

**Universidad de La Habana  
Facultad de Biología  
Centro de Estudios de Proteínas**

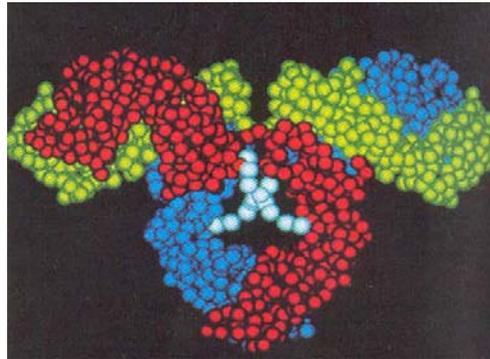


Centro de Estudios de las Proteínas



Facultad de Biología  
Universidad de la Habana

**“Contribución a la Utilización de los Anticuerpos como  
Herramientas Analíticas y Diagnósticas”**



**Anselmo J. Otero González  
Dr. en Ciencias Biológicas**

**Tesis para optar por el grado científico de Doctor en Ciencias**

**La Habana  
2008**

## Agradecimientos y reconocimientos

La primera persona que me hizo estudiar los anticuerpos con verdadera pasión fue mi profesora y amiga Cristina. A ella mi agradecimiento y cariño por su carisma y entusiasmo pegajoso en la enseñanza de la Inmunología y por compartir, años después, los inmunoensayos de Sticholisina.

A Juan B que me llevó al CNIC al inicio y junto a Odelsa, Olguita, María Elena, María Cristina y Salcines me enseñaron, además, Inmunomicroscopía Electrónica. A Freddys que no tiene nada profesional que ver con esta tesis pero era de allí y significó mucho en aquella etapa y será mi amigo siempre. A Tere, a Pepe y a Sarracent por ayudarme en los primeros pasos experimentales. Este último mi tutor de doctorado en Ciencias Biológicas, mi amigo y asesor-colaborador constante. A Silva, Carlos, Ana, Vladi y el Robert (infiltrado de Virología) en el laboratorio de la Pauste por responder siempre mis preguntas inmunológicas y hablar disparates diversos.

Agustín, Rolo, Gavi, Wence, Luís Enrique y Cervantes, al principio y Luz, Carmita, Blanca, Fifi, Cristina, Celita, y todos los demás, después, me acogieron en el INOR y me marcaron un buen camino que sigo transitando con ellos y Coral además, que está siendo imprescindible. A la Faxas por compartir sus ADCC en el Karolinska y por escogerme para ser su finalista tutor de doctorado en la que los anticuerpos son importantes.

A los profesores del Biomedicinska Centrum de Uppsala, Hjerten, Ross, Pertoff, Porath, Johansson (Gunnar y Karl-Erik), por el primer choque con la Bioquímica escandinava.

José Luis, Justo, Marta y Nelson que nos iniciaron a Sarra y a mí en el exigente mundo del SUMA. Con ellos y otros hicimos los primeros monoclonales. A Nidia, Alfonso, el Ponzo e Irelio por todo lo que me ensañaron de cultivo y por ser excelentes amigos. Este último es mucho más que eso, mi cercano y siempre eficiente colaborador permanente y entusiasta.

A Leyva y sobre todo a Boris Luís por el privilegio de haberlo guiado como técnico, diplomante y doctorante, excelente amigo y colaborador. A Voller y a Bidwell por enseñarnos a todos, en La Habana, como hacer bien un ELISA y a McGarrity por mostrarnos su increíblemente sencillo Immunobinding para Micoplasmas y por compartir un juego en el Latino. A Kennett por enseñarme a hacer monoclonales como se hacen a 90 millas, un poco más lejos, en Filadelfia y por invitarme a publicar con él.

A Pentón y a Sierra por compartir con Sarra y conmigo aquellos memorables y aguerridos ELISAs de Interferón que se ponían rojo ladrillo a los 10 segundos de añadido el sustrato y por todo lo demás, después. A Falero por compartir el cultivo de piel humana que nada tiene que ver con esta tesis pero sí mucho con nuestra amistad, por sus triomas y por insistir en que fuera su oponente, lo cual disfruté mucho. A Alonso por todo lo que hablamos y lo que dejamos de hablar cuando se fue. A Pascual que puso Bioquímica fina en nuestros ELISAs a pesar de todo y es parte de esta tesis. Con el Moro Inait aprendí Aterosclerosis y traté de hacer un ELISA de ApoE que casi sale. A Maribona, Miguel, Alberto, Sofía, Raulito, Talía y Vilma en Bioplantas del CNIC por ser el refugio obligado por mucho tiempo y colaborar también. Miriam nunca tuvo que ver con mis anticuerpos y ELISAs pero está aquí, naturalmente.

Al Profe Gustavo por llevarme al IPK. A Chiqui por la confianza de siempre, por compartir sus monoclonales conmigo, y por su amistad. A Morier por enseñarme cultivo muy profesionalmente así como a mis alumnos de 4to Bioquímica por muchos años. A Hermis por estar allí cuando hizo falta. A Liliana, Angelita, Maritza, Marrero, Pedro, Laferté, Ana Margarita, Germán, El Vale, Clarita y Grehete por la buena serología viral y bacteriana que hicimos juntos. A Lupe por su talento, laboriosidad y su dirección. Me sentí entonces y me siento parte de su Departamento de

Virología. A Alan Doyle de Porton Down por enseñarme a trabajar en una colección de células de verdad. A Britta en el CDC de Estocolmo por hacerme parte de su proyecto de vacuna SIDA y permitirme publicar con ella y su grupo midiendo la avidez con avidez. A Luis Enrique por aquellos monoclonales fantasmas del Hospital de Seguro Social de Guayaquil que nos hicieron buenos amigos. A Juanca y Fraga por ser mis excelentes diplomantes en el IPK, bien reflejados en esta tesis. A Raulito y Laura por sus tesis, que las disfruté como asesor.

A Marilyn por ayudarme a regresar a la Facultad de Biología, a Mayra por recibirme con entusiasmo como decana y a Joaquín y Maya por ser siempre maestros. A Carlos por apoyarme a mí y a los antimicrobianos y por los días del Edison, hace mucho tiempo. A Marige por dejarme compartir sus conferencias de Estructura de Anticuerpos y por ser una buena y oportuna amiga. A Susel y Katia por ser mis primeras diplomantes en la Facultad. A Any que además de estar en la dedicatoria se ganó un puesto aquí haciendo ELISAs lipídicos con Dianita que es mi amiga querida, colaboradora, paño de lágrimas y la tutoreé con mucho amor. A Omar, por todo menos por Anabel y a Emir por compartir el cat-ELISA de plasmepsina y por su maestría, en la que no estuve. A Frank porque me llevó al tribunal permanente y me enseñó todo lo que sé de eso y de otras cosas. Al profe John David de Harvard por muy buenos consejos en Inmunología y por dejarme ser su guía en La Habana. A Fabiola, Yoyi, Isel, Mayra, Alberto, Jorge, Lázara, Jorgito, Tirso, Valiente, Maite, Julieta, María Elena, Luzardo, Lien, Yeney, David, Lesly, Aisel, Rady, Oralys, Yamile, Maday, Dagmara, Mirella, Vivian, Rachel, Dayron, Ara, Yasel, Riset, Mey.. A Ilsa, también, por supuesto. A Mónica que comienza ahora conmigo y por los inmunoensayos, que seguro vendrán además de la nueva generación de los antimicrobianos, Uris, Viviana, Gladys, Liena, Mitchel, Ñikie, Mage, Silvi y Annia.

A Maribona, otra vez, por llevarme a Ecuador e introducirme en el Inmunodiagnóstico en banano y en muchas otras cosas más. A todos los mis colaboradores del CIBE en la ESPOL de Guayaquil que trabajaron conmigo en inmunodiagnóstico de Sigatoka, Mauricio, Daniel, Mónica, Danilo y María Isabel. A Luís por saber tanto de Fitopatología y enseñarla con pasión enciclopedista. A Leonor por los anticuerpos que compramos juntos y nunca llegaron. A Leti, además por estar ahí.

Los dos años y medio que pasé en la Comisión Nacional de Grados Científicos fueron una escuela. Entre otras lecciones aprendí como concebir, madurar y escribir una tesis para Doctor en Ciencias. Espero haberlo hecho bien. Mi agradecimiento a todos: Emilio, Lidia, José Roberto, Prieto, Jorge, Prado, Silva, Nereyda, Hugo, Eunice, Julio, Guerra, Castellanos, Peniche, la viceministra Aurora, y los ministros Vecino y Vela. Incluyo con toda intención a Mariano, a Llanio y Lourdes.

Además quiero agradecer, en general, a los directivos del CNIC, IPK y la Facultad de Biología de la UH por darme el espacio y apoyo necesarios para el trabajo.

Finalmente a todos mis alumnos, a los que quiero mucho.

Los que no estén incluidos aquí, sin intención, van a tener un consuelo: nunca olvidaré, más tarde, que no los tuve en cuenta en este momento.

## **Dedicatoria**

A Anabel y a Juan Carlos  
A mis padres  
A Tania

## **Tabla de Contenidos**

<b>1. Introducción</b>	<b>1</b>
1.1. Los anticuerpos. Historia y desarrollo de su conocimiento	<b>1</b>
1.2. Los inmunoensayos y sus posibilidades analíticas	<b>5</b>
1.3. Inmunodetección de agentes infecciosos	<b>8</b>
1.4. Aportes de la tesis e impacto de los resultados	<b>11</b>
<b>2. Tecnología de Hibridomas</b>	<b>15</b>
2.1. Los plasmacitomas y su aptitud para la fusión celular	<b>15</b>
2.2. Promoción del crecimiento de los hibridomas de ratón	<b>20</b>
2.3. Detección primaria de Anticuerpos Monoclonales de ratón	<b>24</b>
2.4. Cuantificación de Anticuerpos Monoclonales de ratón	<b>28</b>
<b>3. Inmunoensayos directos</b>	<b>32</b>
3.1. Electro-inmunoensayos	<b>32</b>
3.2. Inmunoensayos para detectar actividad proteolítica	<b>34</b>
3.3. Inmunoensayos de triple anticuerpo	<b>37</b>
<b>4. Inmunoensayos indirectos</b>	<b>41</b>
4.1. Reveladores del conjugado enzimático	<b>41</b>
4.2. Serología diagnóstica viral con dilución única del suero	<b>43</b>
<b>5. Inmunoensayos de competencia</b>	<b>47</b>
5.1. Evaluación de la avidez en respuestas humorales vacunales	<b>47</b>
5.2. Cuantificación de citolisinas	<b>50</b>
<b>6. Consideraciones finales</b>	<b>53</b>
<b>7. Referencias bibliográficas</b>	<b>57</b>

<b>8. Anexos</b>	<b>73</b>
8.1. Cobertura de la tesis	<b>73</b>
8.2. Artículos científicos en el tema de inmunodetección e Inmnodeiagnóstico	<b>73</b>
8.3. Tesis presentada y libro publicado	<b>79</b>
8.4. Presentaciones en eventos científicos relacionadas al tema de la tesis.	<b>80</b>
8.5. Publicación del texto de la tesis con posterioridad a la defensa	<b>93</b>

## 1. Introducción

### 1.1. Los anticuerpos. Historia y desarrollo de su conocimiento.

Los anticuerpos, junto a las enzimas, constituyen las dos maravillas proteicas de reconocimiento fino en el mundo biológico. Son capaces de contener una información secuencial que, transformada en espacial y funcional, las convierten en protagonistas de dos eventos trascendentales en la evolución: La bio-catálisis y el reconocimiento específico. No es posible exagerar la importancia de estos mecanismos moleculares y, por tanto, de sus efectores directos [1].

Indudablemente que Eduard Jenner en 1796 inmunizando con el virus vaccinia para proteger humanos contra la viruela y Louis Pasteur casi cien años más tarde con sus cepas atenuadas del virus de la Rabia fueron los gigantes de pensamiento que adivinaron y prácticamente, por primera vez, demostraron que el organismo podía "defenderse" de las infecciones con "elementos" que debían estar presentes en los humores corporales [2].

En la misma época en la que Elie Metchnikoff describía la fagocitosis como una respuesta defensiva celular, otros bacteriólogos se percataban de las respuestas del suero de los mamíferos contra los retos microbianos. George Nuttall observó en 1888 que algunas bacterias eran eliminadas por sangre animal defibrinada, lo cual quedó apoyado poco más tarde por la demostración de Hans Buchner de que el suero puede ser definitivamente bactericida después de una exposición previa del animal con los microbios correspondientes, efecto que quedaba abolido mediante calentamiento a 55°C por una hora. En consecuencia este investigador, llamó "alexinas" a la causa directa de esta acción en el suero [3]. Jules Bordet retomó estas observaciones en 1893 mientras estudiaba la lisis de *Vibrio cholerae* en el peritoneo de cobayos inmunizados con cultivos de bacteria muerta (fenómeno Pfeiffer) y demostró que las alexinas de Buchner, que hoy conocemos como complemento, debían tener una contraparte funcional en el suero como elementos específicos que finalmente resultaron los anticuerpos [4].

Genialmente intuidos también por Paul Ehrlich [5] en el siglo XIX, quien nos presentó, además, una elegantísima y adelantada teoría de su generación [6], los anticuerpos fueron originalmente demostrados de forma funcional por Shibasaburo Kitasato y Emil von Behring (primer Premio Nóbel en Medicina y Fisiología) en su relación directa y neutralizante de las toxinas diftérica y tetánica cuando encontraron que animales inmunizados con dosis sub-letales de toxina producían un suero que neutralizaba la toxina y podía conferir protección a animales normales retados con dosis letales. A estas alturas ellos no sospechaban siquiera cual era la estructura química de tales herramientas moleculares [7]. De igual manera las “aglutininas” de Karl Landsteiner responsables del rechazo sanguíneo resultaron, finalmente, ser anticuerpos [8].

Como parte central de la Inmunidad Humoral predicha por Buchner y brillantemente defendida por Ehrlich en su momento [9], los anticuerpos transitaron por etapas difíciles en la interpretación cabal de su estructura y función que fueron naturalmente paralelas al desarrollo de los procedimientos posteriores de purificación y caracterización de las proteínas.

Investigadores agudos como Almroth Wright captaron muy rápidamente (1904), la idea de que los anticuerpos podían circular libremente en la sangre y que llegaban, incluso, a rodear a las bacterias que eran finalmente destruidas por los fagocitos introduciendo así el concepto y el término de opsonización [10].

En los años 20 del siglo pasado Michael Heidelberger y Oswald Avery observaron que aquellas “antitoxinas” de von Behring y Kitasato precipitaban a los antígenos correspondientes y comprobaron que podían ser (o contener) proteínas [11] lo cual fue, años más tarde, confirmado al profundizarse sobre la naturaleza química de la interacción entre los antígenos y los anticuerpos en un detallado estudio realizado por John Marrack y publicado en 1938 [12]. Ya por aquella época Arné Tiselius se dedicaba, visionariamente, en su legendario aparato de electroforesis en fase fluida en Uppsala a comprobar que las proteínas relacionadas a la inmunidad de los conejos se encontraban en la fracción gamma del suero [13].

