anticuerpos y para esto se aísla RNA total de células productoras de anticuerpos, como linfocitos B de bazo o sangre periférica estimulados por antígeno. También, los hibridomas pueden ser fuente de un RNA que predominantemente o exclusivamente codifica un

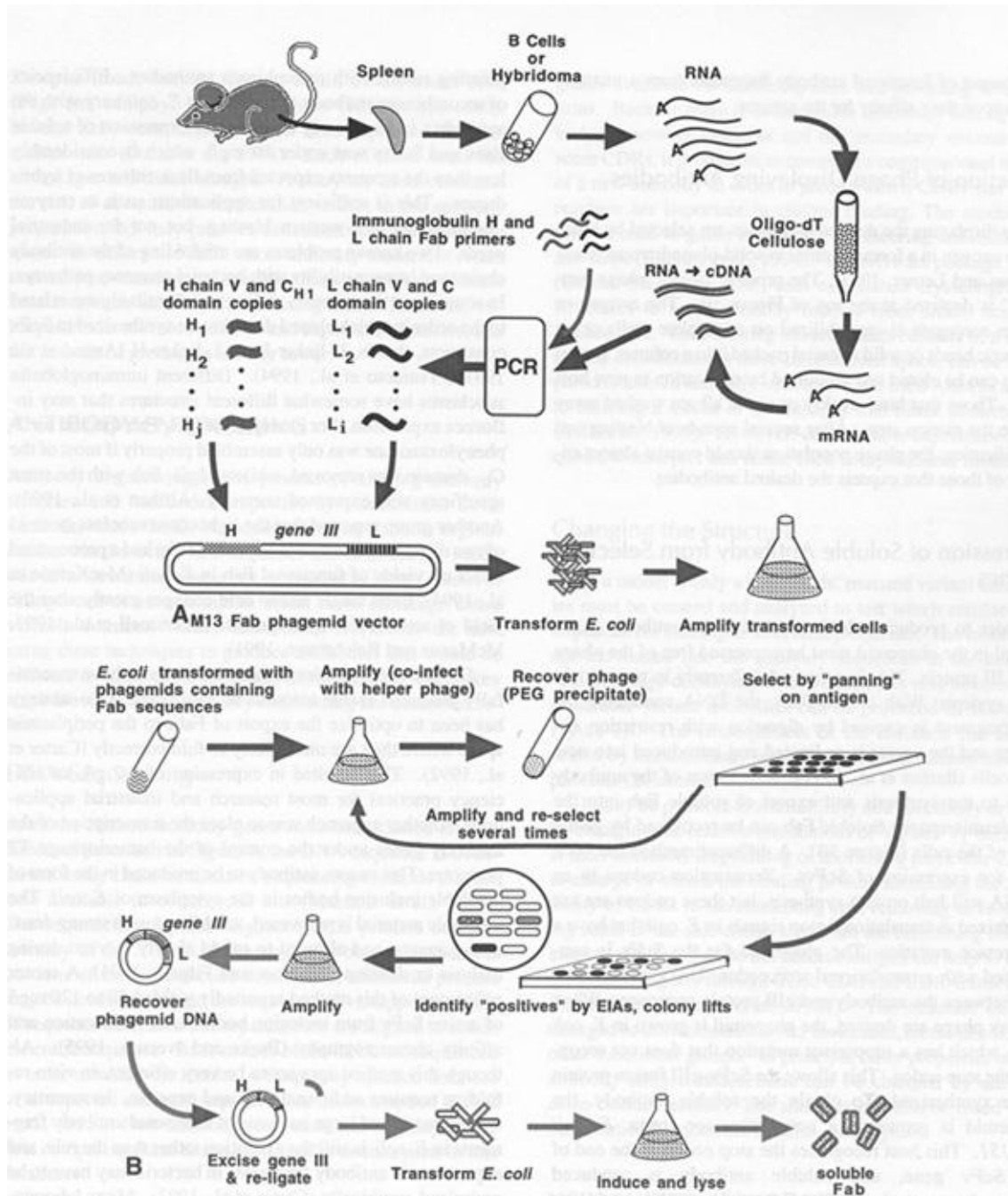


Figura 4. Producción de anticuerpos monoclonales mediante la técnica de despliegue en fagos; a) obtención de los genes de inmunoglobulinas y b) obtención de los anticuerpos monoclonales solubles (Fabs).

único tipo de anticuerpo. Se selecciona mRNA y se obtiene cDNA (DNA complementario) utilizando una enzima transcriptasa reversa. Seguido por la amplificación selectiva de genes de anticuerpos; aquí se amplifican las secuencias correspondientes a Fab o scFv de anticuerpos a partir de cDNA mediante PCR utilizando los iniciadores de oligonucleótidos específicos, el procedimiento de esta amplificación *in vitro* es sencillo pero el diseño de los iniciadores es el punto crítico. De ahí, se realiza la Generación de una librería de genes de anticuerpos recombinatoriales, y para esto se purifican los DNA amplificados por PCR (secuencias de H y L, figura 4A.), se digieren por enzimas de restricción y se clonan en los vectores de fagos. Se utilizan los vectores de fago (bacteriófago lambda), o los variantes fagemidos de bacteriófagos filamentosos no líticos M13, fd, y f1.

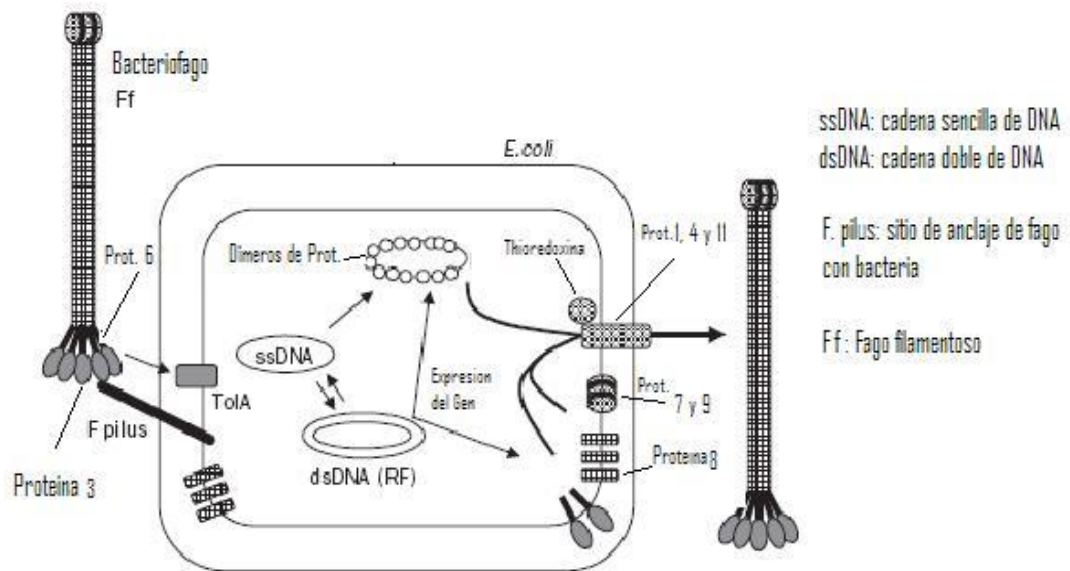
Tamizaje. Se seleccionan los fagos que presentan los anticuerpos de interés mediante la técnica de tamizaje (panning), un proceso similar a inmunoensayo de fase sólida (Barbas y Lerner, 1991). Brevemente se inmovilizan los antígenos o conjugados de haptenos en una fase sólida como placa de ELISA. Después se incuban con la librería total de fagos, y se seleccionan los fagos unidos a la placa para posteriormente amplificarlos en *E.coli*, mientras los otros fagos no unidos se eliminan por lavado. Se repiten varias rondas de este proceso de unión y amplificación de tamizaje (generalmente cuatro rondas). La población de fagos obtenidos debe comprender aquellos que expresen los anticuerpos deseados. Cada fago tiene el potencial de presentar un único anticuerpo (Fab o scFv) específico a antígeno en una forma unida a la proteína de superficie del fago, el cual será el fenotipo seleccionado de interés.

Caracterización y expresión de los anticuerpos solubles. Los anticuerpos en la técnica de despliegue en fagos se presentan en una forma unida a proteínas mayores de superficie de fagos, generalmente la proteína de gen III (gIII). Para expresar anticuerpos solubles de Fabs clonados, el fragmento de gIII se elimina por enzimas de restricción para generar el vector de expresión con solo un fragmento de Fabs (Barbas et al., 1991).

Los Fabs sintetizados en *E.coli* son solubles y se exportan al espacio periplasmático de la bacteria (Figura 5). Para la expresión de scFvs solubles, se utiliza otra estrategia donde se incorpora el codón de terminación “UAG” al sitio de unión de scFv y gIII.

Fuentes de biblioteca de anticuerpos. En la construcción de una librería de anticuerpos por desplegamiento en fagos, existen tres métodos dependiendo la fuente de genes de V_H y V_L que se recombinan para formar anticuerpos específicos. El primero es utilizar células linfoides de animales no inmunizados (Davies et al., 1995), el segundo es utilizar células linfoides de animales inmunizados (Williamson et al., 1996; Yamanaka et al., 1996) y el tercer método es utilizar los hibridomas específicos (Bell et al., 1995). Este último método es conveniente cuando los hibridomas específicos son previamente establecidos (Krebber et al. 1997, Nakamura et al. 2000).

Biblioteca de anticuerpos policlonales intacta. Chen et al. (2003) desarrollaron un sistema para la generación de una biblioteca de anticuerpo policlonal contra glicoproteínas de *Cryptosporidium parvum*. Esta biblioteca combina las ventajas de anticuerpos policlonales convencionales provenientes de antisueros, permitiendo identificar los determinantes antigénicos múltiples, con las ventajas de mAbs, como la disponibilidad de cantidad ilimitada y material genético para la manipulación deseada. El sistema involucra la clonación de repertorio de genes V_H y V_L al vector especial para la expresión de Fab. Estas bibliotecas se pueden convertir a librerías de anticuerpos policlonales de completa longitud, transfiriéndolos a un vector de expresión en células mamíferas para producir IgG, IgA, o IgM de completa longitud (Sharon et al. 2001). Se espera que las bibliotecas de anticuerpos policlonales funcionen como mediadores inmunológicos de células efectoras, y sean utilizadas tanto como tratamiento y diagnóstico de enfermedades.



Modificado de Russel et al., 2004.

Figura 5. Fago filamentoso. Ciclo biológico y estructura protéica.