No fue hasta la década de los 40 en que una mayor claridad funcional pudo ser encontrada en la interacción de los anticuerpos con sus antígenos cuando Linnus Pauling apoyó la clarividente teoría de “llave cerradura” ya antes sostenida por Ehrlich y propuso, sorprendentemente, que más que un enlace químico, esa relación dependía de la forma espacial de acomodamiento. Además afirmó que era caracterizada por fuerzas débiles como las electrostáticas, las de van der Waals y los puentes de hidrógeno introduciendo de forma brillante el concepto de ajuste biomolecular [14], tan trascendental para comprender “la lógica molecular de los seres vivos” al decir de Albert Lehninger [15].

Ya en 1948 son descubiertos los linfocitos B que después de ciertas transformaciones celulares son los responsables directos de segregar anticuerpos funcionales y se tuvo entonces la primera relación citológica para estos efectores moleculares [16]. En la década del 50 Niels Jerne introdujo el concepto de selección clonal [17] que fue certeramente modificado por Mac Burnett ofreciendo, con su propuesta de teoría de la selección clonal [18], una solución ingeniosa y momentánea a la candente controversia entre instrucción y repertorio pre-establecido.

A partir de este momento la atención se concentró, naturalmente, en descubrir la estructura de estas proteínas efectoras de la inmunidad humoral que permitía semejante maravilla de reconocimiento fino. La década del 60 se inaugura con un esclarecedor resultado en el que Edelman y Gally informan acerca de la existencia de la cadena ligera en la estructura de los anticuerpos lo cual apuntó definitivamente a que estas moléculas, como se esperaba, constituían una estructura multimérica [19]. En este trabajo se informaba también la estrecha relación de estas cadenas ligeras con las proteínas segregadas en la orina de los pacientes con mieloma múltiple llamadas proteínas de Bence-Jones en honor a su descubridor Henry Bence Jones en 1845 [20].

Edelman, en sus investigaciones posteriores, llegó a descubrir que las cadenas y pesadas de los anticuerpos estaban unidas por puentes disulfuro [21] y finalmente en Rodney Porter encontró que los anticuerpos tenían un fragmento muy relacionado al

reconocimiento antigénico y por tanto responsable de la especificidad y la afinidad y otro encargado de las funciones biológicas o de destino final de la acción inmune integrada [22]. Ambos investigadores recibieron el premio Nóbel en 1972 por su extraordinario aporte en la explicación de la estructura y función de los anticuerpos.

Estos estudios estructurales se habían limitado a las inmunoglobulinas G y M pero muy rápidamente en 1967 es descubierta la IgA secretora con la expansión de todo un campo de acción efectora de los anticuerpos en las mucosas [23]. Un poco antes había sido descrita la IgD [24] y para completar el cuadro de las clases de inmunoglobulinas, los esposos Ishikasa identifican a la IgE como un anticuerpo estrechamente relacionado con las alergias agudas [25].

En estos momentos, una vez comprendida la estructura y función de los anticuerpos quedaba un asunto realmente intrigante que parecía retar a las bases mismas de la Biología Celular y la Genética Molecular. ¿Cómo era posible la generación de un repertorio de más de 100 millones de especificidades para proteínas con un único y constante arsenal genético celular? Esto no era posible con los conceptos tradicionales de que todas las células tienen “siempre” la misma dotación genética a menos sean que gaméticas o que sufran mutaciones “no naturales”. Susumu Tonegawa [26] demostró que los linfocitos B “reordenan” su dotación genética en la maduración previa al encuentro con el antígeno para dar una brillante explicación inmunogenética a la distribución clonal lo que le valió un premio Nóbel en 1987.

En 1975 Goerge Kohler y Césas Milstein también en un esfuerzo por comprender las bases genéticas de la diversidad de los anticuerpos perfeccionaron las técnicas de fusión celular por complementación y selección bioquímica y de esta manera revolucionaron las investigaciones biomédicas y la Inmunoanalítica con la Tecnología de Hibridomas [27] para generar Anticuerpos Monoclonales (AcMs) por lo que recibieron el Premio Nóbel en 1984.

Posteriores avances tecnológicos y científicos nos han brindado la posibilidad de disponer de anticuerpos catalíticos (“abzimas”) cuando se hicieron realidad las predicciones de Linus Pauling en los años 40 [28] respecto al mecanismo de acción de anticuerpos y las enzimas y llevar adelante la idea de que un paratopo puede ser un “bolsillo catalítico” para un estado de activación [29].

Hoy día los anticuerpos recombinantes y sus fragmentos son una realidad en la Analítica, el Diagnóstico, la Inmunoterapia y la Imaginología llevando el concepto de selección a su estado del arte (selección artificial) y asumiendo que la disponibilidad real del repertorio puede suprimir la necesidad de la inmunización lo cual, en la práctica, sigue siendo un tema muy controversial [30].

Los “intrabodies” o anticuerpos intracelulares se definen como moléculas de inmunoglobulinas que, expresadas intracelularmente, son dirigidas hacia compartimentos subcelulares definidos. Su potencial aplicación terapéutica incluye tumores, agentes infecciosos, trasplantes y otras enfermedades asociadas a una sobre expresión de proteínas o mutagénesis [31].

Finalmente en este recuento histórico de los anticuerpos, los “nanobodies” aparecen como un hallazgo interesante en camellos y llamas que tienen una circulación de anticuerpos simplificados capaces de infiltrar, por su pequeña talla, a una variedad de estructuras tisulares y que pueden ser obtenidas muy eficientemente a bajo costo [32].

## **1.2. Los inmunoensayos y sus posibilidades analíticas.**

Los inmunoensayos son técnicas analíticas que tienen como base la reacción antígeno-anticuerpo la cual introduce un importante elemento de selectividad (especificidad) para moléculas con o sin información antigénica nativa. Hoy día cuenta con niveles de detección inferiores a un nanogramo y las variantes miniaturizadas con sistemas de revelado amplificados están ya bajando el picogramo. Han sido utilizados por más de 50 años para la detección y cuantificación de una amplia variedad de analitos en el

diagnóstico clínico [33], inspección alimentaria [34] y los análisis ambientales [35]. Aunque las versiones originales del inmunoensayo radioisotópico (RIA) [36] y el ensayo de enzima ligada a inmunoadsorbente (ELISA) [37] fueron desarrollados en tubos, la forma más versátil y práctica ha resultado en placas de microtitulación para lectores automatizados durante y después de los años 80s [38].

El futuro inmediato de los inmunoensayos contempla la búsqueda de mayor sensibilidad, automatización, miniaturización con el uso de micro matrices que permitan el análisis de un alto número de muestras [39] y la multidetección con una única muestra [40]. De esta manera existen ya analizadores sofisticados que procesan un alto número de muestras en muy poco tiempo en formatos homogéneos o heterogéneos, en tubos plásticos o pocillos de placas que contienen 96, 384 o 1536 posibilidades analíticas. Con el objetivo de reducir los costos e incrementar la capacidad de procesamiento, hoy es posible, con la ayuda de sistemas de pipeteo piezoeléctrico y producción de tecnología de chips, trabajar con placas de micro titulación de 4 cm<sup>2</sup> y 625 pocillos con volúmenes de 50–100 nL en lo que se ha dado en llamar ensayos de *microspot* o tecnología de *nanochips* con el objetivo final de detectar cientos de analitos en la misma muestra [41]. Sin embargo, en contraste con el análisis de DNA en el cual es posible predeterminedar diferentes especificidades con sondas de nucleótidos químicamente sintetizadas, la generación de anticuerpos para cada analito necesita mucho más trabajo previo. Por ejemplo en el diagnóstico clínico la determinación de numerosos analitos simultáneamente en el mismo *spot* es un problema a resolver [42].

Debido a que un *spot* inmunoreactivo en un *chip* tiene generalmente un área de menos de 10µm<sup>2</sup>, los beneficios primarios de la miniaturización de los inmunométodos es la dramática reducción en el consumo de reactivos como ocurrió con el Sistema Ultra Micro Analítico SUMA en Cuba en los años 80 [43] cuando revolucionó los conceptos de inmunoensayo al reducir el volumen de reacción a 10. También la miniaturización se favorece con la utilización de anticuerpos con especificidad amplia para reconocer patrones estereotipados en lugar de especificidades finas, algo parecido a los que hace la Inmunidad Innata con los patrones asociados a la patogenicidad y naturalmente la

posibilidad de una alta multiplicidad de determinaciones con una única muestra que parece ser el objetivo "dorado" de cualquier multianálisis automatizado. En 1999 Weller y colaboradores [44] informaron de un inmunoensayo óptico con 1600 "spots" en 1.8cm<sup>2</sup> para el control ambiental de diferentes plaguicidas. Con un volumen de 2 nL de solución de anticuerpo a 10µg/mL por "spot" y 1000 "spots" por cada "chip", la cantidad total de anticuerpo utilizado se calcula en solamente 20ng.

Además del multianálisis masivo también es conveniente la posibilidad del unianálisis con tecnología apropiada en lugares donde no hay tecnología costosa y complicada. Las tiras reactivas que corrientemente brindan información semi-cuantitativa derivarán necesariamente al concepto de "inmunosensor" que puede ser definido como un dispositivo en el que un inmunreactivo se encuentra íntimamente relacionado a un transductor físico-químico o de otro tipo. Mientras los sistemas de inmunosensores comercialmente disponibles como BIAcore (Biosensor, Uppsala, Suecia) e Iasys (Affinity Sensors, Cambridge, UK) son extremadamente caros, y complejos desde el punto de vista técnico, han tenido éxito en proyectos de investigación para estudiar cinéticamente reacciones de afinidad, los intentos de popularizar sistemas biosensores para uso común o personal no están a la vista. Los dispositivos inmuno-electroquímicos son generalmente baratos, sensibles, miniaturizables y no demandan fuente de energía independiente parecen ser el futuro inmediato de estas aplicaciones. Ejemplos de ello son el sensor enzimático de tamaño de bolígrafo MediSense Pen 2 de Abott (E.E.U.U) y Biosen (EKF, Magdeburg, Alemania) para la determinación de glucosa. Si los transductores electroquímicos pudieran ser utilizados de una manera similar a los inmunoensayos o a los inmunosensores, seguramente encontrarán su nicho de mercado especialmente para muestras muy coloreadas u opacas que dificultan su análisis espectrofotométrico en un ensayo homogéneo [45]. Los directivos de la empresa Tecno-SUMA de Cuba acaban de anunciar públicamente una próxima incursión en este sentido.

### **1.3. Inmunodetección de agentes infecciosos.**

La cantidad de personas afectadas por enfermedades infecciosas es alarmantemente elevada y el grado de miseria que generan es tan dramático que supera callada y cotidianamente los terribles efectos de cualquier catástrofe o tragedia natural de otro tipo que ocurran en un momento determinado. Estas afecciones se encuentran en un momento muy especial de la civilización humana debido a factores como:

- a) La aparición o exacerbación de patógenos asociados al propio desarrollo (o subdesarrollo) como el hacinamiento en ciudades, los productos químicos ambientales, la alimentación, la industrialización, la deforestación, los cambios climáticos, la inmediatez de la transportación de muchas de personas a grandes distancias, etc. [46].
- b) La aparición, emergencia o re-emergencia de agentes infecciosos resistentes al tratamiento por el abuso de los antibióticos convencionales [47].
- c) El incremento de sub-poblaciones de personas inmuno-deprimidas de forma artificial (trasplantes, cáncer, enfermedades autoinmunes y alérgicas) o natural (SIDA, Malaria, ancianidad, desnutrición, etc.) [48].
- d) La utilización de agentes infecciosos como armas biológicas [49].

Si se tiene en cuenta la real amenaza de la emergencia o re-emergencia de enfermedades causadas por microorganismos y utilización de agentes infecciosos como armas biológicas se hace más perentoria la necesidad analítica, masiva e inmediata de detectar a estos agentes en individuos en riesgo con el objetivo de fortalecer la vigilancia epidemiológica. Durante los últimos 20 años se han desarrollado inmunométodos y equipamiento que han aumentado la sensibilidad, especificidad y la rapidez en la detección de estos agentes [50]

Los anticuerpos continúan siendo el reactivo más crítico y decisivo en los inmunoensayos destinados a detectar agentes infecciosos y por tanto a complementar el diagnóstico de estas enfermedades. La capacidad analítica de los anticuerpos además, de la inherente especificidad y robustez de la prueba en que se utilicen, depende de dos factores principales: la afinidad si se trata de un AcM o la avidez en caso de una preparación policlonal. El grado de pureza de estas preparaciones que puede decidir la monoespecificidad o capacidad para no incluir anticuerpos que reaccionen con los contaminantes más frecuentes que acompañan a analito en el escenario de análisis para el caso de los policlonales y evitar la reactividad contra epítomos no exclusivos del analito en el caso de los AcMs [51].

Los ensayos tipo ELISA a comienzos de los 70s constituyeron una respuesta a la falta de sensibilidad de los inmunoensayos de segunda generación prevalecientes hasta el momento y a la peligrosidad personal y ambiental de los muy sensibles inmunoensayos radioisotópicos para la detección de agentes infecciosos. Los inmunoensayos de enzima ligada se caracterizaron por su heterogeneidad (versiones artesanales y relativamente sencillas de poner a punto en un laboratorio convencional, sobre todo con el advenimiento de materiales y equipos modulares comerciales) y en versiones homogéneas basadas en molécula híbridas patentadas y ofrecidas en su conjunto como costosos estuches comerciales. Los AcMs han ido desplazando a las preparaciones policlonales sobre todo en aquellos casos en los que la compartición de epítomos entre patógenos y comensales hace impracticable los métodos de absorción de inespecificidad [52].

La inmunocromatografía fue un concepto aplicable a los ensayos con anticuerpos en los años 60 principalmente para detectar proteínas séricas [53] y posteriormente para drogas [54] y otras proteínas. Esta generación de las llamadas “tiras reactivas” tipo “sándwich” basadas en el marcaje de anticuerpo con oro coloidal tiene varias limitaciones: sólo se puede detectar un analito por tira, la sensibilidad varía según el analito (tipo de microorganismo) y la detección es subjetiva. El ensayo inmunocromatográfico de flujo lateral intenta solventar algunas de estas dificultades mediante un reactivo aumentador

basado en una sal de plata [55]. Avances recientes incluyen la detección con nanopartículas superparamagnéticas de óxido férrico [56] lo cual hace que la señal sea permanente, la detección cuantitativa en milivoltios y la sensibilidad, comparable a la obtenida con radionúclidos y por nefelometría.

Los ensayos TRF están basados en las propiedades fluorescentes únicas de los quelatos lantánidos [57] que producen una fluorescencia sostenida en el tiempo diferenciando la señal positiva muy significativamente del fondo inespecífico del ensayo. Por otra parte, una vez ocurrida la reacción específica, el quelato se disocia de la molécula portadora y produce una amplificación de la señal que incrementa notablemente la sensibilidad de los ensayos. Este sistema de revelado puede montarse en una la plataforma típica del ELISA lo que lo hace muy asimilable, por supuesto, si se dispone de la tecnología para utilizar y preparar los conjugados lantánidos. Existen ya aplicaciones de este sistema para detectar agentes infecciosos [58], algunos de los cuales pueden llegar a lograr una detección multi-epitópica.

La aplicación de la electro-quimio-luminiscencia (ECL) y la separación selectiva partículas magnéticas recubiertas con antígenos o anticuerpos (IMS), por su alta especificidad y sensibilidad, han permitido la aparición de varios sistemas de inmunoensayos comerciales [59]. La separación inmunomagnética ha sido utilizada por años para la captura, separación, purificación y concentración de antígenos solubles o particulados [60] con la utilización de microesferas que contienen  $FE_3O_4$  paramagnético. Los ensayos electro-quimio-luminiscentes utilizan la plataforma ELISA de ensayo y la detección se lleva a cabo con el uso de un quelato del metal pesado Rutenio (II) tris-bipiridal  $Ru(bpy)_3^{2+}$  conjugado al anticuerpo que junto a la tripropilamina (TPA) son oxidados y provocan la señal detectora [61]. Este sistema extremadamente sensible ha sido aplicado a agentes infecciosos cuya detección muy temprana involucra muy serias implicaciones clínicas y epidemiológicas [62]

El análisis por inyección sobre flujo (FIA) [63] se ha desarrollado como una herramienta de análisis que permite el estudio continuo de muestras sobre flujo de solvente sostenido. Esto garantiza un escenario uniforme de comparación contra reactivos controlados por

monitoreo constante muy útil para monitorear procesos en línea. El inmuno-FIA aprovecha el exquisito reconocimiento de los anticuerpos por sus antígenos con los mismos propósitos analíticos siendo un buen ejemplo un sistema para evaluar *in situ* la fermentación de hibridomas a través de la inyección y evaluación de antígeno a través de un conector estéril en la línea de producción [64].

#### **1.4. Aportes de la tesis e impacto de los resultados**

##### **Pertinencia de los resultados atribuidos al el aspirante y autorización para utilizarlos en los 14 artículos principales de la tesis**

- Primer autor: 6 artículos.
- Ultimo autor (responsable de la investigación): 3 artículos. Autorización y acreditación de los primeros autores.
- Autoría intermedia: 5 artículos. Avalados por escrito para el permiso y pertinencia de resultados por lo primeros autores o por los responsables directos de la investigación.

##### **Contribución del aspirante a resultados relevantes y premios (avalados por escrito por las autoridades pertinentes de las instituciones correspondientes)**

1984: Dos aportes de relevancia a la Tecnología de Hibridomas para anticuerpos monoclonales referidos a la detección y clasificación mediante inmunoensayo de tipo ELISA. Logro Institucional del CNIC. Autor principal. Responsable de la investigación (Art. 1).

1985: Medio metabolizado por macrófagos transformados como suplemento para la generación, expansión y clonaje de hibridomas de ratón. Logro Institucional del CNIC. Autor principal. Responsable de la investigación (Art. 3).

1987: Juego inmunoensayo microELISA para la clasificación del antígeno de superficie de la Hepatitis B utilizando Anticuerpos Monoclonales Hepatitis B. Logro

- Institucional del CNIC. Autor principal. Responsable de la investigación (Arts. 5 y 7).
- 1990: Cuantificación de anticuerpos anti HSV y anti CMV con una sola dilución con el empleo del SUMA. Resultado Relevante IPK. Coautor. Aporte directo en la aplicación al UMLISA CMV del diseño, aplicación y validación del procesamiento estadístico para la determinación del título viral con una única dilución del suero (Art. 8).
- 1991: Introducción de nuevas tecnologías aplicadas al diagnóstico virológico. Resultado Relevante IPK. Coautor. Aporte directo en la aplicación al UMLISA HVS del diseño, aplicación y validación del procesamiento estadístico para la determinación del título viral con una única dilución del suero (Art.13).
- 1991: Normalización y producción de un juego diagnóstico para la detección de anticuerpos IgG al virus de la Rubeola (UMELISA). Resultado Relevante IPK. Coautor. Aporte en la puesta a punto del ensayo (Art. 10, complementario).
- 1994: Impacto de la Tecnología de avanzada en el diagnóstico de las infecciones respiratorias agudas de etiología viral. Resultado Relevante IPK. Coautor. Aporte directo en la aplicación al UMLISA AdV del diseño, aplicación y validación del procesamiento estadístico para la determinación del título viral con una única dilución del suero (Art. 27).
- 1995: Validación de un ELISA indirecto útil en el diagnóstico de la leptospirosis humana y en la evaluación de una vacuna cubana contra la leptospirosis. Lic. Ana M. Obregón. Resultado Relevante IPK (Segundo autor). Aporte directo en el diseño, puesta a punto y validación del ensayo (Art. 15, complementario)
- 1996: ELISA para la cuantificación de anticuerpos monoclonales tipo IgG. Resultado Relevante IPK. Coautor. Responsable y gestor de la investigación (Art 30).
- 1997: AcMs contra el virus Dengue 2 (cepa cubana A-15). Su utilidad en el estudio del Dengue. Resultado Relevante IPK. Coautor. Aporte en la generación y detección de los Anticuerpos Monoclonales (Art. 31, complementario)
- 2000: Cuantificación de anticuerpo monoclonal IgM mediante técnica inmunoenzimática utilizando componentes desarrollados en el

- laboratorio. Resultado Relevante IPK. Coautor. Responsable y gestor de la investigación. Destacado Forum Nacional de Ciencia Y Técnica. (Art 37).
- 2001: Bases moleculares de las diferencias funcionales entre Sticholisina I y II. Resultado más destacado UH en Ciencias y Humanidades. Coautor. Generador y responsable de la investigación que originó los anticuerpos utilizados en el estudio (Art 41).
- 2002: Nuevo aporte a la toxinología: Sticholisinas I y II forman un poro toroidal de estructura definida de un nanómetro de radio en membranas naturales y artificiales. Resultado más destacado UH en avance científico de mayor trascendencia y originalidad. Coautor. Generador y responsable de los anticuerpos y del inmunoensayo para la cuantificación de las Sticholisinas (Art 41).
- 2004: Inmunoensayo Inmunoenzimático CAT- ELISA para el pesquizaje masivo de inhibidores de proteasas del virus de la Inmunodeficiencia humana y de P. falciparun. Resultado destacado UH en Salud Humana. Coautor. Aporte directo y principal en el diseño y puesta a punto del Inmunoensayo de actividad catalítica (Art 40).
- 2004: An Immunoenzymatic Solid-Phase Assay for Quantitative Determination of HIV-1 Protease Activity. Gutiérrez Omar A.; Salas Emir; Hernández Yanko; Lissi Eduardo A; Castrillo Gabriel; Reyes Osvaldo; Garay Hilda; Aguilar Arístides; García Beatriz; Otero Anselmo; Chávez Maria A; and Duarte Carlos A. (2002) Anal. Biochem. 307(1): 18-24. Coautor. Mención en la Facultad de Biología al mejor artículo publicado (Art. 40).
- 2005: Los lípidos de la membrana actúan como moduladores de la actividad permeabilizante de la Sticholisina II, una toxina formadora de poros con potenciales aplicaciones biomédicas. Premio ACC. Colaborador. Generador y responsable de la investigación que originó los anticuerpos y el Inmunoensayo utilizados en el estudio (Art.41).
- 2007: Productos naturales de fuentes marinas. Evaluación del potencial de algunas especies en la búsqueda de nuevas moléculas anti-maláricas. Una nueva capacidad tecnológica del PK. Resultado Relevante IPK. Coautor. Aporte directo en el diseño

y puesta a punto del Inmunoensayo de actividad catalítica (Art 42, complementario).

**Aportes al conocimiento y estado del arte en la Tecnología de Hibridomas y el Inmunoensayo Enzimático.**

1. Dos métodos documentados y prácticos para evaluar la capacidad fisiológica de los mielomas para la fusión celular y para la promoción del crecimiento de hibridomas, la aplicación de un novedoso pesquisaje primario de anticuerpos monoclonales de ratón y su cuantificación sensible y útil en el monitoreo de la inmunoterapia en humanos y animales.
2. La aplicación, en la búsqueda de inhibidores de proteasas de importancia médica, de un inmunoensayo de tipo catalítico original, sensible y flexible para el pesquisaje masivo de extractos naturales.
3. Un inmunoensayo original, sensible y no disponible comercialmente para la inmunodetección de proteínas tempranas de *M. fijiensis* para el diagnóstico pre-sintomático efectivo de la Sigatoka negra en hojas de banano.
4. La serología viral masiva y económicamente sustentable en tres Ultra Micro Inmunoensayos indirectos estadísticamente robustos como base del diagnóstico virológico de Citomegalovirus, virus Herpes simple y Adenovirus.
5. Dos inmunoensayos de competencia suficientemente sensibles para la estimación confiable de la avidéz de los anticuerpos humanos de pacientes seropositivos como marcador de la progresión del SIDA y para la cuantificación de citolisinas en su perspectiva terapéutica como “inmunotoxinas”

## 2. Tecnología de Hibridomas:

### 2.1. Los plasmacitomas y su aptitud para la fusión celular. Utilización del cloruro de trifeniltetrazolium (TTC) como marcador fisiológico de plasmacitomas en experimentos de fusión celular para la generación de anticuerpos monoclonales contra el antígeno de superficie de la Hepatitis B (Artículo 6).

Antes de cumplirse los 10 primeros años de la publicación en la Revista *Nature* del artículo, ya legendario, de César Milstein y George Köhler, en el que divulgaron un procedimiento confiable y reproducible para generar líneas celulares híbridas productoras de anticuerpos de especificidad predeterminada [27], los anticuerpos monoclonales habían ya protagonizado una verdadera revolución biomédica en terrenos como la finísima caracterización antigénica, la detección y aislamiento de antígenos en mezclas complejas así como numerosas aplicaciones Biomédicas en áreas como el Inmunodiagnóstico y la Inmunoterapia [65].

Actores esenciales en esta tecnología son los plasmacitomas parentales, responsables directos de la "inmortalidad" proliferativa de los hibridomas generados. El hecho de que el mieloma múltiple fuera explicado como un neoplasma de células productoras de anticuerpos y que cada tumor es el resultado de una población proveniente de una célula única y por tanto un clono que produce un idiotipo específico hizo que en los años 60 estas poblaciones fueran seleccionadas para investigar la estructura de los anticuerpos originándose los famosos mielomas de ratón de Potter provenientes del programa de inducción en el Instituto Nacional de Salud (NIH) de los EE UU [66]. Como ya se sabe durante muchos años fue imposible, de forma práctica, inducir tumores secretores de anticuerpos especificidad predeterminada por inmunización previa de los ratones ya que la malignización es un evento aleatorio y por ello la generación, por esta vía, de líneas celulares continuas productoras de anticuerpos monoclonales es un suceso muy raro [67].

La condición fisiológica de las células involucradas en la generación de los hibridomas y que les confieren directamente la imprescindible capacidad proliferativa es un tema a

tener en cuenta para el éxito de un experimento de fusión celular. Los linfoblastos provenientes del bazo de los animales inmunizados, como uno de los componentes parentales en la fusión, generalmente son células primarias recién cosechadas del propio animal inmunizado y por tanto deben conservar intacta la capacidad proliferativa propia del medio natural del que provienen condición ésta, muy relacionada al concepto de viabilidad como la capacidad de producir colonias celulares [68].

Los plasmacitomas, el otro parental, frecuentemente se conservan en congelación y son re-ingresados al cultivo *in vitro* unos días antes de la fusión celular. Existe una tendencia a "pasar" al plasmacitoma que será utilizado en una fusión por un proceso de tumor ascítico en el peritoneo de ratones isogénicos con el objetivo de aumentar su vigor, su capacidad fusionable y su viabilidad [69] que además prácticamente elimina cualquier infección subyacente y muy peligrosa de micoplasmas completamente incompatible con la generación de los hibridomas por secuestro de precursores nucleotídicos. Un procedimiento más sencillo y extendido es sembrar el plasmacitoma tres días antes de la fusión y cambiar el medio de cultivo 24 horas antes para "garantizar" una apropiada fase exponencial en el momento de la fusión [70]. De cualquier forma es razonable intentar mantener a un cultivo de plasmacitomas en fase exponencial, o cercana a ella, como criterio de excelencia fisiológica, en el momento de la fusión celular como condición de máxima efectividad para producir colonias de hibridomas.

La fase exponencial del crecimiento es un evento que se observó por primera vez en los cultivos líquidos agitados de los microorganismos y ha sido matemáticamente caracterizado en su aplicación para cultivos industriales dentro de la llamada Ingeniería Bioquímica. En el caso del crecimiento unicelular casi sincrónico y sin restricciones de crecimiento, otras que no sean determinadas por el agotamiento de sustrato, la tasa de crecimiento puede ser expresada en base a un sustrato limitante como:  $dX/dT=f(X, S)$  donde X es la masa de células por unidad de volumen y S, la concentración del sustrato limitante. La velocidad específica de crecimiento se define como  $\mu = 1/X \, dX/dt = d \ln X/dt$  que es llamada la ecuación del crecimiento exponencial donde  $\mu$  es independiente de la masa celular y es constante durante la fase exponencial. Jacques-Lucien Monod a

mitad del siglo XX relacionó genialmente la cinética multi-enzimática con la cinética celular en los procesos fermentativos continuos microbianos con su famosa ecuación:

$\mu = \mu_{\max} (s / K_s + s)$ . Estos son parámetros clave en la teoría y práctica en las fermentaciones continuas [71].

Las células de mamíferos por su origen tisular e interdependiente aún cuando no formen parte de un tejido sólido en el animal de origen, tienen un comportamiento heterogéneo en condiciones de cultivo *in vitro* en cuanto a la talla celular individual, asincronismo natural de crecimiento, inhibición dependiente de la densidad de ciertos factores reguladores en el medio y por tanto la modelación matemática de su crecimiento es complicada y multifactorial. Si se asume que a tiempo  $t=0$ , todas las células tienen la misma talla individual y  $T_0$  es el tiempo de generación promedio:

$$(n - \frac{1}{2})T_0 \leq t \leq (n + \frac{1}{2})T_0$$

El número de células que será encontrado en el  $n$ -ésimo intervalo de división será:

$$N_n(t) = N_n^o \left[ 2 \int_0^t f_n(T) dT + \int_t^\infty f_n(T) dT \right]$$

Donde  $N_n^o = 2^{(n-1)} N_o$  es el número de células al inicio del intervalo.