La tecnología de despliegue en fagos permite el aislamiento de mAb de cualquier especie que se conozca las bases moleculares de sus inmunoglobulinas. Muchos laboratorios han desarrollado los pares de iniciadores que permiten amplificar los genes de anticuerpos correspondientes a secuencias de Fab o scFv desde ratón, humano, conejo, gallina, y otras especies. Esta técnica ha venido a reemplazar la tecnología del hibridoma como método de rutina para la generación de mAb (Winter et al., 1994), incluyendo al humano (Weiner, 2006), camello (Arbabi et al., 1997; Muyldermans, 2001), conejo (Li et al., 2000; Williams et al., 1998), oveja (Li et al., 2000), gallina (Yamanaka et al., 1996; Nakamura et al., 2000), bovino (O'Brien et al., 1999, Kim et al., 2004), y tiburón (Schluter et al., 2005). En gallinas existen grandes ventajas de alta inmunoreactividad para los antígenos de mamíferos, y se secretan grandes cantidades de anticuerpos (IgY) en yema. También tiene una ventaja en la obtención y amplificación de los genes por la sencillez de la estructura de organización de los genes de anticuerpos.

Inmunopatogenésis de la PTB

Durante la infección de *M. avium* subsp. *paratuberculosis* (MAP), en el animal infectado se desarrollan dos tipos de respuesta, la respuesta humoral y la respuesta mediada por células (CMI, “cellular-mediated immune response” por sus siglas en inglés), las cuáles pueden relacionarse con el estado de enfermedad y el tipo de lesión observada. En conjunto, las lesiones de MAP son descritas histopatológicamente como reacciones inflamatorias granulomatosas. Esta clasificación, ha sido a su vez subdividida en manifestaciones histológicas, desde granulomas tuberculoides en casos discretos, hasta lesiones lepromatosas en casos difusos y es basada en una clasificación similar primeramente descrita en lepra (Grange, 1997). La forma tuberculoide de la enfermedad es asociada a una fuerte respuesta CMI temprana en el curso de la infección (Cook et al., 1997; Pérez et al., 1999). Esta respuesta CMI involucra la adhesión y proliferación de células Th1 CD4+, células CD8+, y células monoclonales de sangre periférica que secretan grandes cantidades de citoquinas, incluyendo

gamma interferón (γ -IFN), que pueden ser detectadas serológicamente (Bassey y Collins, 1997; Pérez et al., 1999; Sweeney et al., 1998). Paralelamente, esta respuesta CMI promueve una respuesta proliferativa muy fuerte de las células B a antígenos de MAP (Waters et al., 1999). La forma lepromatosa de la PTB aparece en las siguientes fases de la enfermedad, y está caracterizada por un decremento en la respuesta CMI, y un aumento en la respuesta humoral y los títulos antigénicos están muy elevados (Pérez et al., 1999; Sigurdardottir et al., 1999). Más aún, una transición de la forma subclínica de la infección a la clínica es acompañada por falta de respuesta de las células B específicas contra el antígeno (Waters et al., 1999).

Técnicas diagnósticas de paratuberculosis

Existen diversos métodos de diagnóstico para la detección directa de MAP detectando el organismo directamente en el huésped o de forma indirecta utilizando las respuestas inmunológicas específicas. Actualmente todos los métodos empleados carecen de una buena sensibilidad y especificidad lo que hace que cada método detecta solo alguna etapa de la enfermedad (Whitlock y Buergelt, 1996; Harris y Barletta, 2001).

Cultivo: puede ser de heces o tejido, es la prueba de "oro" se utiliza para comparar con otras pruebas aunque es tardado (al menos 12 semanas) es el método más confiable y utilizado. Aunque se han desarrollado numerosas técnicas para realizar el cultivo, la técnica más empleada es el medio sólido Herrold con yema de huevo y micobactina (HEYM) (Anon, 1985, Morrison, 1965). Otro método más rápido es el uso del medio líquido radiométrico BACTEC 460 (BD biosciences) en el cual el microorganismo puede crecer en solo 9 días y la detección se hace mediante la medición de la radio luminosidad que emiten bajo la lectura de los tubos en la cámara. El inconveniente de este método es que solo identifica que hay crecimiento en el medio pero de momento se desconoce y se requieren de métodos más específicos para determinar el tipo de crecimiento, como el método químico

para determinar la dependencia a micobactina o métodos moleculares para la identificación de la micobacteria.

Prueba intradérmica (reacción Johnina). Actualmente, la prueba intradérmica es la única prueba que permite diagnosticar PTB en etapa temprana hasta 3-6 meses posterior de la infección. Esta prueba evalúa el tipo de reacción de hipersensibilidad tardía en un animal al que se ha infectado por MAP, e indica la respuesta CMI del animal. Sin embargo, recientemente ha surgido problemas en su uso como herramienta diagnóstica de PTB debido a la reacción cruzada antigénica con micobacteria del medio ambiente (Collins, 1997)

Medición de gamma-IFN. Debido a la importancia de determinar el estado subclínico de la infección, investigaciones en esta área han tenido que desarrollar un inmunoensayo (Wood et al., 1990), y un inmunoensayo ligado a enzima (ELISA) (Rothel et al., 1990) que detecta niveles elevados de γ -IFN en respuesta a infecciones por MAP. La evaluación de la prueba de γ -IFN utilizando natural y experimentalmente animales infectados, demostró la utilidad para distinguir animales en etapas iniciales de la infección (Pérez et al., 1999; Stabel, 1996). Sin embargo, en estudios realizados por McDonald et al. (1999), se observó que todos los animales controles no infectados salieron positivos al menos una ocasión durante el desarrollo de las pruebas, sugiriendo que tanto γ -IFN como ELISA necesitaban optimización.

Medición de anticuerpos contra MAP. Actualmente, están disponibles tres pruebas para medir anticuerpos contra MAP en suero de animales infectados, los cuáles son, prueba de fijación de complemento (CF), inmunodifusión en gel de agar (AGID) y ELISA. La sensibilidad de estas pruebas es la más alta en animales con lesiones lepromatosas (Pérez et al., 1997; Shulaw et al., 1993), aquellos con síntomas clínicos (Hilbink et al., 1994; Sweeney et al., 1995), o aquellos que excretan gran cantidad de bacterias (Bech-Nielsen et al., 1993; Sockett et al., 1992).

Entre las tres pruebas, ELISA es la más sensible que AGID y CF (Cocito et al., 1994) y pueden ser utilizadas en rumiantes (Burnside y Rowley, 1994). Pre-absorción del suero con antígenos contra *Mycobacterium phlei* es un método de modificación significativa probada para aumentar la sensibilidad del ELISA (Soto et al., 2002), y actualmente se está empleando en todos los kit comerciales de ELISA. Este paso, remueve los anticuerpos no específicos contra la micobacteria medio ambiental que podría aumentar la reacción cruzada con antígenos de MAP.

Estudios comparativos para las pruebas de CF, AGID y ELISA, repetidamente mostraron discrepancias en la habilidad de estas pruebas para identificar todos los animales infectados (Hilbink et al., 1994; Sockett et al., 1992). Sugden et al. (1997) sugieren que es por las variaciones genéticas en los animales individuales o por la carencia de la representación de antígenos inmunodominantes de rango total para MAP dentro de un ELISA utilizado. Por ejemplo, en un estudio de inhibición realizado por Sugden et al. (1997) con tres kits comerciales de ELISA, se observó la reacción cruzada entre antígeno protoplásmico (PPA-3) de *M. avium* cepa 18 y antígeno polisacárido de lipoarabinomannan (LAM), mientras no se observó la reacción cruzada entre LAM y antígeno crudo protoplásmico de MAP cepa VRI36/102-2 (CTL). La presencia de reacción cruzada entre PPA-3 y LAM indica que estas pruebas de ELISA tienen por lo menos algunos antígenos en común, pero la ausencia de reacción cruzada entre CTL y LAM sugiere la ausencia de antígenos (epítopes) comunes en estas preparaciones de antígenos. Por lo tanto es posible que estas pruebas

comerciales de ELISA solo identifica una porción de la población de animales infectados. (Cuadro 4)(Harris y Barletta, 2001).

Anticuerpos monoclonales contra MAP

Desarrollo de despliegue en fagos para rumiantes. A pesar de que se ha avanzado en los estudios de la enfermedad en animales modelo como ratón, el estudio de interacciones de huésped-patógeno en rumiantes nos proporcionará conocimientos valiosos de bases moleculares, patogénesis e inmunidad. Con este principio, O'brien et al. (1999) desarrollaron pComBov, un vector para expresión de antígenos bovinos en forma fusionada a gIII de fagos filamentosos, y generaron una librería de anticuerpos recombinatoriales desde tejidos linfoides de bovinos inmunizados con el antígeno modelo S-glutación transferasa (GST). Ellos mostraron que la técnica de despliegue en fagos puede ser utilizada exitosamente en bovinos, y que sería aplicable a otras especies en las cuales la estructura de genes de inmunoglobulina es conocida. Al efecto, la similitud de secuencias entre ovejas y bovinos llevó adelante la expresión de Fab de oveja en el vector pComBov después de una modificación menor (Berger et al. 2006). Kim et al. (2004) utilizaron la técnica de despliegue en fagos para estudiar la respuesta del anticuerpo bovino contra el virus de enfermedad de pie y boca (FMDV), construyendo una librería con los Fab obtenidos de bovinos vacunados. Ellos utilizaron también el vector pCombBov (O'brien et al. 1999) y exitosamente generaron Fabs de bovinos específicos a FMDV. La producción de mAbs recombinantes de bovinos o de otros rumiantes definitivamente promoverá los áreas de inmunología comparativa, estudio de enfermedad infecciosa, y productividad de animales por la vía de la inmunomodulación.

Berger et al. (2006) generaron dos clones de scFv a partir de una librería elaborada por los genes de anticuerpos de ovejas inmunizadas con MAP, utilizando el vector pCombBov. La caracterización de dos scFv mediante citometría de flujo mostró sus inmunoreactividades contra MAP. Se identificó mediante inmunoblot una proteína de 34kD como determinante de inmunogenicidad. Los dos anticuerpos fueron específicos a MAP y no mostraron la reacción cruzada a *M. bovis* ni a *M. phlei*, lo cual sugiere el gran potencial de estos anticuerpos como nuevas herramientas diagnósticas.

Cuadro. 4 Estudios de ELISA para detección de paratuberculosis en bovinos.

Antígenos utilizados	Resultados	Autores
Lipoarabinomanan (LAM)	ELISA>>CF, AGID	McNab et al. 1991
MAP total (casera y marca CSL)	ELISA absorbido > ELISA	Cox et al. 1991, Bech-Nielsen 1992, 1993
MAP total (marca IDEXX)	ELISA>>CF,AGID, Alta sensibilidad en casos clínicos	Sockett, et al. 1992, Sweeney et al. 1995
Antígeno protoplasmico PPA-3., MAP total (casera y CSL), LAM	Se cruzan las reacciones entre PPA-3 y LAM. No se cruzan entre antígenos de LAM y de marca CSL.	Sugden et al. 1997
LAM	ELISA de leche y suero comparable. Valor predictivo positivo 74%	Sweeney et al. 1994 Jark et al. 1997
Antígeno total, LAM, 65-kDa heat shock protein (HSP)	Absorción en LAM-ELISA bajo su sensibilidad,. HSP-ELISA fue menos sensitivo.	Darcel y Logan-Handsaeame. 1998
MAP total extraído por etanol	Método EV-ELISA >> ELISA (CSL)	Eda et al. 2006

Bannantine et al. (2007) reportaron la producción y caracterización de anticuerpos monoclonales contra un antígeno recombinante de proteína mayor de membrana de 35kD (MMP) de MAP. MMP es sugerido como un factor virulento de MAP por los mismos autores (Bannantine et al. 2003), y se utilizó como antígeno para producir mAbs mediante la técnica convencional de hibridoma, obteniendo dos hibridomas estables denominados 8G2 y 13E1.