Finalmente:

$$f_n(T) = \left[ \frac{2}{\pi n \sigma_1^2} \right]^{1/2} \exp \left[ -\frac{1}{2} \left( \frac{T - nT_0}{n^{1/2} \sigma_1} \right)^2 \right]$$

En la que se asume que la distribución de los tiempos de generación es normal con una media  $T_0$  y en la  $f_n(T)$  describe la frecuencia de células dividiéndose en un intervalo dado en una población inicialmente sincrónica [72].

En las células animales en cultivo y en particular las de mamíferos la existencia de una fase exponencial es un tema muy polémico, sobre todo en cultivos estáticos de células ancladas o semi-ancladas porque la cantidad de células que permanecen en un momento determinado del crecimiento en un estado de quiescencia hace que el crecimiento muy rápidamente abandone la fase exponencial si, finalmente, se ha alcanzado [73]. En el caso de células creciendo en suspensión en biorreactores, como células CHO recombinadas, la situación es más parecida a lo que acontece con los microorganismos en fermentadores y

por ello la determinación del momento exacto de terminación de la fase exponencial es crucial para estimados de eficiencia de escalado en producciones de moléculas recombinantes asociadas al crecimiento [74]. En estos casos se utilizan los conteos de células viables, el volumen de células empacadas, la razón o relación de nucleótidos intracelulares, el análisis de ciclo celular, la tasa de adquisición de oxígeno en línea (OUR) y la densidad óptica de la turbidez del medio.

De forma general, el concepto de crecimiento exponencial en células de mamíferos en cultivo está basado en la aparente linealidad de los gráficos semi-logarítmicos del número de células (o algún componente celular directamente relacionado al crecimiento) y el tiempo. Este método de análisis gráfico se ha considerado poco confiable para estimar una hipótesis de crecimiento exponencial [75]. Se ha re-examinado esta cuestión con el mucho más sensible método de Smith [76] en el cual la velocidad específica de crecimiento o sea la tasa de crecimiento referida al número de células en un momento determinado es graficada contra el tiempo. Un crecimiento exponencial se comporta de acuerdo a este tratamiento como una línea horizontal. De 125 juegos de datos cinéticos a los cuales se aplicó este método gráfico, sólo 11 mostraron una fase exponencial real lo cual ejemplifica lo poco frecuente de este comportamiento sobre todo en líneas celulares adherentes y semi-adherentes. Más que hablar de una fase exponencial debe pensarse en un momento exponencial que además sería muy dependiente del tiempo de duplicación de las células de mamíferos en cultivo que es entre 10 y 24 horas. Por lo tanto si todas las condiciones ambientales son favorables debe esperarse este momento exponencial entre las 24 y 72 horas después de la siembra. El punto débil de este enfoque es que se requiere el subsiguiente punto de la curva cinética para estimar la velocidad específica de crecimiento y por tanto el comportamiento horizontal indicativo de la fase exponencial. Un evento en el que una bacteria como *E. coli* puede tener 19 minutos como tiempo de generación, en un cultivo de células animales pueden ser perfectamente 24 horas lo cual hace que el momento deseado de máxima eficiencia fisiológica, sencillamente, haya pasado 24 horas después de tener una evidencia medible. Es en esta situación en la cual una apropiada y rápida tinción vital que estime, indirecta pero proporcionalmente, el número de células producida en el cultivo puede resultar en una estimación mucho más

práctica de la condición ideal de una población celular para una acción biotecnológica como lo es un experimento de fusión somática.

La reducción metabólica de las sales de tetrazolium en formazán coloreado (originalmente insoluble) ha sido utilizada durante muchos años para la localización histoquímica de actividad enzimática [77, 78, 79] y su detección colorimétrica, después de extraído convenientemente, ha sido relacionada directamente con el crecimiento celular de microorganismos y células superiores [80, 81, 82]

En la época en que se evaluó la utilización del cloruro de 2-3-5 trifenil tetrazolium (TTC) en el Departamento de Cultivo Celular del CNIC para estimar el vigor y la capacidad fusionable de los plasmacitomas en la Tecnología de Hibridomas (1986), el derivado solubilizable con detergentes MTT (bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium) ya tenía tres años de haber sido informado por Mosmann [83] como una más sencilla alternativa para estimar la vitalidad de poblaciones de células de mamíferos. Sin embargo este reactivo no estaba disponible comercialmente y su preparación en el laboratorio escapaba a nuestras habilidades de síntesis química. De hecho el procedimiento y juego comercial para evaluar la proliferación celular de células animales basado en MTT y recomendado por American Type Culture Collection (ATCC) no estuvo disponible hasta 1989. Más tarde apareció el derivado, más costoso, que produce el formazán directamente soluble en el medio de cultivo eliminando así la necesidad de un paso adicional de solubilización [84] y haciendo de la proliferación celular, un experimento más eficiente y práctico al ser evaluado en placas de microtitulación de 96 pocillos y lector de microELISA.

Si bien el procedimiento informado en el artículo 7 no es novedoso en su año de publicación con respecto al colorante, en cambio si lo es para evaluar la condición y capacidad fisiológica los plasmacitomas para generar hibridomas viables. Considero por tanto que estas innovaciones posteriores en la solubilidad del formazán refuerzan la validez de la intención original del uso de las sales de tetrazolium para la estimación de la

capacidad hibridogénica de los plasmacitomas utilizados en los experimentos de fusión somática con el objetivo de obtener Anticuerpos Monoclonales.

**2.2. Promoción del crecimiento de los hibridomas de ratón.** Introducción de un medio metabolizado por una línea celular de macrófagos transformados de ratón como un suplemento adecuado para la generación, clonación y expansión de hibridomas B de ratón (**Artículo 3**).

Desde principios de los 70s se conoce que la esencia molecular del control del crecimiento de las células animales *in vitro* se encuentra firmemente relacionado a fenómenos como la capacidad de anclaje de las células a las superficies donde se cultivan, la dependencia de factores presentes en el suero animal adicionado al medio de cultivo, cambios morfológicos asociados a estadios circunstanciales o definitivos y en el papel del calcio en la transformación de una determinada masa celular [85].

La idea original relacionada con la importancia del contacto físico entre las células para controlar el crecimiento *in vitro* y evitar la superposición de capas celulares, fenómeno que también se puede observar en las formaciones tumorales naturales, fue rápidamente superada cuando se demostró la importancia de factores solubles que dependían, naturalmente, de la densidad celular y cuya acción controladora se podía lograr con su adición aun en estadios tempranos del cultivo [86].

En el control de crecimiento de las células de mamíferos están involucrados polipéptidos algunos de ellos con acción hormonal así como compuestos de bajo peso molecular [87] que actúan a través de receptores específicos. Los años 80 fueron testigos de la amplia difusión de informes sobre factores de crecimiento de diferentes tipos celulares en cultivo, normales o transformadas.

En 1985 Arden y sus colaboradores encontraron el sistema celular adecuado para detectar lo que se ha llamado factor de crecimiento de hibridomas (HGF) [88] basado en

un hibridoma muy sensible a este factor y que es evaluado en un sistema de crecimiento en alta densidad por incorporación de timidina tritiada. El HGF es producido en grandes cantidades por los monolitos y macrófagos y no por las células T. Es un polipéptido de 26 KDa con una secuencia casi idéntica a la del Interferón  $\beta$ 2. El HGF tiene casi un 30% de homología con la Interleucina 1 y se ha comprobado que las células productoras no necesitan ser estimuladas para su segregación pero que definitivamente requieren la presencia de suero animal como aditivo en el medio de cultivo que puede ser suplido por proteínas bovinas purificadas pero no por otras proteínas como ovoalbúmina o gamma globulinas humanas. La producción de HGF *in vitro* comienza a las dos horas de la inoculación y se completa en las siguientes 24 horas de cultivo [89].

Por la época en que se realizó esta investigación, a principios de los 80s, los laboratorios que en Cuba generaban AcMs de ratón se agrupaban en dos escuelas con respecto a la promoción del crecimiento de los hibridomas recién generados. La primera añadía una suspensión de células esplénicas de ratones normales al cultivo con células recién fusionadas y la segunda aplicaba una capa alimentadora de macrófagos peritoneales de ratón preparada el día anterior (o unas horas antes) en las mismas placas de cultivo que se iban a utilizar en la fusión. Esta última variante, considero que tiene una serie de ventajas como:

- La segregación de Interleucinas I y VI promotoras del crecimiento de células B en transformación blástica
- La fagocitosis de restos celulares resultantes de la acción destructiva del medio selectivo.
- El control de la no poco frecuente infección latente y asintomática con micoplasmas cuya presencia, por mínima que sea, inhibe el desarrollo de los hibridomas por secuestro de timidina que es clave para el éxito selectivo del sistema.

No obstante esta práctica no deja de constituir otro cultivo primario añadido a la ya trabajosa Tecnología de Hibridomas que consume animales, medio de cultivo, suero fetal

bovino (SFB), laboriosa manos de obra adicional y constituye otra fuente de contaminación e infección al cultivo.

Por estas razones y por no estar informado hasta en aquel momento (1983), se escogió el medio condicionado (TMCS) por la línea de macrófagos transformados J774.A1 para conocer si era posible sustituir la capa alimentadora de macrófagos como promotor del crecimiento de los hibridomas recién formados y como soporte para el crecimiento de clones celulares obtenidos por la técnica de dilución limitante.

El sistema D4 desarrollado en el INOR [90] para la evaluación de factores de crecimiento de linfocitos B da ratón está basado en un hibridoma que es dependiente del medio condicionado de células endoteliales humanas (HECS) [91] y muestra una respuesta muy efectiva en presencia de este aditivo por lo que se utilizó para servir de control en los experimentos de evaluación.

La optimización de la producción de TMCS en el tiempo por la línea celular J774.A1 fue evaluada con y sin la presencia de SFB en el medio de cultivo con respecto al sistema D4 en alta densidad. Se encontró que había un máximo de actividad promotora a las 48 horas después de la confluencia celular independiente de la presencia o no del SFB. Esta actividad decreció a partir de ese momento. Este resultado es importante porque deja fuera de dudas la posibilidad que la promoción se deba a remanentes del suero fetal utilizado en la producción del promotor en la línea de macrófagos transformados durante esas 48 horas de producción.

Esta premisa sirvió de base para la evaluación del medio condicionado promotor producido en ausencia de SFB. Para descartar la posible influencia del suero fetal presente en el medio para lograr la confluencia de los macrófagos transformados se practicó un abundante lavado de la monocapa antes iniciar la producción en las siguientes 48 horas que fue comprobadamente efectivo de acuerdo al comportamiento de los controles correspondientes. En el sistema D4 controlado con HECS que por cierto es producido con suero humano al 30%, el medio condicionado por macrófagos transformados TMCS al 12.5% fue superior al SFB al 10% mostrando un

comportamiento característico de dosis-efecto. Este suplemento utilizado al 50% produjo una promoción ligeramente superior a los controles sin aditivos probablemente debido al debilitamiento del medio de base y consiguiente salida de componentes importantes del rango de crecimiento celular.

La capacidad de clonación del TMCS a diferentes concentraciones en el sistema D4 a baja densidad fue expresada en términos de eficiencia de clonación con una base de SFB del 5% que no fue capaz de generar colonias. La capacidad de este aditivo promotor a baja densidad celular resultó con las mismas cualidades mostradas a alta densidad, un máximo de actividad a las 48 horas después de la confluencia en ausencia de suero y a una concentración del 12.5%. Este mismo esquema de trabajo fue desarrollado para evaluar la influencia de este medio condicionado en un híbrido no relacionado al sistema D4 y que fue generado en presencia del promotor en estudio TMCS al 10% inmediatamente después de efectuada la fusión celular.

Por último la efectividad del TMCS para promover el crecimiento de hibridomas recién formados fue comparada con la actividad de una capa alimentadora de células esplénicas de ratón en un experimento típico de fusión celular. Se encontró además que los macrófagos que provienen del bazo son estimulados en cierta medida y aunque pudiera esperarse una transformación de los linfocitos B no fusionados, esta no fue encontrada en los experimentos controles correspondientes.

En 1985 teníamos dos razones de peso para suponer que el efecto promotor del crecimiento de TMSC no era exactamente el factor de crecimiento de hibridomas HGF (IL-6). En primer lugar Arden y colaboradores encontraron que el HGF no es producido por los macrófagos en ausencia de suero bovino como fue nuestro caso y en segundo lugar el efecto promotor encontrado por nosotros en el TMCS fue muy similar al que produjo la IL-1 de ratón purificada en comparación al HECS de células endoteliales [90]. Obviamente una combinación de ambas influencias en una determinada relación no pudo ser descartada a menos que se purifiquen las moléculas involucradas en la promoción.

En esta misma época Sugawara y colaboradores [92] habían evaluado la promoción del medio condicionado del cultivo primario de macrófagos y el sobrenadante de tres líneas de macrófagos transformados primarios entre ellas la J774 pero no se adentraron en la naturaleza de las moléculas involucradas. Por otra parte Rathjen y Geczy [93] confirmaron las cualidades del medio condicionado por esta línea de macrófagos transformados cuando se le potenciaba en su producción con LPS.

Años más tarde Liu y colaboradores [94] demostraron que el requerimiento de suero bovino en el medio de cultivo para la generación de hibridomas podía ser sustituido completamente con 300 unidades /mL de HGF (IL-6).

De cualquier forma la utilización de Interleucina 6 (HGF) o Interleucina 1 (IL-1) purificadas para promover el crecimiento, clonación y expansión de hibridomas B de ratón en el medio de cultivo es un procedimiento muy costoso en relación al uso de un medio condicionado obtenido en ausencia de suero fetal bovino y utilizado al 12.5%.

La compañía Sigma Chemical Co. de Estados Unidos ha ofertado por muchos años un producto con la siguiente descripción:

“CONDITIONED MEDIUM FROM J774A.1 CELLS, HYBRI-MAX” (Product No. M 8782) Prepared using a mouse macrophage cell line, J774A.1, grown in IMDM with 2% FBS.

El éxito comercial de este producto demuestra la pertinencia de nuestra investigación a principios de la década de los 80s.

### **2.3. Detección primaria de Anticuerpos Monoclonales de ratón.** Detección de anticuerpos monoclonales de ratón en sobrenadantes de cultivo de hibridomas mediante la utilización del Sistema Ultra Micro Analítico SUMA (Artículo 1).

La evaluación primaria de los sobrenadantes de cultivo de hibridomas en la tecnología de hibridomas es el paso de mayor elaboración intelectual de la tecnología porque de él

depende básicamente que los monoclonales de interés puedan ser identificados en un momento en el que no es posible disponer de más de 24 a los sumo 48 horas para una decisión razonable a costa de tener que mantener una gran cantidad de hibridomas sin saber si realmente son positivos a la especificidad que pretendemos [95].

En este sentido la práctica ha demostrado que una premisa debe ser consistentemente, observada. El sistema de pesquisaje de los sobrenadantes de hibridoma en un experimento de generación de AcMs debe estar lo más relacionado posible al ensayo analítico de destino final que se pretende para ese o esos anticuerpos. En otras palabras, si se desea utilizar un AcM en un ensayo tipo ELISA no debe buscarse ese anticuerpo por inmunofluorescencia u otra técnica alejada en cuanto a principio de detección.

Una alta afinidad en los anticuerpos está relacionada a la necesaria sensibilidad (detectabilidad) de la prueba final en la que se desea utilizar el o los AcMs. Debe tenerse en cuenta esta circunstancia en el diseño y aplicación del protocolo de inmunización. Por otra parte, la afinidad de un anticuerpo puede modificarse post- inmunización, mimificando lo que hace el Sistema Inmune *in vivo* mediante el mecanismo de hipermutación somática. Esto se puede lograr clonando y expresando las regiones variables en fagos filamentosos especialmente diseñados para mostrar la proteína específica en su superficie para ser enfrentada al antígeno. Ejecutando repetidas sesiones de enfrentamiento antigénico puede lograrse una especie de selección *in vitro* a favor de regiones variables cada vez con mayor afinidad [30]. En el pesquisaje primario de los hibridomas puede tenerse una idea preliminar de la afinidad de cada inmunoglobulina diluyendo seriadamente los sobrenadantes evaluados.

Un inmunoensayo para detectar AcMs de ratón en los sobrenadantes de cultivo de hibridomas debe cumplir ciertos requisitos analíticos:

- a. Tener la suficiente sensibilidad como para detectar anticuerpos en los sobrenadantes de un cultivo de 100  $\mu$ L de hibridomas o sea inmunoensayos de tercera generación en el orden de los microgramos. Se descartan los ensayos de

- aglutinación y otras poco sensibles. Estas cualidades se investigarán, necesariamente, en análisis secundarios [96]
- b. Ser capaz de detectar, al menos, todas las subclases de IgG mediante un conjugado con anticuerpos de otra especie que reconozca a la molécula completa de IgG de ratón) Si se busca una IgM se deberá utilizará un conjugado con anticuerpo anti-cadena  $\mu$  de ratón.
  - c. Capacidad de automatización en placas de microtitulación, lectores automáticos, etc. La inmunofluorescencia indirecta es una excepción muy pertinente para antígenos superficiales celulares no purificados.
  - d. Utilización de controles analíticos apropiados:
    - Positivo: sobrenadante de hibridoma productor de un AcM similar (epítipo o antígeno), si existiera, o en su defecto suero hiperinmune de los ratones utilizados en la fusión celular.
    - Negativo: sobrenadante de hibridoma productor de AcM irrelevante en especificidad o, en su defecto, sobrenadante de cultivo del plasmacitoma utilizado para la fusión celular.

El Sistema Ultra Micro Analítico (SUMA)<sup>TM</sup>, fue desarrollado en Cuba en los años 80s [43] como un micro inmunoensayo de fluorescencia (10 $\mu$ L) para el pesquizaje masivo y cuantitativo de alfafetoproteína en suero de embarazadas en la detección de defectos fetales del tubo neural. Hoy día su utilización se extiende a numerosas aplicaciones [97]. La plataforma analítica de este sensible inmuno método resultó muy apropiada para el pesquizaje de los primeros AcM generados en el CNIC.

Este sistema micro analítico tenía, en 1982, una serie de conveniencias para ser utilizado como soporte para pesquisar AcMs:

- a. Volumen analítico de 10 $\mu$ L lo cual permite análisis múlti-epitópicos o de diluciones seriadas con el mismo sobrenadante en el ensayo primario.
- b. Economía general de reactivos como antígenos y conjugados.

- c. Sensibilidad incrementada por la amplificación fluorimétrica, la cual es muy útil para descubrir débiles positivos (nada descartables) así como una estimación preliminar de la afinidad del anticuerpos antes de ensayos.
- d. La eficiente automatización inherente al sistema.

Con estas características y los primeros resultados nos quedó claro como se puede apreciar en la figura 2 del artículo 1, que aún con la utilización de un valor de corte exigente como criterio de posibilidad (3 ó 4 veces el promedio de fluorescencia de los controles negativos) fue posible discriminar los sobrenadantes positivos. Esta consideración no es irrelevante porque resulta muy frecuente que una amplia “zona gris” en el ensayo primario incluya señales para muestras cuya positividad resulta incierta y requieren confirmación costosa en tiempo y materiales. Este ensayo demostró que los negativos se distribuyen muy cerradamente alrededor del nivel de blanco y bien alejados del valor de la muestra control considerada como débil positiva.

Este ensayo, en particular, fue diseñado para tres anticuerpos porque aún cuando la alfafetoproteína humana es una estructura globular, aparentemente poco deformable al unirse al poliestireno, se disponía de un antisuero de conejo mono específico cuyas bondades de especificidad y sensibilidad fueron aprovechadas como reactivo de captura. Téngase en cuenta además con respecto a la precisión, que esta versión del SUMA utilizaba placas de cloruro de polivinilo recubiertas con poliestireno proceso superado con la posterior incorporación de placas completamente hechas de este último material, inclusive no transparente.

El Ultra Micro ELISA para detectar AcMs permitió desde el mismo ensayo primario, una discriminación apropiada de la positividad de los de sobrenadantes que fue confirmada posteriormente en pesquisajes secundarios. Este hecho demuestra la factibilidad de la utilización de la plataforma SUMA en el diseño y puesta a punto de inmunoensayos tipo ELISA para el pesquisaje de anticuerpos monoclonales lo que constituyó la primera aplicación del sistema SUMA en la Tecnología de Hibridomas.

**2.4. Cuantificación de Anticuerpos Monoclonales de ratón.** Inmunoensayos de tipo ELISA para la cuantificación de IgG total y subclases de inmunoglobulinas ratón en sobrenadantes de cultivo de hibridomas y en suero humano para monitorear anticuerpos monoclonales terapéuticos. Cuantificación de IgM de ratón en sobrenadantes de cultivo de hibridomas. **(Artículos 30 y 37).**

La cuantificación de los anticuerpos monoclonales en los sobrenadantes de hibridomas y en los fluidos ascíticos no sólo representa un parámetro de control de calidad productivo sino también un control de clonalidad y homogeneidad celular en las líneas de hibridomas [98]. Se convierte en una herramienta indispensable para la evaluación de los anticuerpos terapéuticos que son o serán administrados en humanos para combatir el cáncer, las infecciones, las enfermedades autoinmunes y las alergias así como para producir la inmunosupresión necesaria para los trasplantes [99].

Efectivamente el amplio uso de la Tecnología de Hibridomas para la generación de anticuerpos monoclonales ha creado la necesidad de métodos simples, rápidos, específicos y sensibles para la cuantificación de la producción de inmunoglobulinas en sobrenadantes de cultivo de hibridomas. Una determinación precisa de los niveles de anticuerpos es crítica para una mejor comprensión del efecto de los parámetros físicos en el crecimiento de los hibridomas y la segregación de inmunoglobulinas. Este aspecto reviste especial importancia con el amplio uso de fermentadores en la producción a gran escala de AcMs en cultivos controlados en medio con o sin suero animal. La determinación de la concentración de inmunoglobulinas en los sobrenadantes es también necesaria cuando se intentan establecer condiciones reproducibles en diferentes inmunoensayos cuando la disponibilidad de anticuerpo proviene solamente de sobrenadantes de cultivo. Los niveles habituales de concentración de AcMs en los sobrenadantes en cultivos estacionarios oscila entre 5 y 50µg/mL, en dependencia del clono y de la densidad celular. En los biorreactores se obtienen mucho mayores concentraciones de anticuerpos [100].

Un hibridoma puede perder la capacidad de expresión de su inmunoglobulina clonalmente distribuida y rescatada del esplenocito original de forma inmediata después de cierto subcultivo por un reordenamiento genético incompatible con la expresión de inmunoglobulinas lo cual, frecuentemente, es generacionalmente determinado. Por otra parte puede desarrollarse un clono en el cultivo de mayor tasa de crecimiento que no exprese anticuerpos y que se vaya acumulando en cada generación con la consecuente pérdida gradual en la capacidad productiva de la población general y que se manifieste en una disminución en la concentración de anticuerpos en el medio de cultivo al cabo de un tiempo determinado.

La mayoría de los ensayos de tipo ELISA informados para cuantificar inmunoglobulinas de ratón de clase IgG [101, 102, 98, 103] utilizan anticuerpos de otra especie, específicos para subclase, introduciendo así el elemento seleccionador dentro de la cuantificación los cuales serán conjugados individualmente o revelados por un segundo anticuerpo de otra especie unido a la enzima. Esta característica los hace particularmente caros.

La novedad en nuestro ELISA tipo *sandwich* directo para cuantificar anticuerpos monoclonales de ratón de clase IgG (Artículo 30) es que no requiere anticuerpos de otra especie específicos para cada subclase como es frecuentemente encontrado como oferta de casas comerciales, los cuales son más difíciles de obtener porque hay que inmunizar conejos, ovejas o cabras con las subclases de IgG de ratón purificadas. Un buen anticuerpo policlonal contra las 4 subclases proveniente de un suero hiperinmune obtenido en alguna de estas otras especies y que haya sido generado inmunizando con IgG total de ratón es apropiado para poner a punto este ensayo teniendo en cuenta, naturalmente, que las curvas patrones deben ser confeccionadas con los anticuerpos de las subclases correspondientes porque solamente la fracción de anticuerpos que reconoce la subclase de interés actuará de igual forma que lo hará con el patrón seleccionado naturalmente de la misma subclase de manera que con la excepción del patrón que es diferente en caso de las cuatro subclases de IgG de ratón, el resto de los componentes específicos son universales para el ensayo.

Este enfoque es apropiado también cuando se intenta cuantificar anticuerpos en el suero de pacientes tratados con inmunoterapia anticancerosa o autoinmune. La mayoría de estos anticuerpos son de clase IgG y subclases 1, 2a y 2b por lo que el ensayo es aplicable utilizando la subclase correspondiente en la curva patrón. El ensayo informado en el artículo 30 fue capaz de no tener interferencias con las proteínas séricas humanas incluyendo naturalmente las inmunoglobulinas y mantuvo la sensibilidad necesaria para un seguimiento farmacocinético.

Aunque la inmunoterapia del cáncer con AcMs se ha centrado en los anticuerpos de la clase IgG, sus subclases y fragmentos, es razonable pensar que la inmunoterapia antibacteriana, antifúngica, anti-protozoaria e inclusive antiviral pasen por ensayos clínicos que involucren la utilización de anticuerpos de ratón de clase IgM por su capacidad multivalente y poder aglutinante. En esta alternativa los fragmentos recombinantes de IgG apropiados para lograr una rápida infiltración de los tumores pueden no ser suficientemente aptos para neutralizar directamente a los patógenos o dirigir una actividad biológica apropiada.

La IgM humana ha sido cuantificada mediante a simple pero robusto ensayo que no requiere equipamiento sofisticado y que puede ser utilizado para diagnosticar la enfermedad del sueño. Una concentración elevada de IgM en el fluido cefalorraquídeo que ocurre debido a una síntesis masiva de IgM intratecal es un marcador de interés para el diagnóstico de meningo encefalitis por tripanosoma [104]. Se ha desarrollado también un ensayo tipo ELISA para estudiar la distribución de IgM humana nativa en ratones como alternativa a las técnicas analíticas radioisotópicas convencionales [105].

La corporación ZeptoMetrix de Nueva York, en Estados Unidos oferta un inmunoensayo tipo ELISA (IMMUNO-TEK) que anuncian como rápido y sencillo para determinar IgM de ratón en sobrenadantes de cultivo de hibridomas, ascitis y otros fluidos biológicos. Resulta particularmente útil para monitorear la producción y purificación de anticuerpos monoclonales y todo ello en menos de dos horas con un rango de cuantificación entre 7.8

y 125ng/mL. El conjugado es a base de anticuerpos policlonales anti IgM de ratón y peroxidasa de rábano picante y revelado con tetrametilbencidina.

Los ensayos desarrollados en los artículos 30 y 37 de esta tesis cierran un paquete de herramientas analíticas desarrolladas en la Unidad de Hibridomas del IPK en los años 90 para enfrentar, principalmente, la generación de anticuerpos monoclonales contra agentes infecciosos y su cuantificación con fines diagnósticos, Aunque la generación de monoclonales con fines terapéuticos tienen su ideología y diseños particulares, las herramientas analíticas para su cuantificación pueden ser compartidas si éstas son compatibles con el escenario sérico o tisular donde éstos tienen que actuar y ser evaluados. En este caso, aunque no existió la posibilidad real de evaluar un monoclonal terapéutico de clase IgM, fue posible disponer de dos ensayos apropiados y bien calificados.

### 3. Inmunoensayos directos.

#### 3.1. Electro-inmunoensayos. Inmunoensayo potenciométrico de enzima ligada (IPELI) para la detección del subtipo "ad" del antígeno de superficie de la Hepatitis B (Artículo 4).

Los inmunoensayos electroquímicos pueden ser directos cuando se utilizan transductores potenciométricos, amperométricos o capacitivos que indican la reacción antígeno anticuerpo sin otra reacción acoplada o accesoria. Estos ensayos se basan en la detección de cambios en la densidad de cargas o en la conductividad de la transducción. El hecho de trabajar sin marcadores para revelar la reacción es muy atractivo sobre todo en el desarrollo de inmunosensores *in vivo* que permiten una evaluación en tiempo real con la deseada ausencia de reactivos peligrosos y con la posibilidad de utilizar anticuerpos de no muy alta afinidad. Ya hace más de 30 años Janata y colaboradores detectaron un cambio de potencial con valor analítico cuando incubaron manano y Concanavalina A inmovilizada en una membrana de PVC que representa un antecedente importante para estos electro-inmunoensayos de evaluación directa [106]. En 1984 Keating y Rechnitz utilizaron un electrodo sensible a potasio con un conjugado dioxon-ionosforo en una membrana de PVC para detectar anticuerpos anti dioxina. Aún cuando algunas publicaciones han informado resultados con efectos similares, no quedaba completamente claro si el cambio de potencial es el resultado de un disturbio en el transporte de iones o es el producto de cambios de carga en la superficie de la interacción de las proteínas [107].

En los inmunoensayos electroquímicos indirectos el evento de unión molecular es visualizado mediante una reacción auxiliar mediante un compuesto marcado. Los transductores amperométricos acoplados a la reacción son capaces de detectar  $10^{-10}$  Ampere en un rango lineal con potenciostatos comerciales [108]. Debido a que los anticuerpos y los antígenos no son electroquímicamente activos con el potencial REDOX en el rango apropiado es necesario acoplar compuestos activos REDOX como marcadores para la detección de la reacción antígeno-anticuerpo de manera que cualquier unión inespecífica no contribuya a la señal de interés. En un ensayo amperométrico el

compuesto REDOX marcador debe tener las siguientes propiedades: ser electroactivo en un rango de potencial entre 0 y 200 mV, no debe alterar el funcionamiento del electrodo, no tener reacciones colaterales con la matriz, ser estable en el tampón de reacción y tener disponibles grupos químicos activos para la conjugación [109].