MATERIALES Y MÉTODOS

El estudio se realizó en las instalaciones del Instituto de Investigaciones en Ciencias Veterinarias de la Universidad Autónoma de Baja California, en una área acondicionada en el metabólico para alojar dos gallinas (Figura 6-A), y en los laboratorios de patología, biología molecular y finalmente en el laboratorio de paratuberculosis del Instituto Nacional de Salud Animal (NIAH) de Japón.

El estudio tuvo una duración de dos años, y se utilizó la técnica de despliegue en fagos para generar una biblioteca de anticuerpos recombinatoriales de gallina específicos a MAP. Se decidió utilizar gallinas por la sencillez en la estructura genómica de sus genes de inmunoglobulina, el método se basó en Barbas et al., 2001.

Animales

Se utilizaron dos gallinas de postura sanas de 15 semanas de edad de la raza White Leg-Horn estirpe Hy-Line w36 de la empresa Bachoco S. A. de C. V. (Figura 6-B). Las gallinas se mantuvieron en jaulas individuales en una área restringida del metabólico, bajo techo para protegerlas del sol y por las noches se cubrían con lonas para protección del frío, se alimentaron con alimento comercial para gallina de postura en alimentadores con depósito y agua a libre acceso mediante un dispensador automático.

Inmunización y recolección de muestras

Utilizando una mezcla de 100 µg (en un volumen de 0.5ml) de antígeno protoplasmático de paratuberculosis (PPA) (Allied Monitor, Inc.) más 0.5ml. de adyuvante completo de Freund (Sigma, Cat. # F5881) dentro de una jeringa hasta que se formó una mezcla homogénea de antígenos (Figura 7-A). La inmunización

A



B



A= área de alojamiento las gallinas y B= gallinas leghorn utilizadas para el estudio.

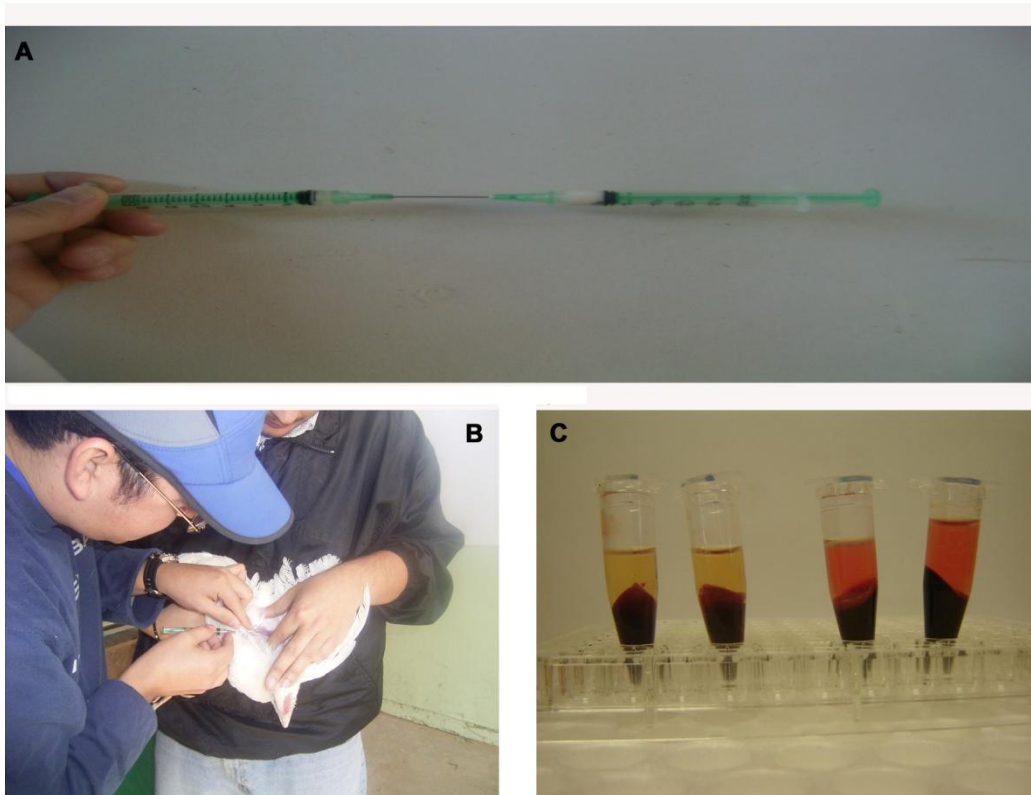
Figura 6. Instalaciones y animales inmunizados.

se realizó en el músculo pectoral aplicando la mezcla del antígeno en tres o cuatro sitios distintos previa asepsia.

Una semana después se tomó una muestra de sangre de cada gallina mediante la técnica de venopunción (Figura 7-B) de la vena radial (alar) de cada animal extrayendo dos mililitros de sangre por ave. Dos semanas después de la primera inmunización, se realizaron inmunizaciones de refuerzo a intervalos de dos semanas con el mismo antígeno PPA (100µg en 0.5ml) más 0.5ml de adyuvante incompleto de Freund (Sigma, Cat. # F5506) en lugar de adyuvante completo. Así mismo se realizaron muestreos una semana después de cada inmunización de refuerzo. En total se realizaron cinco muestreos (1 muestreo preinmune y 4 inmunes) y cuatro inmunizaciones de enero a marzo del 2007. Todas las muestras de sangre se dejaron reposar durante 1 hora a temperatura ambiente y posteriormente se almacenaron a 4°C durante toda la noche para completar el proceso de coagulación. Se separó el suero por centrifugación a 2500g por 15 minutos y se transfirió a nuevos tubos identificados como A y B (Figura 7-C). Todos los sueros se almacenaron a 4°C para medición de títulos de anticuerpos mediante una prueba de ELISA casera.

Monitoreo de títulos de anticuerpos

El monitoreo de los títulos de anticuerpos se realizó en dos ocasiones con una prueba de ELISA casera (previamente optimizada) utilizando el mismo antígeno protoplasmático que se utilizó para las inmunizaciones y se llevó a cabo de la siguiente manera: Se sensibilizó una placa para ELISA de fondo plano de 96 pozos con 50 µl por pozo de antígeno PPA (1 µg) y se colocó a 4°C durante 18 horas. Después de tres lavadas con 300 µl de PBS con 0.5% de Tween-20 (PBST) por 10 minutos se incubaron con 150 µl de solución de leche en polvo (Vons, USA) en PBS al 5% fría durante 30 minutos a 37°C. Se lavó nuevamente con 300 µl PBST tres



A= emulsión de antígeno y adyuvante, B= toma de muestra sanguínea de la vena radial, y C= muestra sanguínea de gallina "A" y "B".

Figura 7. Inmunización y muestreo para monitoreo de títulos de anticuerpos.

ocasiones durante 10 minutos, después se aplicaron 50 µl a cada pozo de los sueros preinmune e inmune diluidos en PBS (1:100, 1:1000, 1:2000, 1:4000, 1:8000, 1:16000, 1:32000 y 1:64000) y se incubo a 37°C por una hora. Se lavo la placa con 300 µl de PBST tres veces por 10 minutos y se aplicaron 50 µl (0.25 µg/ml) del anticuerpo secundario (anti-gallina IgG- HRP, Sigma®, USA) diluido en PBS con 5% de leche en polvo y se incubo una hora más a 37°C. Se enjuago la placa con 300 µl de PBST durante 10 minutos en tres ocasiones y después se lavo en dos ocasiones con 300 µl de agua destilada. Finalmente, se aplicaron 100 µl de sustrato de peroxidasa (50µl solución A y 50 µl solución B de ABST® Peroxidase Substrate, KPL Inc. USA), se cubrió la placa hasta que desarrollo una coloración azul verdosa (de 5 a 10 minutos). Se detuvo la reacción de coloración con 100 µl de SDS al 1% y se coloco la placa en lector de placas de ELISA (Bio-Rad®, modelo 3550, USA) para su lectura de absorbancia a 405 nanómetros (OD₄₀₅). Los valores obtenidos se ajustaron según el valor de OD₄₀₅ obtenido de la misma muestra con antígeno no específico (albumina de suero de bovino).

Obtención de los genes de anticuerpos

Una vez que ya se alcanzaron los niveles de anticuerpos de al menos 1:15000 (1:64000 para la gallina "B") y que ya no hubo aumento de los títulos de anticuerpos, se procedió al sacrificio de las aves en el laboratorio de patología para la extirpación de bazo y medula ósea para extracción de RNA total. El sacrificio se realizo según lo estipula la norma oficial mexicana NOM-033-ZOO-1995 sobre el sacrificio humanitario de animales domésticos y silvestres.

Obtención de RNA total. Se realizó la extracción de RNA total utilizando el kit comercial TRIzol® Reagent (Invitrogen, U.S.A.), con modificaciones en el parámetro de centrifugación para ajustarse a la centrifugadora con que se cuenta en el IICV (Eppendorf®, modelo 5804R, rotores de ángulo fijo F45-30-11 y F34-6-38, Alemania). Brevemente, se colocó el bazo en un tubo de 50 ml de polipropileno conteniendo 10ml del reactivo TRIzol®, se homogenizo con un homogeneizador

(Fisher scientific®, modelo PowerGen 700, USA) durante un minuto y se dejó reposar 5 minutos a temperatura ambiente. Se agregó una vez más 20 ml del reactivo TRIzol® y se centrifugó a 2200g (3500rpm) durante 10 minutos a 4°C. Se transfirió el sobrenadante a un nuevo tubo de 50 ml descartando la pastilla, se agregaron 3ml de cloroformo a cada sobrenadante y se revolvió con el vortex por 15 segundos para después ponerse en incubación por 15 minutos a temperatura ambiente. Se centrifugó nuevamente a 2200g durante 15 minutos a 4°C, y se transfirió la fase acuosa de la superficie a un nuevo tubo de 50ml y agregando 15 ml de isopropanol, se revolvió con el vortex por 15 segundos y se dejó reposar a temperatura ambiente durante 10 minutos más; después, se centrifugó a 9000g (12000rpm) por 10 minutos a 4°C, se retiró el sobrenadante y se pusieron a secar las pastillas a temperatura ambiente; después se disolvió en 500µl de agua libre de RNasas (Molecular Biology Grade Water, Sigma, USA) . La concentración y la calidad del RNA total obtenido se valoró mediante electroforesis en gel de agarosa.