Los inmunoensayos electroquímicos indirectos también pueden ser enzimáticos de tipo homogéneos con el formato EMIT (Enzyme Multiplied Immunotechnique, Syva, Palo Alto, Ca) o heterogéneos con el formato ELISA convencional. En este último caso un transductor electroquímico sustituye al lector colorimétrico de microplacas lo cual reduce los costos y permite lecturas de trabajos de campo. Los electrodos pueden ser integrados en el pocillo de reacción o la mezcla de reacción ser llevada a la celda de medición. Este es el caso de un inmunoensayo tipo *sandwich* para la hormona estimulante de tiroides (TSH) con la enzima fosfatasa alcalina (AP) como agente revelador. Después del lavado final, se añadió NADP<sup>+</sup> como sustrato. El NAD<sup>+</sup> producido se determina por amplificación enzimática con alcohol dehidrogenasa (ADH) y diaforasa como enzima acoplada. En una versión comercial de ELISA amplificado (AmpliQ de Dako, NovoClone AELIA, Novo BioLabs) se utilizó INT-violeta como sustrato de la diaforasa [110,111].

El ferricianuro convirtiéndose en ferrocianuro puede ser detectado amperométricamente. En configuraciones similares se reemplaza la ADH por la formiato dehidrogenasa, la glucosa dehidrogenasa, la carnitina dehidrogenasa o la glicerol dehidrogenasa [112,113].

En lugar del p-nitrofenilfosfato (PNPP) habitualmente utilizado en los inmunoensayos que se revelan con fosfatasa alcalina o el NADP<sup>+</sup> ya mencionado, el p-aminofenilfosfato (p-APP) es también frecuentemente usado en la determinación electroquímica de la AP. El producto enzimático es p-aminofenol (p-AP) que puede ser medido con muy alta sensibilidad mediante un electrodo de carbón vidriado. El método fue propuesto por Kulys y colaboradores en 1980 e introducido en un inmunoensayo por el grupo de Heineman y Halsall [114]. Este mismo grupo 10 años más tarde utilizó un electrodo de disco rotatorio directamente a una micro gota de 50 µl en la detección electroquímica de IgG de ratón como modelo analítico en un inmunoensayo basado en microesferas [115].

En el caso del inmunoensayo potenciométrico que se describe en el artículo 4 se intenta sustituir la lectura colorimétrica por una potenciométrica en base a la ecuación de Nernst con la reacción REDOX del ABTS reduciéndose a expensas de la oxidación del peróxido de hidrógeno a agua. Naturalmente el carácter artesanal del dispositivo utilizado solo permite la comparación con la variante colorimétrica tradicional para la peroxidasa basada en el cromógeno ortofenilendiamina (OPD). El concepto electroquímico de la detección hace a la detección independiente de la turbidez de la muestra, miniaturizable en términos de volumen y automatizable si se diseña y construye un dispositivo capaz de medir la diferencia de potencial en placas tipo suma con posiblemente menos de 5 $\mu$ L de muestra. Por otra parte la sensibilidad puede, en términos de detectabilidad, ser aumentada notablemente ya que la actividad REDOX de fondo es mínima.

A casi 20 años de informado y con el advenimiento de las nano-tecnologías de miniaturización, creemos que con el trabajo que se presenta en el artículo 4, se demuestra la pertinencia de este intento de incursionar en otro concepto inmunoanalítico diferente al tradicional espectrofotométrico.

**3.2. Inmunoensayos para detectar actividad proteolítica.** Inmunoensayo de tipo ELISA para detectar inhibidores de la proteasa aspártica expresada por el Virus de la Inmunodeficiencia Humana VIH (**Artículo 40**).

Existe un amplio rango de métodos disponibles para la evaluación de actividad de endoproteinasas (y potencialmente para sus inhibidores) que utilizan sustratos proteicos y peptídicos [116-119]. Algunos de ellos están basados en la detección de los productos de la proteólisis [120, 121] o por el contrario, del sustrato remanente [122]. Estos ensayos frecuentemente miden la liberación de marcadores coloreados en el sustrato proteico o cuantifican aminoácidos o péptidos precipitados en medio ácido. Todos ellos requieren tratamiento y relativamente grandes volúmenes a los efectos de una escala analítica. La sensibilidad puede ser aumentada con la utilización de sustratos a los que se ha unido covalentemente compuestos cromogénicos o fluorogénicos en las regiones C terminales

de los péptidos [123] o isótopos radioactivos [124, 125]. Estos ensayos requieren usualmente la acción de proteinasas específicas, requieren equipo especializado y costoso e implican riesgos de operación además de presentar alta variabilidad entre muestras así como premura en la detección debido a la inestabilidad de los productos.

Un enfoque diferente centra su atención en los inmunoensayos tipo ELISA y los anticuerpos específicos contra una región específica del sustrato que resulta excluyente después de la proteólisis [126, 127]. Un enfoque de similar estructura pero que no involucra anticuerpos utiliza un conjugado estreptavidina-fosfatasa alcalina para detectar el sustrato previamente biotinilado [128]

La detección, con fines terapéuticos, de la actividad inhibidora de proteasas de forma rápida y masiva sobre todo relacionada con entidades epidémicas y pandémicas ha sido enfrentada con inmunoensayos que cumplen con estas expectativas de pesquizaje. En este sentido se ha informado un ELISA para la detección de actividad proteolítica y su inhibición de la proteasa aspártica del VIH con un sustrato inmovilizado relacionado a la proteína gag. En estas condiciones el pestatín fue capaz de inhibir la proteólisis y rendir una señal discriminadora con suficiente sensibilidad como para enfrentar candidatos extractos naturales y sintéticos [129]

Se ha generalizado la denominación cat-ELISA para referirse a los inmunoensayos con esta estructura que intentar evaluar la actividad catalítica o su inhibición en fase sólida y de con este enfoque se informó de un ensayo para evaluar la actividad proteolítica aspártica del VIH y la evaluación de potenciales péptidos sintéticos inhibidores Este inmunoensayo cuantitativo en fase sólida fijó un sustrato biotinilado por el extremo c-terminal con un extracto crudo de enzima y un anticuerpo altamente específico el extremo c-terminal del producto de escisión . Una curva estándar sirvió de base para estimar la actividad enzimática y los autores aseguran que el método es menos costoso y más sensible que el convencional, cromatográfico [130]

Ya en 1991 el grupo de Maurizio Denaro en la Universidad de Milán había informado de un inmunoensayo tipo ELISA para detectar inhibidores de la proteasa aspártica del VIH

en mezclas tan complejas como fracciones de fermentación microbiana a partir de un péptido con la secuencia apropiada y un AcM. El fragmento escindido está conjugado con beta galactosidasa por lo que la actividad inhibidora se evalúa como la aparición de actividad beta galactosidásica en lugar de la disminución de la actividad proteolítica lo que aporta una ventaja analítica al sistema además de un procesamiento rápido y masivo de muestras [131]

Lo más interesante, desde el punto de vista inmunoquímico, en el ensayo descrito en el artículo 40 es, entre otras cosas, la excelente curva lineal de calibración que se pudo lograr con el péptido de interés proteolítico DU1 en un rango entre 0.25 y 0.46 nMol/L lo que ofrece un escenario apropiado para evaluar la proteólisis (disminución en la intensidad de la reacción) y la inhibición (recuperación de la intensidad de la reacción). Lo puntos críticos de la puesta a punto fueron primero el pre-tratamiento de las muestras que provenían de extractos de invertebrados organismos marinos, con la consiguiente carga salina, tarea nada sencilla por la cantidad de combinaciones ensayadas y en segundo lugar el compromiso analítico entre la concentración adecuada de péptido DU1 (4.6 nMol/L) y su relación señal -fondo, la disminución de la señal por la proteólisis hasta un rango con la sensibilidad necesaria para con una valor de corte, razonablemente objetivo, detectar actividad recuperadora de la señal como evidencia de la inhibición de la enzima. La capacidad del péptido DU1 de unirse a la estreptavidina y de ser reconocida por el AcM 322 sin reacciones cruzadas con el recubrimiento de biotina ni con el bloqueo garantizó un fondo excelente para estimar la sensibilidad del sistema en términos de cantidad mínima detectada (121 pMol/L)

La independencia estructural del sitio de corte proteolítico y el sitio de reconocimiento inmunoquímico en el péptido DU1, permite la utilización de este diseño en la búsqueda de inhibidores para otras proteasas e inclusive puede contener la secuencia de más de un sitio de corte simultáneo otorgando cierta universalidad sólo condicionada por la capacidad física y catalítica de la construcción [132]

**3.3. Inmunoensayos de triple anticuerpo.** Inmunoensayo de tipo TAS-ELISA con anticuerpo monoclonal de captura para la detección temprana de antígenos del hongo *Mycosphaerella fijiensis* agente causal de la Sigatoka Negra en el banano (**Artículo 49**).

Con el advenimiento de la Tecnología de Hibridomas, la posibilidad de disponer de anticuerpos de estructura homogénea (idiotipo e isotipo) y afinidad constantes con un razonable o exigente grado de pureza según la aplicación de destino, cambió por completo los conceptos de variabilidad e inestabilidad de las tradicionales preparaciones de anticuerpos policlonales tan dependientes de la fuente animal. Por otra parte, este advenimiento abrió nuevos horizontes en el mapeo epitópico superficial (caracterización molecular) de microorganismos y células superiores, introduciendo una nueva dimensión en el análisis biológico que llega inclusive a convertir a estas preparaciones monoclonales en herramientas para la demostración de mecanismos de acción en procesos bioquímicos e inmunológicos [133].

La clásica disyuntiva, muy difícil de encarar con anticuerpos policlonales, para distinguir epítomos exclusivos en un agente infeccioso que comparte otros epítomos presentes en flora normal no patogénica, pudo ser resuelta de manera racional y efectiva con el establecimiento de la Tecnología de Hibridomas que permite obtener las líneas celulares productoras de AcMs. Efectivamente es posible, sin la necesidad de purificar los epítomos exclusivos, inmunizar con los patógenos completos y en el paso de evaluación de los sobrenadantes de los hibridomas, pesquisar la reactividad de los AcMs contra los microorganismos patógenos y los no patógenos de forma paralela. Solamente serán seleccionados los anticuerpos que reaccionen con epítomos relacionados, exclusivamente, con las especies patógenas de interés [134].

El tema de la elección de los antígenos, inclusive los epítomos, sobre los cuales generar una respuesta de anticuerpos con fines analíticos y/o diagnósticos está, naturalmente, muy relacionado con la complejidad de ciclo infectivo del patógeno. De hecho los parásitos protozoarios y multicelulares que interaccionan con los vertebrados han tenido

la capacidad de retar y condicionar la respuesta inmune del hospedero muy a favor de estos invasores y en detrimento de los organismos parasitados como ocurre con el Plasmodium (Malaria), el Tripanosoma (Enfermedad de Chagas) y la Leishmania (Leishmaniasis) que han convertido su complejo ciclo de vida en un formidable factor de virulencia en términos de desestabilización y desorientación de la respuesta inmune.

Aunque en el reino vegetal aún no se descubierto una franca respuesta adaptativa, aunque ya hay ciertos indicios de ella, la respuesta innata frente a las infecciones microbianas está ya firmemente establecida, inclusive con una cascada de inducción de señal muy semejante a la encontrada para células animales [135].

Los hongos sin llegar a estas ingeniosas y efectivas transformaciones antigénicas de los parásitos protozoarios, pueden presentar, en sus diferentes fases reproductivas, alternativas a tener en cuenta con respecto a que tipo de antígenos se deben considerar para generar anticuerpos, sobre todo monoclonales.

*Mycosphaerella fijiensis* Morelet, agente etiológico de la Sigatoka Negra en bananos y plátanos enfermedad devastadora para este cultivo, descubierta en las Islas Fidji en 1963 y que apareció en América en 1972. Su control se basa en la aplicación de fungicidas muy tóxicos para los animales y el ecosistema. La detección temprana de la infección en ausencia de síntomas permitiría una aplicación mucho más racional y segura de sustancias anti-fúngicas [136].

Los inmunoensayos con anticuerpos que reconocen estructuras fúngicas exclusivas de forma específica y sensibles pueden detectar antígenos tempranos que ofrezcan una valoración de la intensidad y pronósticos de una infección asintomática. Por lo tanto la elección de los antígenos sobre los cuales generar los anticuerpos se convierte en la primera tarea de diseño del inmunensayo [137].

En el caso de este hongo la fuente para la consideración de los antígenos provienen de:

1. Extracto de micelio de hongo cultivado *in vitro*
2. Extracto de micelio proveniente de infección natural o experimental
3. Proteínas fúngicas segregadas en el cultivo *in vitro*
4. Conidias
5. Ascosporas

Si el origen de la infección en época lluviosa es una o varias ascosporas o conidias en época seca que penetran en la hoja por los estomas, parece razonable pensar que los anticuerpos de captura reconozcan proteínas de estas estructuras como candidatos tempranos de infección. Obviamente estos antígenos aparecerán nuevamente en la fase necrótica avanzada cuando un nuevo muy abundante lote de esporas esté preparado para proseguir la propagación a nuevas plantas. La pregunta es: ¿la abundancia de esporas en un área foliar determinada es suficiente para que el inmunoensayo logre la detectabilidad suficiente para un criterio analítico?

Esto nos lleva a la intención de que ese anticuerpo policlonal o esas mezclas de AcMs como anticuerpos de captura reconozcan también antígenos de micelio y proteínas segregadas que permiten al hongo abrirse camino en las estructuras titulares de las hojas. La utilización de extracto de micelio como antígeno tiene la ventaja de incluir también a las proteínas segregadas que provienen de él. Esta fue la estrategia utilizada en nuestro ensayo para generar AcMs y lográndose un hibridoma que segrega una monoclonal que reconoce una proteína de alto peso molecular que pudiera ser una enzima (Figura 1 del artículo 49).

En este caso el tema de la sensibilidad analítica (detectabilidad del ensayo) puede manejarse con la cantidad de tejido foliar utilizado para hacer la prueba lo cual naturalmente incluiría una etapa extracción, concentración y clarificación más o menos compleja en dependencia de el concepto que se establezca de "estadio temprano". Esta consideración será la que decida, aún trabajando en el límite de sensibilidad del ensayo cuan útil será la prueba para diagnosticar la infección antes que aparezcan las lesiones características de esta enfermedad.