Obtención de ADN complementario (cDNA). A partir de RNA total se obtuvo cDNA mediante una reacción enzimática de transcriptasa reversa utilizando el kit 1st. cDNA Síntesis Kit® (Invitrogen, cat # 12371-190, U.S.A.). Se valoró la calidad de cDNA mediante electroforesis en gel de agarosa, y se cuantificó la concentración por absorbancia de rayos ultravioleta (UV) a 260nm de longitud de onda.

Amplificación selectiva de genes de anticuerpos, cadena ligera y pesada. Se sintetizaron seis oligonucleótidos (Cuadro 5) por la empresa Bioneer, Inc. USA y se utilizaron como iniciadores en los protocolos de PCR.

Amplificación y purificación de cadena ligera. Se amplificó la secuencia correspondiente de cadena ligera de inmunoglobulina de gallina (aproximadamente 350pb) a partir de cDNA mediante PCR utilizando los iniciadores CSCVK y CKJo-B y

Cuadro 5. Iniciadores sintetizados utilizados en el experimento

Iniciador	Secuencia
CSCVK (sentido)	5' GTG GCCCAG GCG GCC CTG ACT CAG CCG TCC TCG GTG TC 3'
CKJo-B (antisentido)	5' GGA AGA TCT AGA GGA CTG ACC TAG GAC GGT CAG G 3'
CSCVHo-F (sentido)	5' GGT CAG TCC TCT AGA TCT TCC GCC GTG ACG TTG GAC GAG 3'
CSCG-B (antisentido)	5' CTG GCC GGC CTG GCC ACT AGT GGA GGA GAC GAT GAC TTC GGT CC 3'
CSC-F (sentido)	5' GAG GAG GAG GAG GAG GAG GTG GCC CAG GCG GCC CTG ACT CAG 3'
CSC-B (antisentido)	5' GAG GAG GAG GAG GAG GAG GAG CTG GCC GGC CTG GCC ACT AGT GGA GG 3'

(Barbas et al., 2001)

el kit comercial Isis™ DNA polimerasa (Qbiogene, cat #EPSIS100), con la siguiente condición del termociclador; un ciclo a 94°C durante cinco minutos, seguido por 30 ciclos de 94°C por 15 segundos, 56°C por 15 segundos, y 72°C durante 90 segundos, y por ultimo un ciclo a 72°C durante 10 minutos, en un termociclador BioRad iCycler. La purificación del fragmento amplificado a partir del gel de agarosa se realizo mediante el uso del kit comercial Ultra Clean™ 15 DNA purification kit (Mo-Bio Laboratories, Inc., cat # 12100-300). La verificación del producto purificado se realizo en gel de agarosa al 1%.

Amplificación y purificación de cadena pesada. Para la amplificación de la cadena pesada (aproximadamente 400pb), se utilizo el par de iniciadores, CSCVHo-F y CSCG-B y el kit comercial Isis™ DNA polimerasa (Qbiogene, cat #EPSIS100), utilizando la misma condición del termociclador que se uso para la amplificación de la cadena ligera. La purificación y la verificación del fragmento se realizaron de la misma manera arriba descrita.

Amplificación y purificación del fragmento variable de cadena sencilla (scFv). Para la amplificación de scFv se utilizaron los iniciadores CSC-F y CSC-B con el siguiente ciclo de temperatura; un ciclo a 94°C durante 5 minutos, seguido por 25 ciclos de 94°C por 15 segundos, 56°C por 15 segundos y 72°C por 2 minutos, y por ultimo un ciclo a 72°C durante 10 minutos, y el fragmento obtenido se verifico mediante gel de agarosa al 1%. Para la purificación se utilizo el kit comercial Ultra Clean™ 15 DNA purification kit (Mo-Bio Laboratories, Inc., cat # 12100-300) y el kit comercial de columnas Q'Aquick Gel Extreccion kit (Qiagen, USA).

Generación de biblioteca de genes de anticuerpos recombinatoriales

Digestión del DNA de scFv. Se digirió el fragmento de scFv en sus sitios de *SfiI* ubicados dentro de la secuencia de los dos iniciadores CSCVHo-F y CSCG-B

utilizando la siguiente fórmula: 50 µl de DNA (130 ng), 15 µl de solución amortiguadora 10×, 1.5 µl de BSA 1%, 68 µl de agua destilada y 15 µl de enzima *SfiI* (300 unidades) (New England Biolabs, USA) mezclando suavemente y se dejó en digestión a 50°C durante toda la noche. Se purificaron utilizando una columna del kit comercial Q'Aquick Gel Extraction kit (Qiagen, USA) y se recuperó el DNA en 50 µl de agua destilada. Se cuantificó en gel de agarosa al 1% y se utilizó como inserto en el paso de ligación de la biblioteca.

Purificación y digestión del vector pComb3X. La cepa de *E. coli* DH5α transformada con el vector pComb3X fue facilitada por el Doctor José Luis Stephano de la Facultad de Ciencias de la U.A.B.C. campus Ensenada. Este vector es un fagemido y está diseñado para expresar los genes de inmunoglobulina de gallina en forma fusionada al gen III del fago filamentoso. Se preparó el DNA plasmídico del vector pComb3X a partir de un medio de cultivo de *E. coli* DH5α utilizando el kit comercial UltraClean™ 25-50ml Plasmid Prep Kit (MoBio Laboratories, Inc., USA). Se eliminó el inserto original del vector pComb3X (nombre de gen pendiente) del tamaño de 1.6kb aproximadamente, mediante la digestión por la enzima de restricción *SfiI* con la siguiente fórmula: 33 µl (20 µg) de DNA plasmídico, 10 µl de solución amortiguadora 10×, 1 µl de BSA al 1%, 46 µl de agua destilada y 10 µl (200 unidades) de *SfiI* durante toda la noche a 50 °C. Después de verificar el grado de digestión se purificó únicamente la banda correspondiente mediante una columna del kit comercial UltraClean™ 25-50ml Plasmid Prep Kit (MoBio Laboratories, Inc., USA), y se utilizó como vector para el paso de ligación.

Preparación del fago ayudador M13. Para la obtención de una calva (zona clara formada por fagos líticos) de fago ayudador M13, se inoculó 2µl de XL1-Blue MRF' en 2 ml de medio de cultivo SB, y se puso en agitación a 250 rpm durante 1 hora a 37°C. Se prepararon diluciones del fago ayudador M13 en medio SB, 10^{-6} , 10^{-7} , y 10^{-8} . Se agregó 1µl de cada una de estas diluciones a 50µl del cultivo de XL1-Blue MRF' dejando incubar a temperatura ambiente durante 15 minutos. Se agregaron 3 ml de LB top agar líquido a 45°C, se agitó con vortex por 5 segundos y

se vació en una placa de LB agar previamente calentada a 37°C. Se incubó durante toda la noche a 37°C hasta que aparecieron las calvas. Utilizando una puntilla de pipeta se transfirió una sola calva de M13 al cultivo de XL1-Blue MRF' de fase logarítmica en 10 ml de medio SB y se puso con agitación a 250rpm y 37°C durante 2 horas. Se vació el cultivo infectado en un matraz Erlenmeyer de 2 litros conteniendo 500 ml de medio SB a 37°C. con kanamicina a una concentración final de 70 µg/ml y se continuó cultivando durante toda la noche. Posteriormente se centrifugó durante 15 minutos a 2500g para recuperar el sobrenadante en un nuevo tubo. Se incubó a 70°C por 20 minutos, se centrifugó nuevamente a 2500g durante 15 minutos para recuperar el sobrenadante como fago ayudador M13 fresco y se almacenó a 4°C.

Para determinar los títulos del fago M13 preparado se prepararon diluciones de M13 con medio SB 10^{-7} , 10^{-8} , y 10^{-9} utilizando 1 µl de cada dilución se infectaron 50 µl de XL1-Blue MRF' en fase logarítmica por 15 minutos a temperatura ambiente. Se agregaron 3 ml de LB top agar a 45°C, se agito con vortex por 5 segundos y se vació en una placa de agar LB y se puso a incubar durante toda la noche a 37°C. Posteriormente se contabilizó el número de calvas de cada placa y se multiplico con la dilución para calcular el titulo de M13 como unidad de formador de calvas (pfu/ml).

Preparación de *Escherichia coli* (*E. coli*) electrocompetente. Se sembró una cepa de *E. coli* XL1-Blue MRF' (Invitrogen, USA) en una placa de agar LB con 30 µg/ml de tetraciclina para aislar una sola colonia de *E. coli* con episoma F'. Se inoculó una colonia en 15 ml de medio SB con tetraciclina a 37°C en un tubo de polipropileno de 50 ml y se puso a crecer durante toda la noche a 250 rpm y 37°C y se utilizó como precultivo hasta un máximo de una semana almacenándolo a 4°C. Se diluyeron 2.5 ml del medio de cultivo en dos frascos de 2 litros con 500 ml de medio SB, 10 ml de glucosa al 20%, y 5 ml de MgCl₂ al 1M, sin antibióticos. Se agitó a 250 rpm y 37°C hasta que la densidad óptica a 600nm (OD₆₀₀) alcanzo 0.7. Después se colocaron en hielo los frascos con cultivo y se centrifugaron durante 15 minutos a 3000g y 4°C. Se retiró el sobrenadante y se resuspendió la pastilla (del volumen

500ml del cultivo original) en 25 ml de glicerol al 10% previamente enfriado, se combinaron las pastillas en un nuevo frasco frío y se ajustó el nivel de glicerol al 10% hasta los 160 ml. y se centrifugaron nuevamente a 3000g por 20 minutos y 4°C. Se removió el sobrenadante y se resuspendió nuevamente la pastilla en 160 ml de glicerol al 10% frío y se repitió este proceso de lavado con glicerol al 10% una vez más, se eliminó el sobrenadante y se resuspendió la pastilla en 8 ml de glicerol frío al 10% hasta que la mezcla quedo homogénea. Se transfirió nuevamente la suspensión a un tubo de polipropileno de 50 ml frío y se centrifugó de nuevo a 2500g por 15 minutos y 4°C. se eliminó el sobrenadante dejando 2 ml, se resuspendió la pastilla con el glicerol restante y se alicuotaron 300µl de células a tubos de 1.5 ml con rosca previamente colocados en un baño de hielo seco con etanol para congelación rápida y se almacenaron a -80°C. Se utilizaron para experimentos preliminares de transformación de la biblioteca debido a su baja eficiencia de transformación (10^7 - 10^8 /ml) comparado con la eficiencia ($> 10^9$ /ml) del producto comercial (Promega, USA).

Ligación y transformación de la biblioteca. Una vez obtenidos y digeridos el producto de PCR extendido (inserto) y el plásmido pComb3X (vector) purificado se procedió a la ligación utilizando la siguiente fórmula: 14 µl (1.4 µg) de vector, 12 µl (12 µg) de inserto y 15 µl de la enzima ligasa (Ligation High ver.2 TOYOBO, Japón) para un total de 41 µl por reacción. Se incubó a 16 °C de 30 minutos a 2 horas. Se purificaron las muestras mediante precipitación por etanol para eliminar el polietilenglicol y se verificaron y cuantificaron las muestras ligadas en el gel de agarosa.