La utilización de un sistema de tres anticuerpos (TAS-ELISA) informado en el artículo 50 de tres especies mejoró notablemente la detectabilidad por amplificación cuando se comparó con la variante del conjugado directo con el policlonal de conejo (resultados no mostrados en ese artículo). Esta modalidad TAS-ELISA se encuentra bastante extendida en aplicaciones inmunoanalíticas comerciales por ejemplo de la firma Agdia de EEUU que presenta una amplia variedad de ensayos para el diagnóstico y detección de agentes infecciosos en plantas.

#### 4. Inmunoensayos indirectos.

- 4.1. Reveladores del conjugado enzimático.** Introducción de un sustrato de enzima peroxidasa para revelado de conjugado de fosfatasa alcalina en inmunoensayo tipo ELISA que incluye a un anticuerpo monoclonal que reconoce al subtipo "ad" del antígeno de superficie de la Hepatitis B **(Artículo 5).**

En los ensayos no competitivos (*sandwich* o ensayos de saturación secuencial) se utiliza un significativo exceso de anticuerpos con respecto a la concentración de antígeno. En este caso la difusión resulta un fenómeno tan decisivo como la avidéz o afinidad de las inmunoglobulinas involucradas. Mientras que la menor concentración de analito detectable en los ensayos de competencia está en el orden de  $10^7$  moléculas por mililitro, un ensayo no competitivo es potencialmente capaz de detectar concentraciones menores en varios órdenes de magnitud [138]. Por otra parte debido al exceso de uno de los componentes analíticos, el ensayo no competitivo es habitualmente más rápido que su equivalente competitivo [139].

En los ensayos tipo ELISA no competitivos de tipo *sandwich* para cuantificar antígenos o indirecto del tipo serológico para estimar el título de anticuerpos, la reacción final involucra a un compuesto cromógeno que genera un producto coloreado cuya concentración es, en un cierto rango manejable, proporcional a la concentración del analito. Por lo tanto la elección de este revelador tendrá una influencia en la sensibilidad del sistema en términos de cantidad mínima detectable. Las enzimas que, durante años, han sido más frecuentemente utilizadas en los inmunoensayos son la peroxidasa de rábano picante y la fosfatasa alcalina de intestino bovino. Con respecto a la peroxidasa, hay autores que sostienen que la relación cromógeno-producto con el par peróxido-agua es tan estrecha que deben considerarse a estos compuestos como parte de un sustrato complejo para la peroxidasa. Esta enzima utiliza como sustrato al peróxido de hidrógeno que se oxida a agua y la contraparte que intercambia electrones en el evento REDOX puede ser el cromógeno 3,3,5,5'- tetrametilbenzidina (TMB), el ortofenilendiamina (OPD) y el 2,2'-azinobis[3-etilbenzil-tiazolino-6-ácido sulfónico] (ABTS). Este último

cuya fórmula general es  $C_{18}H_{18}N_4O_6S_4$  y masa molar 514.62 g/Mol es un cromógeno soluble en agua asociado que rinde un producto de punto final de color verde. Presenta dos picos de absorción en su espectro de absorción, 410 nm y 650 nm. El ABTS es menos sensible que el OPD y el TMB en aplicaciones de ELISA pero esa misma propiedad puede ser en algunas circunstancias beneficiosas si una mayor sensibilidad produce fondos inadmisibles. Por otra parte ABTS tiene un desarrollo de color más lento (20 minutos) que los otros cromógenos lo cual también puede ser favorable por la misma razón [140].

Un estudio de la firma KPL (Gaithersburg, MD, E.E.U.U.) referido en su reporte de servicio técnico ML-108-03 comparó los cromógenos TMB, OPD y ABTS de acuerdo a su comportamiento en un ELISA de dos pasos con IgG humana como recubrimiento y un conjugado anti IgG peroxidasa en condiciones de detención y no detención de la reacción enzimática. Ellos concluyeron que el TMB fue el cromógeno de mayor señal, seguido de OPD y ABTS cuando se añadió solución detenedora. Con respecto a la relación positivo negativo la diferencia no fue tan marcada lo cual demuestra que la mayor sensibilidad no necesariamente está relacionada con la mayor señal de absorbancia obtenida. Por otra parte TMB y OPD requieren dos filtros diferentes para reacciones detenidas y no detenidas a diferencia de ABTS que requiere solo un filtro para las dos variantes de punto final siendo éste, además, un compuesto no peligroso para los operadores del ensayo y a los efectos de su desecho.

En un reciente inmunoensayo enzimático tipo ELISA-PCR [141], después de la optimización de la reacción, se evaluaron estos tres mismos compuestos. El cromógeno que aportó más sensibilidad al ensayo en términos de la relación señal-fondo fue el ABTS que genera un producto de color verde-azul con total independencia de el DNA era proveniente de extracto fúngico crudo o purificado. El ABTS, además, mostró el menor fondo y la más clara y legible condición aún a la dilución de 1:250 del conjugado de peroxidasa. El OPD fue menos sensible con un mayor fondo debido a su mayor sensibilidad a la luz y la inestabilidad del cromógeno [142]. El color naranja incipiente del OPD fue difícil distinguir del amarillo del fondo y las reacciones negativas. EL

cromógeno menos sensible fue el TMB debido a su alto fondo. La combinación de ABTS con SDS resultó la más apropiada y estos autores auguran que será una alternativa muy ventajosa en el futuro de los inmunoensayos que utilicen conjugados de peroxidasa.

Una posible aplicación al uso del ABTS como sustrato alternativo al para-nitrofenil fosfato en conjugados de fosfatasa alcalina se basa en el hecho que los inmunoensayos en los que el analito se encuentra en un extracto vegetal no pueden ser detectados a partir de conjugados de peroxidasa debido al alto contenido de esta enzima en los tejidos vegetales que obviamente contaminará, aún en trazas, la secuencia inmunoquímica provocando falsos positivos generalizados en todo el ensayo. Resultan muy conocidos los habituales bajos y desalentadores niveles de intensidad del color de la para-nitrofenol que es el compuesto coloreado resultante de la acción enzimática de la fosfatasa alcalina sobre el para-nitrofenil fosfato. Esto hace que los revelados basados en este par enzima–sustrato sean difíciles de evaluar visualmente debido a la subjetividad por la poca diferencia entre débiles positivos, negativos y blancos. Los inmunoensayos visuales son particularmente atractivos en fitopatología cuando pensamos en pruebas masivas que requieren una rápida y enérgica decisión en el campo. En estos casos sería posible y probablemente deseable introducir el ABTS como cromógeno que ofrece mayor absorbancia neta y mejor relación positivo-negativo que el sustrato colorimétrico tradicional para la fosfatasa alcalina.

**4.2. Serología diagnóstica viral con dilución única del suero.** Aplicación de la estimación del título de anticuerpos contra Citomegalovirus, virus Herpes Simplex y Adenovirus con una sola dilución del suero y una curva estándar mediante la aplicación del SUMA. (**Artículos 8, 13 y 27**).

Las enfermedades infecciosas pueden ser diagnosticadas por métodos inmunoquímicos mediante la detección de antígeno circulante (o extraído de tejidos) en ensayos de tipo directo o “sandwich” en los cuales se precisa determinar cuantitativamente la existencia de un marcador cuya concentración correlacione con el avance de la infección como es el caso del antígeno de superficie de la Hepatitis B [143]. Algunos agentes infecciosos

experimentan como, parte de su estrategia de incubación y/o evasión, períodos de ausencia antigénica en los fluidos corporales o se encuentran en los tejidos en zonas de difícil recuperación. Entonces el diagnóstico acude a los efectores de la respuesta inmune que esos agentes han provocado tras su entrada y tránsito por el organismo inmunológicamente competente. En general, la presencia (IgM) o la variación del título (IgG) de los anticuerpos específicos a un determinado agente infecciosos aportan una medida de la evolución de la infección y permiten tener una certeza de que el desarrollo de la respuesta inmune está relacionada con la sospecha de infección de un determinado microorganismo y ante un cuadro clínico específico [144].

De esta manera un ensayo tipo ELISA indirecto compuesto, en primer lugar unido a la fase sólida un antígeno apropiado y representativo del reto antigénico de la infección natural es necesario para detectar anticuerpos que el organismo infectado está generando contra este agente (representado por este antígeno) y que se unirán a él específicamente. El revelado dependerá de si el analista está interesado en revelar anticuerpos de la clase IgM si el patrón de infección es apropiado para estimación de una infección reciente [145] o en la evolución mediata de los títulos de IgG si es que se requiere la evaluación de una sero-conversión o la elevación del título específico de IgG en varios órdenes de magnitud en el transcurso de dos semanas [146].

Esta determinación de título de anticuerpo IgG específico requiere que se realicen a la muestra de suero al menos 4 diluciones en un rango apropiado de manera que la magnitud indirecta cuantificada (densidad óptica en caso de ELISA) disminuya significativamente por debajo de un valor prefijado. Este valor es establecido mediante un histograma de frecuencias que relaciona valores medidos en el mismo ensayo en una población de individuos sanos y enfermos y al que se denomina “valor de corte”. La definición de casos sanos y enfermos se establece mediante una prueba de máxima confianza a la que le llama “Prueba de Oro” y a la que se considera la “verdad absoluta” mientras no se pruebe o establezca lo contrario. De esta manera la mayor dilución del suero que ofrezca una densidad óptica superior al valor de corte será determinada como el “título” de anticuerpos específicos al agente cuyo antígeno fue vinculado a la fase sólida

del ensayo. Como puede apreciarse este valor es una aproximación por defecto a un “título real” que sería interpolado en el sitio exacto de intersección de la línea de valor de corte con la curva de dilución. Si la prueba se repite en el transcurso de dos semanas y el título específico se incrementa en al menos cuatro veces (diluciones seriadas dobles) entonces el médico puede tener una certeza de que el paciente está desarrollando una respuesta humoral frente a un agente infeccioso responsable del cuadro clínico que presenta el paciente.

El hecho de tener que realizar cuatro diluciones a cada suero para estimar el título por interpolación de la curva con el valor de corte, indudablemente, encarece la prueba porque consume 4 posibilidades diagnósticas en la placa de ELISA. Para solucionar este inconveniente se han realizado intentos por hacer una estimación del título específico de un suero por ELISA utilizando una única dilución [147]. Este procedimiento consiste en escoger un panel de sueros de amplio espectro de reactividad en términos de título específico a un agente determinado y recalculer su título por interpolación directa en la curva de titulación calculando se esta forma lo que se ha llamado el “título a punto final” que no es más que el verdadero título y no la aproximación por defecto que se acostumbra a hacer para comparar posteriormente con una próxima titulación y evaluar una sero-conversión. La estimación del título a punto final se facilita si estadísticamente, a la curva de dilución del suero se aplica logaritmo a cada eje (densidad óptica y recíproco de la dilución) se aplica una regresión lineal interpolando el valor de corte en la ecuación correspondiente. Una vez compilados los títulos a punto final de este panel de sueros representativos del espectro de reactividad de la prueba es posible, para cada dilución ensayada, confeccionar una curva estándar que relaciona los logaritmos de los recíprocos de los títulos a punto final en el eje de las abscisas con el logaritmo de las densidades ópticas en el eje de las ordenadas de cada determinación. Un detallado análisis de regresión y factibilidad puede permitir al analista seleccionar la curva estándar más precisa y operativamente practicable. Con esta curva es posible entonces evaluar en el ensayo de ELISA una sola dilución del suero problema, para una vez conocida la densidad óptica correspondiente llevarla a la curva estándar y encontrar por interpolación el título a punto final que caracteriza a ese suero. Debido a que los médicos no están

acostumbrados a manejar títulos a punto final, el analista puede hacer una aproximación por defecto de este valor y entregar como diagnóstico un título discreto que le sirva al especialista para estimar, después de una segunda prueba, si hay sero-conversión

Este enfoque fue aplicado, en los años 90, en el laboratorio de diagnóstico serológico viral en el Instituto de Medicina Tropical “Pedro Kourí” a los ensayos montados en el Sistema Ultra Micro Analítico (SUMA) [43, 97] para la titulación de sueros (IgG específica) contra Citomegalovirus (artículo 10), Herpes simplex (artículo 14) y Adenovirus (artículo 28). En el caso de Citomegalovirus, a manera de ejemplo, las determinaciones de título a punto final fueron calculadas a partir de regresiones lineales de curvas de dilución con coeficientes de determinación siempre mayores a 0.95. La curva estándar escogida para la dilución de 1/40, a partir de un panel de sueros amplio espectro de reacción, demostró una regresión lineal con un coeficiente de determinación  $r^2$  de 0.93. Con esta curva fue posible estimar los títulos a punto final de sueros problemas con una única dilución y compararlos con la determinación del título por el método clásico de cuatro diluciones. Se encontró una correlación estrecha entre ambas evaluaciones caracterizadas por un coeficiente de determinación  $r_s$  de Spearman de 0.92 para la estimación de la asociación entre magnitudes continuas y discretas.

Estos resultados demuestran que es posible utilizar una única dilución del suero, en un sistema analítico tan sensible y demandante de habilidades técnicas como el SUMA, para estimar los títulos específicos de IgG para agentes infecciosos cuyos patrones de respuesta inmunológica permitan estimar una conversión sérica como indicador diagnóstico de infección en curso con la consiguiente optimización del espacio en la placa y disminución de costos en el ensayo sin sacrificar valor diagnóstico.

## 5. Inmunoensayos de competencia.

- 5.1. Evaluación de la avidéz en respuestas humorales vacunales.** Estudio de la avidéz en respuestas humorales vacunales. Inmunoensayo de tipo ELISA de competencia para estimar la avidéz de los anticuerpos que reconocen péptidos de virus de la Inmunodeficiencia Humana (HIV) en pacientes vacunados con gp160 recombinante (**Artículo 26**).

La avidéz de una preparación policlonal de anticuerpos por su antígeno correspondiente ha tenido durante años, además de su inherente y crucial importancia fisiológica, un rol fundamental en la calidad y sensibilidad de estos anticuerpos en los ensayos diagnósticos a los que han sido destinados. Por esta razón, desde su generación en los animales de experimentación, ha sido posible mediante un apropiado protocolo de inmunización provocar la maduración de la respuesta para estos propósitos. Aunque es posible, naturalmente, evaluar de forma previa la avidéz de estas preparaciones en una prueba particular, su propia introducción en ensayo definitivo dirá la última palabra en cuanto a sensibilidad y calidad analítica [51]. En el caso de los AcMs debido a que su afinidad puede encontrarse en el rango de  $10^5-10^{12} \text{ M}^{-1}$ , los inmunoensayos competitivos utilizando anticuerpos con una  $K_d = 10^{-12} \text{ M}$  alcanzan su más alta sensibilidad en el rango picomolar [148].

Mientras que la afinidad es una medición termodinámica de la interacción de antígeno y anticuerpo medida en el equilibrio, la avidéz es una más relativa medida de la fortaleza de la interacción, enriquecida por el efecto bonificador de la policlonalidad y que es una función de la valencia antigénica, la valencia de anticuerpo, la concentración de ambos y de la afinidad individual de los anticuerpos integrantes de la preparación policlonal [149].