Para la obtención de la biblioteca de genes de inmunoglobulina en fagemido se realizó la transformación de *E. coli* mediante electroporación. Se colocaron el tubo de muestra de la biblioteca ligada, las cubetas (0.2cm, Gene Pulser, Bio-Rad, #1632086, USA) para electroporación y 100 µl de *E. coli* electrocompetente comercial (Promega, USA) en hielo durante 10 minutos sin exceder de 20 minutos. Utilizando una puntilla de 1 ml sin punta, se agregaron las células

electrocompetentes a la muestra de biblioteca ligada, mezclando con la pipeta aspirando y soltando una sola vez suavemente cuidando de no formar burbujas y se colocó en hielo durante un minuto más. Se electroporó utilizando un electroporador Bio-Rad Gene Pulser® con parámetros de 2.5 kV, 25 μ F, y 200 Ω . Se enjuagó inmediatamente la cubeta con 1 ml y después en dos ocasiones más con 2 ml de medio de cultivo SOC (Invitrogen, USA) a temperatura ambiente, y se juntaron los 5 ml resultantes en un tubo de polipropileno de 50 ml y se puso en agitación a 250 rpm durante 1 hora a 37°C. Se agregaron 10 ml de medio SB precalentado a 37°C, y 3 μ l de carbenicilina con una concentración de 100 mg/ml. Además, 30 μ l de tetraciclina a 5 mg/ml. De los 15 ml de cultivo se realizaron dos procedimientos, la titulación y la amplificación de la biblioteca.

Se determinó el tamaño de la biblioteca transformada por titulación de las colonias transformantes. Para esto se diluyeron 2 μ l del cultivo en 198 μ l de medio SB, y se sembraron 100 μ l y 10 μ l de esta dilución (equivalente a 10 μ l y 1 μ l del cultivo original) en placas de LB con carbenicilina. Se pusieron a incubar las placas toda la noche a 37°C. Se calculó el número de transformantes contando el número de colonias de cada placa multiplicado por el volumen total de cultivo y dividido entre el volumen sembrado del cultivo original en la placa.

Para la amplificación se continuó con la agitación de los 15 ml de cultivo a 250 rpm durante 1 hora a 37°C, después se agregaron 4.5 μ l de carbenicilina, y se puso en agitación durante 1 hora más a 250 rpm y 37°C. Se agregaron 3 ml de fago ayudador M13 (con el título aproximado a 5×10^{12} pfu/ml) y se transfirió a un matraz de 500 ml, se agregaron otros 183 ml de medio SB precalentado a 37°C, 92.5 μ l de carbenicilina y 370 μ l de tetraciclina y nuevamente se colocaron en agitación los 200 ml de cultivo a 300 rpm por 1.5 – 2 horas a 37°C. Se adicionaron 280 μ l de kanamicina 50 mg/ml y se continuó agitando a 300 rpm durante toda la noche a 37°C. Al día siguiente, se transfirió el cultivo a tubos para centrifuga de 500 ml y se centrifugaron a 3000 g (aproximadamente 4000 rpm) durante 15 minutos a 4°C. Se transfirió nuevamente el sobrenadante a un matraz estéril y se agregaron 8 gramos

de polietilenglicol 8000 (PEG-8000) y 6 gramos de cloruro de sodio. Se puso en agitación a 300 rpm para disolver los sólidos durante 5 minutos y 37°C y posteriormente se colocó en hielo durante 30 minutos para la precipitación de los fagos filamentosos. Se transfirió el cultivo a dos tubos nuevos para centrifuga de 500 ml y se centrifugó a 15000 g (9000 rpm aproximadamente) durante 15 minutos a 4°C. Se desechó el sobrenadante y se puso a escurrir cada tubo para centrifuga volteándolo sobre una toalla de papel durante al menos 10 minutos, se secó la parte de arriba del tubo con una toalla de papel cuidando de no tocar la pastilla formada. Se volvió a resuspender la pastilla con los fagos en 2 ml de BSA en TBS al 1% pipeteando hacia arriba y hacia abajo por las paredes del tubo. Se volvió a transferir la suspensión a un microtubo de 2 ml se resuspendió completamente con una pipeta de 1 ml aspirando y soltando suavemente sin formar burbujas. Finalmente se centrifugó a máxima velocidad (14000 rpm) durante 5 minutos y 4°C y se transfirió el sobrenadante pasándolo a través de un microfiltro de 0.22µm hacia un nuevo microtubo de 2 ml. Se agregó 0.02% de azida de sodio y se almacenó a 4°C como los fagos de la biblioteca amplificada.

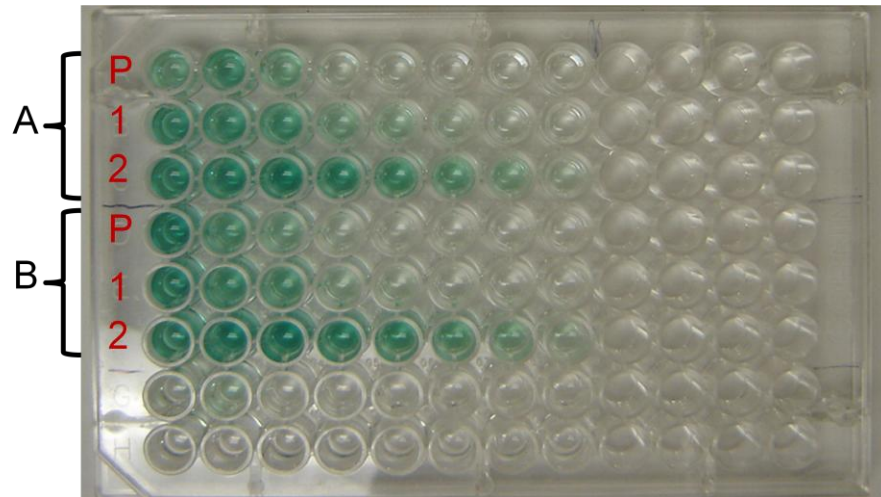
RESULTADOS

Inmunización y monitoreo

Se realizó una inmunización inicial con refuerzos a intervalos de dos semanas terminando el 23 de marzo con el sacrificio de una de las gallinas, en total fueron 4 inmunizaciones. Los niveles de anticuerpos se evaluaron en dos ocasiones mediante una prueba de ELISA casera previamente estandarizada utilizando el mismo antígeno. En el primer ELISA se monitorearon los títulos de anticuerpos hasta la segunda inmunización y se observaron los títulos de anticuerpo para la gallina "a" de $<1:1000$ y para la gallina "b" de $<1:2000$ (Figura 8), en el segundo ELISA se observaron que los niveles de anticuerpos en la gallina "b" aumentaron drásticamente después de la tercera y cuarta inmunización. El título de anticuerpos específicos a antígeno PPA de MAP en la gallina "b" fue de más de $1:64000$ mientras que el título de la gallina "a" fue de $1:15000$ (Figura 9). Debido a que la gallina "b" alcanzo los niveles de anticuerpos deseados se decidió sacrificar para recolección de bazo y médula ósea (Figura 10).

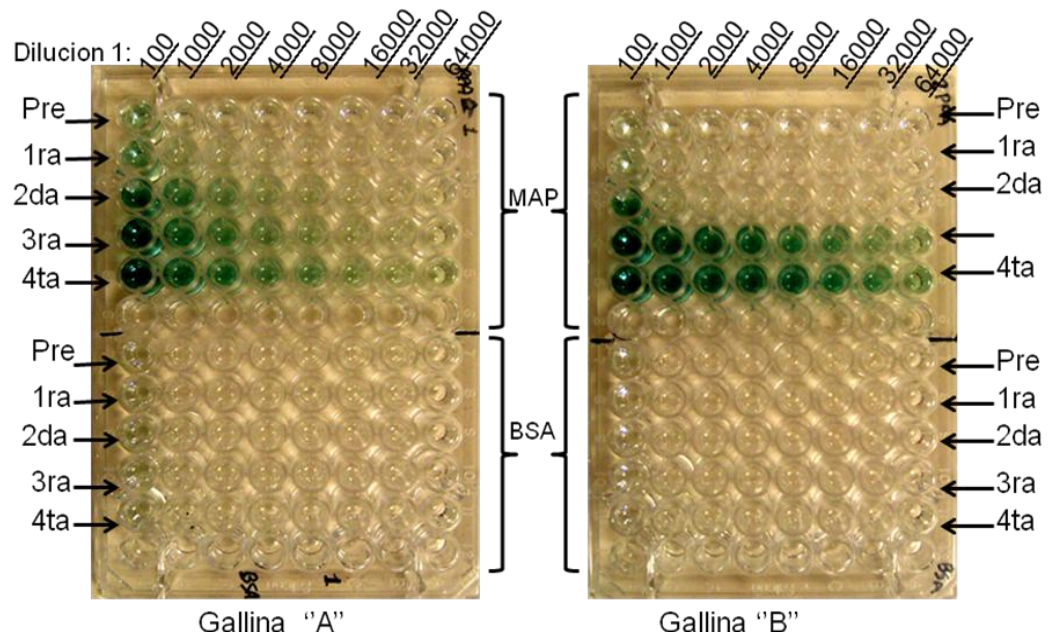
Obtención y amplificación selectiva de genes de anticuerpos

Se realizó la extracción de RNA total a partir de bazo y médula ósea y se confirmó la calidad de RNA total extraído en agarosa al 1%. La presencia de dos bandas de 28S y 18S fue indicativa de la integridad del RNA (Figura 11-A). Se sintetizo cDNA a partir del RNA obtenido y se verifico la presencia de cDNA en el gel de agarosa (imagen cDNA). Se amplificaron los fragmentos de DNA que corresponden a la cadena pesada (H) y ligera (L) del repertorio de genes de inmunoglobulina (IgY) de gallina a partir de la mezcla de cDNA obtenido de bazo y médula ósea. El resultado del PCR mostro la amplificación selectiva de las cadenas H y L, las cuales se encuentran como un conjunto de bandas del tamaño aproximado de 400pb y



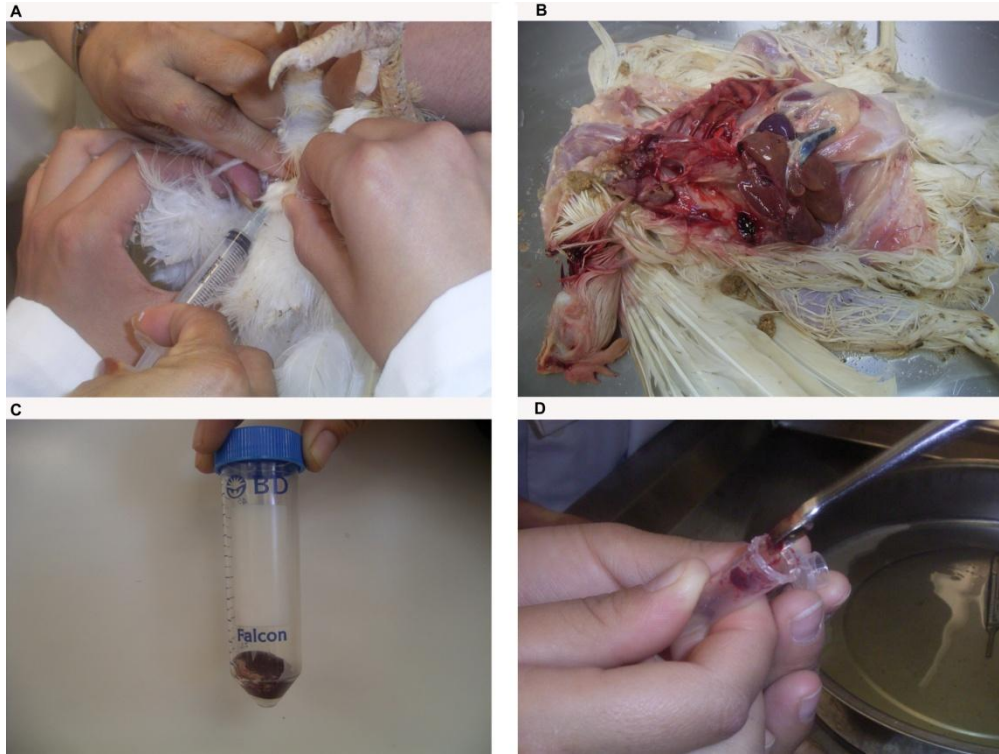
Sueros preinmunes (P), de primera (1) y segunda (2) inmunizaciones.

Figura 8. Primer monitoreo de los títulos de anticuerpos específicos a MAP para las gallinas "A" y "B".



P=sueros preinmunes, 1=primera inmunización, 2=segunda inmunización, 3=tercera inmunización y 4=cuarta inmunización de ambas gallinas.

Figura 9. Segundo monitoreo de los títulos de anticuerpos específicos a MAP de las gallinas "A" y "B".



A= eutanasia, B= necropsia para exposición de órganos abdominales, C y D= obtención de bazo y medula ósea respectivamente.

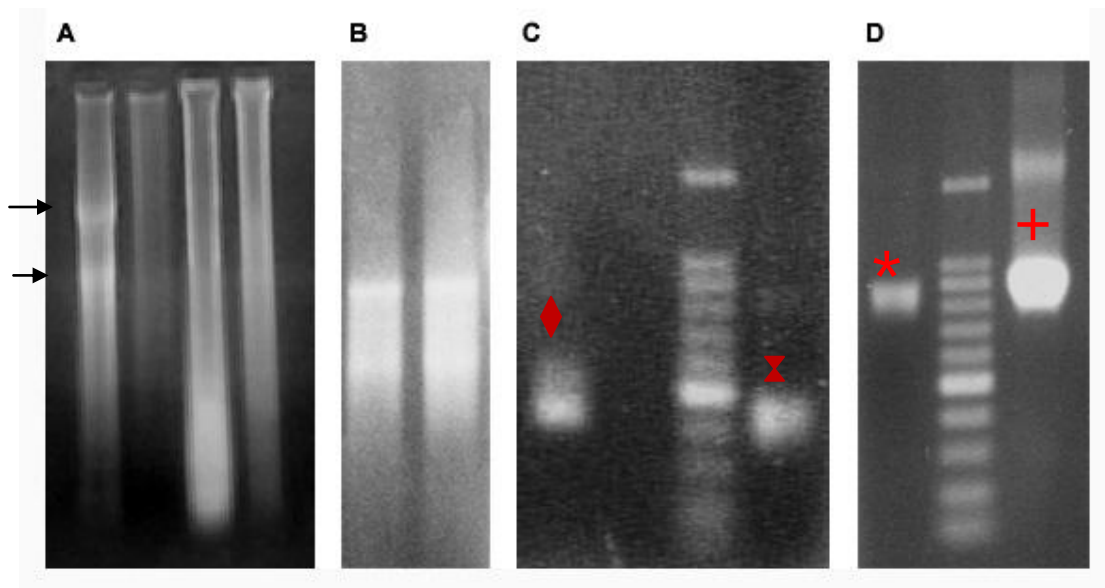
Figura 10. Obtención de bazo y medula ósea de la gallina "B" para la extracción de RNA total.

350pb respectivamente (Figura 11-C). Se hizo la purificación de las dos cadenas recuperadas a partir del gel de agarosa y se utilizaron como DNA molde para la siguiente ronda de PCR. En la segunda ronda de PCR se realizó la amplificación de un fragmento extendido de las cadenas H y L ligadas (scFv). El resultado de PCR mostró la presencia de una banda de aproximadamente 750pb la cual corresponde al repertorio de scFv. Se sometieron a purificación las bandas de scFv a partir de gel de agarosa (Figura 11-D). Se obtuvieron más de 200 µg de scFv purificado (20 µg para digestión enzimática por *SfiI* en el siguiente paso).

Generación de la biblioteca de anticuerpos recombinatoriales

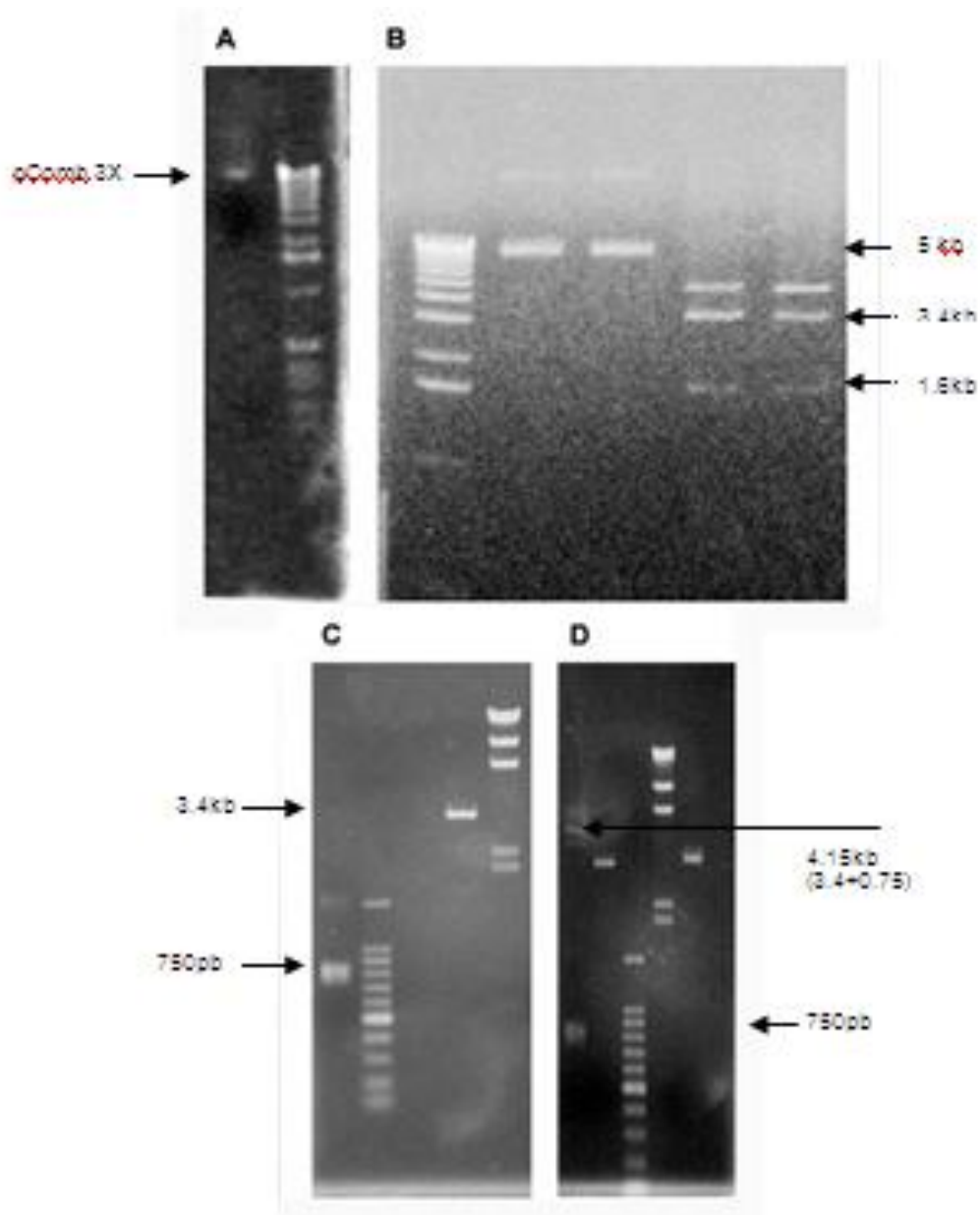
Se realizó la preparación del plásmido pComb3X a escala mediana utilizando 50ml de medio de cultivo de *E. coli* DH5α transformada (Imagen 12-A). Se realizó la digestión para linearizar el plásmido y recuperar solo la parte del vector original (3.4kb) eliminando el inserto original (Figura 12-B). Así mismo se realizó la digestión de scFv purificado y se purificó a partir del gel de agarosa. Después se realizó la ligación de pComb3X y scFv para generar una biblioteca de genes de inmunoglobulina de gallina. Se confirmó la ligación del vector y el inserto mediante electroforesis de gel de agarosa observando un desplazamiento del vector hacia arriba (Figura 12-D). Se transformaron en *E. coli* XL1-Blue MRF' las muestras ligadas para obtener la biblioteca de plásmidos (Figura 13). Se estimó el número total de transformantes sembrando una porción en placas de agar LB. (Figura 14). Este número de transformantes representa el número de repertorio de genes de inmunoglobulina siendo este el tamaño de la biblioteca.

Se realizaron varias transformaciones con diferentes preparaciones de muestras ligadas y solo cuatro transformaciones resultaron validas, con un número de transformantes mayor a 10^4 (cuatro tamaños bibliotecas) y la suma de las cuatro transformaciones resultó en una biblioteca con un tamaño final de 2.3×10^5 .



A= resultado de la extracción de RNA total, B= resultado de la verificación de cDNA a partir de RNA total, C= resultado de la amplificación de DNA de las cadenas pesada ◆ y ligera ✕ obtenidas en la primera ronda de PCR y D= resultado de la amplificación + y purificación * de SCFV obtenido en la segunda ronda de PCR.

Figura 11. Obtención de genes de inmunoglobulina.



A= purificación del vector pComb3X, B= digestión del vector(5kb) para eliminación del inserto original(1.6kb), C= vector digerido(3.4kb) y listo para la ligación con sCFV(750pb), y D= ligación del vector pComb3X con sCFV(total 4.15kb).

Figura 12. Obtención de la biblioteca de genes ligada al vector pComb3X



Figura 13. Transformación en *E. coli* de las muestras ligadas mediante electroporación para la obtención de la biblioteca en el vector pComb 3X.



Figura 14. Colonias *E.coli* con plásmido transformadas mediante electroporación.

Cuadro 6. Resultados de las transformaciones realizadas para la determinación del tamaño total de la biblioteca

Transformación	Tamaño
1	1.1×10^5
2	3.7×10^4
3	7.5×10^4
4	1.5×10^4
total	2.3×10^5

DISCUSIÓN

Se logró obtener una biblioteca de anticuerpos recombinatoriales expresados en forma de fagos con un tamaño final de 2.3×10^5 . El tamaño de biblioteca es el número total del repertorio de anticuerpos originales de la biblioteca, lo cual determina la calidad de la biblioteca construida. El requerimiento del tamaño de la biblioteca varía dependiendo el objetivo del estudio y la condición de los animales o células utilizados. Cuando se utilizan organismos no inmunizados como fuente de genes de anticuerpos se requiere una mayor calidad de biblioteca (ejemplo; el tamaño de biblioteca mínimo) para que se represente la totalidad del repertorio natural de genes de inmunoglobulina. De esta biblioteca, posteriormente se seleccionaran y se obtendrán los anticuerpos específicos al antígeno de interés. En cambio, cuando se utilizan organismos inmunizados por un antígeno se requiere menos tamaño de la biblioteca original para que se puedan obtener los anticuerpos de interés debido a la presencia de una gran cantidad de genes de anticuerpos específicos al antígeno inoculado por la respuesta inmune. En el presente trabajo se utilizó una gallina inmunizada por antígeno de MAP como fuente de genes de anticuerpo. Aunque no alcanzo el tamaño deseado, se confía en que debe haber una gran proporción de fagos que expresen un anticuerpo único específico a antígeno de MAP considerando los elevados títulos de anticuerpos (más de 1:64,000) que mostro la gallina B.

Se decidió utilizar gallinas como fuente de genes de inmunoglobulinas por varias razones de conveniencia, como la disponibilidad del vector fagemido que se había desarrollado específicamente para la clonación de genes de inmunoglobulinas de gallina, así como la facilidad para alojamiento debido al poco espacio que requieren y el poco manejo que necesitan de acuerdo a las condiciones del IICV-UABC. Otra ventaja del uso de gallina es la sencillez en su estructura genómica de genes de inmunoglobulinas, lo cual permite amplificar todos los fragmentos de DNA de cadena ligera, pesada y sCFV utilizando solo tres pares de iniciadores específicos de PCR. Además la gallina posee otras ventajas generales comparado

con otros animales empleados para experimentos de inmunización como conejo y ratón como su alta respuesta inmunológica contra antígenos de origen mamífero, y la facilidad de disposición de anticuerpos policlonales en la yema del huevo.

Para obtener algunos mAb's a partir de la biblioteca construida contra MAP se realizaran series de tamizajes contra el mismo antígeno y contra cualquier otro tipo de antígeno específico seleccionando aquellos que tengan una mayor afinidad.

Debido a que el antígeno de MAP que se utilizo es una mezcla de proteínas (PPA), se producirá una mezcla de anticuerpos monoclonales sin conocer los antígenos que estos reconocerán. Para cada anticuerpo monoclonal, se tendrá que identificar el antígeno (ejemplo; utilizar una biblioteca de expresión de MAP con tamizaje por el anticuerpo para clonar el gen del antígeno) al cual está reconociendo el anticuerpo. Si se logra la obtención de un anticuerpo con una alta afinidad después de los lavados a un pH bajo, independientemente de la naturaleza molecular del antígeno estos anticuerpos serán candidatos para el desarrollo de nuevas técnicas de diagnóstico de MAP.

El antígeno de PPA que se utilizo para la inmunización es la fracción soluble total de MAP, por lo tanto se espera en que debe de presentar una abundante cantidad de anticuerpos específicos a antígenos proteicos de MAP. Una de las proteínas posibles seria p19, se construyo un plásmido que expresa la proteína recombinante de p19 de MAP (Hori, no publicado) con el interés de utilizarse como antígeno sensibilizante de macrófagos de bovinos para estudiar su efecto sobre la expresión de mRNA de las citocinas IL-10 y γ -IFN.

No existe alguna limitante para que los anticuerpos no puedan reconocer específicamente a algunos otros componentes de la pared celular de la bacteria como lípidos y carbohidratos debido a la naturaleza de la técnica de desplegamiento en fagos donde se representa el repertorio original de genes de anticuerpos de gallina.

Estos anticuerpos también podrán ser seleccionados mediante tamizaje para antígenos totales de MAP o antígenos recombinantes de interés diagnóstico o inmunopatológico, y a su vez se podrán producir a gran escala. En caso de obtener anticuerpos específicos, estos se podrán utilizar en el desarrollo de nuevas técnicas de diagnóstico como PCR inmunocapturado, fluorescencia polarizada y flujo lateral.

Existen ciertas ventajas por el uso de vectores de ovinos y bovinos como en el trabajo de Bannantine et al., 2007 y O'Brien et al., 1999, ya que los anticuerpos obtenidos pueden ser empleados directamente para uso terapéutico o como vacuna, sin embargo los anticuerpos producidos mediante el uso de vector de gallina también pueden ser utilizados de la misma manera con el apoyo de la ingeniería genética gracias a las modificaciones que se pueden lograr en estos.

CONCLUSIONES

Se logró la construcción de la biblioteca de anticuerpos recombinatoriales desplegados en forma de fagos con un tamaño original de 2.3×10^5 a partir de una gallina inmunizada con antígeno de MAP.

Esta biblioteca servirá para la producción de nuevos anticuerpos monoclonales contra antígeno de MAP y tendrá gran potencial en el desarrollo de nuevas técnicas diagnósticas o de investigación básica en la inmunopatología de la paratuberculosis.

LITERATURA CITADA

- Abbas, A. K., A. H. Lichtman. 2003. Inmunología celular y molecular. 5^{ta} Ed. ed. ELSEVIER. Madrid, España. p. 43-47.
- Alfthan, K., K. Takkinen, D. Sizman, I. Seppala, T. Immonen, L. Vanne, S. Keranen, M. Kaartinen, J. K. C. Knowles, and T. T. Teeri. 1993. Efficient secretion of murine Fab fragments by *Escherichia coli* is determined by the first constant domain of the heavy chain. *Gene* 128:203-209.
- Alzari, P. M., M-B. Lascombe, and R. J. Poljak. 1988. Three-dimensional structure of antibodies. *Ann. Rev. Immunol.* 6:555-580.
- Anand, N. N., G. Dubuc, J. Phipps, C. R. MacKenzie, J. Sadowska, N. M. Young, D. R. Bundle, and S. A. Narang. 1991. Synthesis and expression in *Escherichia coli* of cistronic DNA encoding an antibody fragment specific for a *Salmonella* serotype B O-antigen. *Gene* 100:39-44.
- Anon. 1985. Laboratory methods in veterinary mycobacteria. The Mycobacteriology Unit, National Veterinary Services, Animals and Plant Health Inspection Service. US Department of Agriculture, Ames, Iowa.
- Arbabi Ghahroudi, M., A. Desmyter, L. Wyns, R. Hamers, and S. Muydermans. 1997. Selection and identification of single domain antibody fragments from camel heavy-chain antibodies. *FEBS Letters*. 414:521-526
- Bannantine, J. P., J. F. J. Huntley, E. Miltner, J. R. Stabel, and L. E. Bermudez. 2003. The *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* 35 kDa protein plays a role in invasion of bovine epithelial cells. *Microbiology* 149:2061-2069
- Bannantine, J. P., T. J. Radosevich, J. R. Stabel, S. Berger, J. T. G. Griffin, and M. L. Paustian. 2007. Production and Characterization of Monoclonal Antibodies against a Major Membrane Protein of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *Clin. and Vaccine Immunol.* 14(3):312-317
- Barbas III, C.F., D.R. Burton, J.K. Scott and G.J. Silverman. 2001. Phage display: a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.
- Barbas, III. C. F. and R. A. Lerner. 1991. Combinatorial immunoglobulin libraries on the surface of phage (Phabs): Rapid selection of antigen-specific fabs. *Methods*. 2(2):119-127. Abs.

- Barbas, III. C. F., A. S. Kang, R. A. Lerner, and S. J. Benkovic. 1991. Assembly of Combinatorial Antibody Libraries on Phage Surfaces: The Gene III Site. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 88:7978-7982
- Bassey, E. O. E., and M. T. Collins. 1997. Study of T-Lymphocyte of Healthy and *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*-Infected Cattle. *Infection and Immunity.* 65(11):4869-4872.
- Bech-Nielsen, S., W. P. Shulaw, P. L. Frandsen, J. B. Jorgensen, P. Ahrens, and N. C. Feld. 1993. Use of a dot Enzyme-linked immunosorbent assay on absorbed sera for the diagnosis of bovine paratuberculosis. *Rev. Sci. Tech.* 12(2):617-627. Abs.
- Bell, C.W., K.B Scholthof, G. Zhang and A.E. Karu. 1995. Sequences of cDNAs encoding the heavy- and light-chain Fab region of an antibody to the phenylurea herbicide diuron. *Gene.* 165:323-324.
- Berger, S., D. Hinz, J. P. Bannantine, and J. T. F. Griffin. 2006. Isolation of High-Affinity Single-Chain Antibodies against *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* Surface Proteins from Sheep with Johne's Disease. *Clin. and Vacc. Immunol.* 13(9):1002-1029
- Bird, R. E., K. D. Hardman, J. W. Jacobson, S. Johnson, B. M. Kaufman, S. M. Lee, T. Lee, S. H. Pope, G. S. Riordan, and M. Whitlow. 1988. Single-chain antigen-binding proteins. *Science* 242:423-426.
- Burnside, D. M. and B. O. Rowley. 1994. Evaluation of an enzyme-linked immunosorbent assay for diagnosis of paratuberculosis in goats. *Am. J. Vet. Res.* 55(4):465-466. Abs.
- Chen, L., B. R. Williams, C. Y. Yang, A. M. Cevallos, N. Bhat, H. Ward and J. Sharon. 2003. Polyclonal Fab phage display libraries with a high percentage of diverse clones to *Cryptosporidium parvum* glycoproteins. *Int. J. Parasitol.* 33:281-291
- Cocito, C., P. Gilot, M. Coene, M. de Kesel, P. Poupart, and P. Vannuffel. 1994. Paratuberculosis. *Clin. Microbiol. Rev.* 7:328-345
- Cole SP, Campling BG, Louwman IH, Kozbor D, Roder JC. A strategy for the production of human monoclonal antibodies reactive with lung tumor cell lines. *Cancer Res.* 1984 Jul;44(7):2750-3
- Collins, M.T. 1997. *Mycobacterium paratuberculosis*: A potencial Food-Borne Pathogen?. Symposium: On-Farm Food Safety. *J. Dairy Sci.* 80:3445-3448

- Cook, W. E., T. E. Cornish, S. Shideler, B. Lasley, and M. T. Collins. 1997. Radiometric culture of *Mycobacterium avium paratuberculosis* from the feces of tule elk. J. Wildp. Dis. 33:635-637
- Davies, E.L., J. S. Smith, C.R., Birkett, J.M. Manser, D.V. Anderson-Dear and J.R. Young. 1995. Selection of specific phage-display antibodies using libraries derived from chicken immunoglobulin genes. J. Immunol. Methods. 186:125.
- Frazer, I. H. & Tindle, R. W. (1992). Cell-mediated immunity to papillomaviruses. Papillomavirus Report 3, 53-58.
- Granje. J. M. 1997. Pathogenesis of Mycobacterial Disease. p145-177 In: P. A. Jenkins and P. R. J> Gangadharan (ed.) Mycobacteria.
- Grimaldi, C. M., and D. L. French. 1995. Monoclonal Antibodies by Somatic Cell Fusion. I.L.A.R. 37(3) Adjuvants and Antibody Production. On Line Publication in: http://dels.nas.edu/ilar_n/ilarjournal/37_3/37_3Monoclonal.shtml
- Groves, D. J., and E. M. Tucker. 1989. The production and application of non-rodent monoclonal antibodies in veterinary science. Vet. Immunol. Immunopathol. 23(1-2):1-14
- Harlow, E., and D. Lane, 1988. Antibodies: A laboratory manual. New York: Cold Spring Harbor Laboratory.
- Harris, N. B., and R. G. Barletta. 2001. *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in Medicine. Clin. Micro. Rev. 14(3):489-512
- Hilbink, F., D. M. West, G. W. deListe, R. Kittelberger, B. D. Hosie, J. Hutton, M. M. Cooke, and M. Penrose. 1994. Comparison of a complement fixation test, a gel diffusion test and two absorbed and unabsorbed ELISAs for the diagnosis of paratuberculosis in sheep. Vet. Microbiol. 41:107-116
- Jorge, M.C., M.J. Traversa, D.M. Schettino, K. Fresneda y M. Mendivil. 2005. Epidemiologia e importancia económica de la paratuberculosis bovina. En: www.produccion-animal.com.ar.
- Karu, A. E., C. W. Bell, and T. E. Chin. 1995. Recombinant antibody technology. ILAR Journal 37(3), Adjuvants and Antibody Production, Online publication (http://dels.nas.edu/ilar_n/ilarjournal/37_3/37_3Recombinant.shtml)
- Kim, Y. J., F. Lebreton, C. Kaiser, C. Cruci re, and M. R mond. 2004. Isolation of foot-and-mouth disease virus specific bovine antibody fragments from phage display libraries. J. Immunol. Meth. 286:155-166

- Köhler, G. and C. Milstein. 1975. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature*. 256:495-497
- Krebber, A., S. Bornhauser, J. Burmester, A. Honegger, J. Willuda, H. R. Bosshard, A. Pluckthun. 1997. Reliable cloning of functional antibody variable domains from hybridomas and spleen cell repertoires employing a reengineered phage display system. *J. Immunol. Meth.* 201:35-55
- Li, Y., J. Kilpatrick and G. C. Whitlam. 2000. Sheep monoclonal antibody fragments generated using a phage display system. *J. Immunol. Meth.* 236:133-146.
- Morrison, N. E. 1965. Circumvention of the mycobactin requirement of *Mycobacterium paratuberculosis*. *Journal of bacteriology*, 89: 762-767.
- McDonald, W. L., S. E. Ridge, A. F. Hope, and R. J. Condrom. 1999. Evaluation of diagnosis test for Johne's disease in young cattle. *Aust. Vet. J.* 77:113-119. Abs.
- Muyldermans, S. 2001. Single Domain camel antibodies: current status. *J. Biotechnol* 74(4):277-302. Abs.
- Nakamura, N., Y. Aoki, H. Horiuchi, S. Furusawa, H. I. Yamanaka, T. Kitamoto and H. Matsuda. 2000. Construction of recombinant monoclonal antibodies from a chicken hybridoma line secreting specific antibody. *Cytotechnology*. 32:191-198.
- O'Brien, P. M., R. Aitken, B. W. O'Niel and M. S. Campo. 1999. Generation of native bovine mAbs by phage display. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 96:640-645.
- Olsen, I., G. Sigurgardottir, and B. Djonne. 2002. Paratuberculosis with special reference to cattle. A review. *National Veterinary Institute*. 24(1):12-28. Oslo, Norway. Abs.
- Ozaki, S. 1994. Cell Lines and Hybridomas. In: *Cellular Immunology*. ed. BIOS Scientific Publishers Limited, St Thomas House, Becket Street, Oxford, UK.
- Padlan, E. A. 1994. Anatomy of the antibody molecule. *Mol. Immunol.* 31(3):169-217.
- Park, T. K. and A. Talaro. 2002. *Foundations in Microbiology*. 4th Ed. ed. McGraw-Hill. New York, U.S.A.
- Perez, V., J. Tellechea, J. J. Badiola, M. Gutierrez, and J. F. Garcia-Marin. 1997. Relation between serologic response and pathologic findings in sheep with naturally acquired paratuberculosis. *Am. J. Vet. Res.* 58:799-803 Abs.

- Perez, V., J. Tellechea, J. M. Corpa, M. Gutierrez, and J. F. Garcia-Marin. 1999. Relation between pathologic findings and cellular immune responses in sheep with naturally acquired paratuberculosis. *Am. J. Vet. Res.* 60:123-127 Abs.
- Rader Christoph, D. A. Cheresch, and C. F. Barbas, III. 1998. A phage display approach for rapid antibody humanization: Designed combinatorial V gene libraries. *Proc. Natl. Acad. Sci* 95:8910–8915.
- Reichert, M. J. 2001. Monoclonal Antibodies in the Clinic. *Nature Biotechnology.* 19:819-822
- Roitt, I. 1994. The Recognition of Antigen: Antibodies p.43-63 In: *Essential Immunology*. 8a ed. Black Well Scientific Publications. University Street, Carlton Victoria 3065, Australia.
- Rothel, J. S., S. L. Jones, L. A. Corner, J. C. Cox, and P. R. Wood. 1990. A sandwich enzyme immunoassay for bovine interferon- γ and its use for the detection of tuberculosis in cattle. *Aust. Vet. J.* 67:134-137. Abs.
- Russel, M., H. B. Lowman and T. Clackson. 2004. Introduction to phage biology and phage display. In: "Phage Display a Practical approach". 4th Ed. Oxford University Press. Oxford, New York, U.S.A.
- Schluter, S. F., I. Jensen, P. A. Ramsland and J. J. Marchalonis. 2005. Recombinant shark natural antibodies to thyroglobulin. *J. Mol. Recognit.* 18:404-412.
- Scopes, R. K. 1994. Protein Purification: principles and practice. 3rd Ed. ed. Springer-Verlag. New York, U.S.A.
- Sharon, J., S. R. Sompuran, C. Y. Yang, B. R. Williams, and S. Sarantopoulos. 2001. Construction of Polyclonal Antibody Libraries Using Phage Display. p101-112 in: *Antibody Phage Display: Methods and Protocols*. Chapman and Hall. Florida.
- Shulaw, W. P., S. Bech-Nielsen, D. M. Rings, D. M. Getzy, and T. S. Woodruff. 1993. Serodiagnosis of paratuberculosis in sheep by use an agar gel immunodiffusion. *Am. J. Vet. Res.* 54:13-19. Abs.
- Sigurdardottir, O. G., C. M. Press, F. Saxegaard, and O. Evensen. 1999. Bacterial isolation, immunological response, histopathological lesions during the early subclinical phase of experimental infection of goat kids with *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *Vet. Pathol.* 36:542-550
- Socket, D. C., T. A. Conrad, C. B. Thomas, and M. T. Collins. 1992. Evaluation of four serological tests for bovine paratuberculosis. *J. Clin. Microbiol.* 30:1134-1139

- Soto, J. P., M. V. Kruze, and S. Leyva. 2002. Comparación de tres métodos de diagnóstico de Paratuberculosis bovina en rebaños lecheros. Arch. Med. Vet. XXXIV. 2:265-273
- Stabel, J. R. 1996. Production of γ -interferon by peripheral blood mononuclear cells: an important diagnosis tool for detection of subclinical paratuberculosis. J. Vet. Diagn. Investig. 8:345-350. Abs.
- Sugden, E. A., K. Stilwell, and A. Michaelides. 1997. A comparison of lipoarabinomannan with other antigens used in absorbed enzyme immunoassays for the serological detection of cattle infected with *Mycobacterium paratuberculosis*. J. Vet. Diagn. Investig. 9:413-417
- Suter, M. 1992. The potential of molecular biology for the production of monoclonal antibodies derived from outbred veterinary animals. Vet. Immunol. Immunopathol. 33(4):285-300
- Sweeney, R. W., D. E. Jones, P. Habecker, and P. Scott. 1998. Interferon- γ and interleukine 4 gene expression in cows infected with *Mycobacterium paratuberculosis*. Am. J. Vet. Res. 59:842-847 Abs
- Sweeney, R. W., R. H. Whitlock, C. L. Buckley, P. A. Spencer. 1995. Evaluation of a commercial enzyme-linked immunosorbent assay for the diagnosis of paratuberculosis in dairy cattle. J. Vet. Diagn. Investig. 7:488-493
- Waters, W. R., J. R. Stabel, R. E. Sacco, J. A. Harp, B. A. Pesch, and M. J. Wannemuehler. 1999. Antigen-specific B-cell unresponsiveness induced by chronic *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* infection in cattle. Infect. Immun. 67:1593-1598
- Weiner, L. M. 2006. Fully Human Therapeutic Monoclonal Antibodies. J. Immunother. 29:1-9
- Whitlock, RH and C. Buergelt. 1996. Preclinical and clinical manifestations of paratuberculosis (including pathology). Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract. 12(2):345-56
- Williams, S. C., R. A. Badley, P. J. Davis, W. C. Puijk, and R. H. Meloen. 1998. Identification of epitopes within beta lactoglobulin recognized by polyclonal antibodies using phage display and PEPSCAN. J. Immunol. Meth. 213:1-17
- Williamson, R.A., D. Peretz, N. Smorodinsky, R. Bastidas, H. Serban, I. Mehlhorn, S.J. DeArmond, S.B. Prusiner and D.R. Burton. 1996. Circumventing to

tolerate to generate autologous monoclonal antibodies to the prion protein. Proc. Natl. Acad. Sci. 93:7279-7282.

Winter, G., A. D. Griffiths, R. E. Hawkins and H. R. Hoogenboom. 1994. Making antibodies by phage display technology. Annu. Rev. Immunol. 12:433-355.

Wood, P. R., L. A. Corner, and P. Plackett. 1990. Development of a simple, rapid *in vitro* cellular assay for bovine tuberculosis based on the production of γ -interferon. Res. Vet. Sci. 49:46-49. Abs.

Yamanaka, H. I., T. Inoue and O. Ikeda-Tanaka. 1996. Chicken monoclonal antibody isolated by a phage display system. J. Immunol. 157:1156-1162.