La evaluación de la avidéz de una respuesta humoral en respuesta a una infección es un evento de crucial importancia en el seguimiento y control de las infecciones y puede decidir la estrategia de vacunación si el agente infeccioso provoca una reacción neutralizante potenciada por la avidéz de sus anticuerpos específicos. La avidéz de una

preparación o respuesta policlonal puede medirse en un inmunoensayo mediante antígenos radiomarcados [150,151], a través de un agente caotrópico como la urea o el tiocianato que provocan el desprendimiento de antígeno inmovilizado y su anticuerpo específico y determinando lo que queda en la fase sólida [152] y también mediante ensayos de competencia en los cuales el antígeno marcado compite por el nativo por los anticuerpos o el antígeno soluble compite con el antígeno unido a la fase sólida por anticuerpos que también están en la fase fluida. [153, 154]

Con respecto al papel de la avidéz de la respuesta de anticuerpos contra el VIH y su relación con la protección [155], la atención ha sido centrada, además en los títulos neutralizantes naturales o provocados por vacunación [156, 157, 158]. Las respuestas de anticuerpos inducidas por la glucoproteína de la envoltura (Env) de los lentivirus SIV [156, 157] y de la anemia infecciosa equina [159] maduran lentamente. La maduración en función de la protección se define como el desarrollo de una avidéz significativa, altos títulos de anticuerpos neutralizantes y algún grado de actividad neutralizante cruzada. Mientras que los títulos de anticuerpos se incrementan durante varias semanas de la infección y los anticuerpos neutralizantes lo hacen durante varios meses, la avidéz de los antiseros policlonales se incrementa más lentamente alcanzando sus máximos valores entre 6 y 8 meses después de la infección. Este incremento de la avidéz es coincidente con la amplitud de la respuesta neutralizante protectora a los virus heterólogos [156, 157]. Una maduración lenta en la avidéz y el desarrollo de anticuerpos de neutralización cruzada después de los 8-12 meses se ha observado en individuos infectados con el VIH [160]. Por el contrario la avidéz de la respuesta de anticuerpos en infecciones causadas por virus diferentes a los Lentivirus como la Hepatitis C virus [161], virus Varicela-Zoster [162] y virus Rubéola [163], es rápidamente alcanzada y de manifiesta alta en intensidad en períodos de algunos meses e inclusive en algunas semanas.

El protocolo inicial del inmunoensayo de avidéz que se presenta en el artículo 27 de esta tesis llegó a mis manos en Febrero de 1992 con bastante poca robustez en términos de la definición del blanco que, en este tipo de ensayo, define el 100 % de reacción sin competencia sobre el cual será necesario calcular la afinidad relativa así como la determinación de la dilución de los sueros con la cual ejecutar los ensayos de

competencia. También fue necesario diseñar un procesamiento estadístico riguroso para llegar a resultados confiables en cuanto a la afinidad relativa como medida de la avidéz de los anticuerpos de los pacientes seropositivos inmunizados con gp160 recombinante. El inmunoensayo de competencia para estudiar la avidéz se montó sobre un diseño anterior para péptidos sintéticos del lazo V3 de la gp120 del VIH [164] que tenía la característica de no necesitar bloqueo debido a la compactación del recubrimiento peptídico que impedía a los anticuerpos del suero y los del conjugado su acceso al soporte sólido de la placa.

EL número de repeticiones del blanco de competencia (PBS Tween en lugar de péptidos en solución compitiendo por el péptido) fue aumentado a 5 en cada placa para garantizar una cifra estadísticamente robusta sobre la cual calcular el 50% de señal máxima. Sucedió lo mismo con la concentración de péptido en solución que definió el otro extremo de la curva de competencia o señal mínima cuando el péptido unido a la fase sólida no tuvo oportunidad de recibir los anticuerpos del suero por estar saturados de péptido en solución. Estos dos niveles extremos de señal son el resultado de valores asintóticos muy difíciles de estandarizar mediante promedios, sobre todo el inferior cuando la señal tiene al fondo del experimento que es la reacción cuando se utiliza como blanco PBS-Tween en lugar de la mezcla anticuerpo y péptidos en competencia. Otro aspecto interesante de la puesta a punto es la selección de la dilución de anticuerpo para lugar una competencia comparable entre muestras de suero. En este sentido el protocolo original de Steward [148] indica que debe utilizarse una dilución del suero que rinda una absorbancia de 0.5 unidades y en nuestro artículo se indica un rango entre 0.5 y 1.0 unidades. La práctica demostró que cuando se fijó una dilución de los sueros mucho más precisa a partir de valores de  $1.0 \pm 0.1$  unidades de absorbancia, se obtuvieron valores mucho más consistentes y reproducibles en las concentraciones molares inhibitorias. La interpolación estadística (y no gráfica) permitió una mayor precisión en la determinación de esta concentración que finalmente fue importante en el análisis de la significación en el incremento de la avidéz. Llama la atención el tratamiento lineal de la inhibición por competencia cuando el tratamiento sigmoidal (ecuación de Boltzman) pudo aplicado ampliando el rango de análisis pero, realmente, el segmento lineal de la curva contuvo

suficientes punto de inhibición como para ser considerado, simplificando los cálculos naturalmente.

La optimización de este inmunoensayo de competencia en el artículo 27 para determinar la avidéz, y junto a otras determinaciones, la funcionalidad de una respuesta humoral que se intenta sea protectora demuestra que los parámetros de control de calidad del ensayo y la robustez del tratamiento estadístico pueden ser decisivos para obtener los resultados consistentes y reproducibles que se pretendió con su elección en el protocolo de investigación.

## **5.2. Cuantificación de citolisinas. Inmunoensayo de tipo ELISA de competencia para la cuantificación de Sticholisina I y II (Artículo 41).**

Siempre se había dicho en los círculos inmunoanalíticos que para la detección cuantitativa de antígenos pequeños los ensayos radioisotópicos [36] competitivos eran los más sensibles y por lo tanto mejores. Esta consideración histórica ha sido modificada con los años y estaba racionalmente basada en la inherente sensibilidad en la detección con isótopos. Los tradicionales ensayos para hormonas, antibióticos y otras moléculas orgánicas de importancia clínica o farmacológica en los años 60, 70 y 80 son testigos fieles de esta evolución. La práctica analítica masiva y rutinaria condenó a los ensayos isotópicos por lo costoso de los isótopos, los equipos de detección y sobre todo por la peligrosidad de manipulación y descarte de desechos radiactivos. Por otra parte en los años 80 los ensayos inmunoenzimáticos bajaron la elitista barrera de los nanogramos y comenzaron a competir analíticamente con los ensayos radioisotópicos [38]

Indudablemente el tamaño del antígeno y de la molécula que centra el revelado (isótopo o enzima) en un ensayo de competencia determina la factibilidad del ensayo. Por supuesto la primera premisa que debe cumplirse es que las especies que deben competir lo hagan en un rango suficientemente sensible para la cuantificación. En el caso de los ELISA además del clásico diseño de antígeno marcado y no marcado (caliente y frío, en la jerga

analítica) es posible pensar en un escenario para la competencia entre el antígeno fijado en la placa y el antígeno en solución por el anticuerpo que también está en solución. En este caso, naturalmente, la condición poli o monoclonal de las inmunoglobulinas utilizadas, su avidéz o afinidad, el peso molecular del analito y el número de epítomos y su repetición así como el grado de purificación del antígeno capturado en la fase sólida y los contaminantes del analito en solución, deben decidir la factibilidad del ensayo de cuantificación [154]

Otro aspecto a tener en cuenta es la selección del rango de cuantificación y el procesamiento de ajuste de regresión este rango. En estos ensayos la definición del 100% de reactividad a partir del cual la competencia del analito en solución comienza a disminuir la densidad óptica debe contener una robustez de precisión a la cual debe conferírsele toda la atención. Hemos encontrado que nunca debe trabajarse este 100% con menos de cinco réplicas [165] como criterio de exclusión de los valores apartados de la tendencia. Por lo tanto este valor promedio debe ser trabajado con criterios estrictos de calidad (epígrafe 5.1 de esta tesis).

La posibilidad de trabajar en un rango lineal de la curva de competencia es factible desde el punto de vista estadístico de igual manera que en una curva de saturación es posible sacrificar las dos secciones parabólicas y trabajar en la sección lineal. Este enfoque tiene dos inconvenientes, el primero es que se restringe el rango de estimación lo cual provoca que el analista deba intuir con mucha estrechez las diluciones que deberá practicar a su muestra con analito para que la determinación de densidad óptica quede incluida en el rango de interpolación y evitar así las muy criticadas (con razón) e inseguras interpolaciones cuando los comportamientos dejan de ser lineales. El otro inconveniente es que aferrándose un rango lineal para simplificar los cálculos muchas veces se sacrifica el nivel de sensibilidad o detectabilidad en términos de cantidad mínima detectable. Antes del advenimiento de los procedimientos estadísticos cibernéticos en computadoras personales, para hacer un ajuste sigmoideal con predicciones había que tener algo más que una calculadora aritmética por no decir que hace 30 años había que luchar con Fortran y las tarjetas perforadas en una CID-201B. Por lo tanto los ensayos de competencia se han

favorecido con las facilidades computacionales actuales cuando se trata de interpretar los resultados con procedimientos estadísticos de ajustes de regresión.

El inmunoensayo de competencia informado en el artículo 41 fue puesto a punto con la intención de cuantificar la Sticholisina II (StII) y la Sticholisina I (StI) así como confirmar su identidad antigénica para ser utilizadas como inmunotoxinas en la obtención de conjugados para ensayos contra células tumorales.

La alta homología entre la StII y la StI permitió cuantificar a esta segunda molécula en el mismo ensayo de competencia con los anticuerpos policlonales de conejo que fueron obtenidos inmunizando con StII purificada. Los parámetros de calidad de este ensayo fueron:

Rango de cuantificación: 2.5 -1149ng/mL

Ajuste sigmoideal (ecuación de Boltzman):

$$y = \frac{0.91399}{1 + e^{(x-4.38791) / 0.51562}} + 0.19358$$

$$\chi^2 = 0.000317$$

Detectabilidad: 2.5ng/mL

Precisión (repetibilidad): C.V. menor del 10%

(reproducibilidad): C.V. menor del 15%

Con estos criterios de calidad este ensayo no solo sirvió de base para estimar la homología antigénica de ambas moléculas sino para establecer un método de cuantificación específico y confiable de cada una de las citolisinas con la misma preparación policlonal purificada, naturalmente, utilizando la curva estándar correspondiente.

## 6. Consideraciones finales

Los anticuerpos, desde el punto de vista analítico, son considerados reactivos ideales para el reconocimiento específico, confiriendo de forma inherente un elemento selectivo que se suma a la potencia físico-química analítica de la instrumentación que complementa el ensayo. Por ello son vistos como los verdaderos co-protagonistas en los bioensayos y los biosensores. La alta afinidad y especificidad por sus antígenos (analitos) permiten una unión selectiva en el rango de nano y pico moles en medio de muchas otras muchas biomoléculas incluyendo proteínas estructuralmente relacionadas y que pueden sobrepasar la concentración del analito en dos o tres órdenes de magnitud. Un impactante ejemplo histórico de la alta especificidad de un antisuero fue presentado en 1928 cuando Landsteiner y van der Scheer demostraron que un método inmunoquímico pudo, inequívocamente, distinguir entre dos isómeros ópticos de acetato de fenil-p-aminobenzoil-amina [166].

De esta manera los inmunoensayos determinan (detectan y/o cuantifican) analitos sin enriquecimiento o concentración, purificación o pre-tratamiento, procedimientos que frecuentemente dificultan y encarecen a los métodos analíticos y que son imprescindibles para procedimientos estandarizados y reconocidos como la cromatografía líquida de alta presión, la cromatografía gaseosa o la espectrometría de masas. De forma especial en el diagnóstico clínico donde es necesario analizar muestras muy complejas como sangre total, suero o plasma, orina y heces que contienen una gran cantidad de sustancias, orgánicas y biomoleculares, los inmunoensayos representan muy frecuentemente una alternativa muy deseable en cuanto a tiempo y sensibilidad [38, 41].

Reforzado con el advenimiento y consolidación de la Tecnología de Hibridomas para generar anticuerpos monoclonales, hoy día es posible obtener anticuerpos contra casi cualquier analito inclusive moléculas orgánicas relativamente pequeñas originalmente no inmunogénicas por conjugación química con transportadores muy inmunogénicos como la albúmina bovina o la hemocianina obteniéndose anticuerpos que después reconocen al analito desacoplado del transportador. Los anticuerpos recombinantes han permitido

generar reactivos específicos contra moléculas muy tóxicas que no admiten inmunización o que son inestables *in vivo*. Los fragmentos de anticuerpos recombinantes de cadena simple desplegados en fagos filamentosos [167, 168] o ribosomas [169, 170] son seleccionados de bibliotecas enormes por encuentro e identificación de sus antígenos y en una suerte de selección artificial pueden ser mutados y enfrentados de nuevo con un panel de antígenos lo cual imita los procesos naturales de maduración de la afinidad [171].

La tecnología de anticuerpos recombinantes ha sido llevada a un nivel que permite la expresión de un fragmento de simple cadena variable (scFv) en *E. coli* en grandes cantidades y a un costo razonable. In cultivos de células de mamíferos el rendimiento es de aproximadamente 0.5–1 g/L con costos de cerca de 500 USD/g mientras que en bacterias el rendimiento puede llegar a 3 g/L con un costo de 200 USD/g [172]. Sin embargo en comparación con otros métodos bioanalíticos como los ensayos enzimáticos en los cuales la actividad enzimática es seguida directamente por el producto enzimático, la unión de un antígeno con su anticuerpo es acompañada por un pequeño cambio en las propiedades físico-químicas de ambas especies. En casi todos los inmunoensayos el evento de unión es analizado mediante una reacción auxiliar a partir de uno de los inmuno-reactantes conjugado con un marcador que refleja una señal espectrofotométrica que es proporcional a la cantidad de analito. Partiendo de los isótopos, cada vez más abandonados por sus secuelas humanas y ambientales, se han utilizado una serie de marcadores como enzimas, fluoróforos, compuestos REDOX, cofactores, apagadores fluorescentes, metales quimioluminiscentes, partículas de latex, liposomas, etc [173].

Los ensayos inmunoenzimáticos exploran o explotan todas las propiedades de los anticuerpos tanto estructurales como funcionales como son en primer lugar su extraordinaria capacidad para reconocer específicamente motivos estructurales tridimensionales en las biomoléculas con alta afinidad. Esto garantiza la sensibilidad necesaria para que los ensayos en los que intervienen tengan el nivel de detectabilidad requerida desde el punto de vista analítico. Los anticuerpos pueden ser también los analitos cuando los métodos serológicos nos permiten descubrir, mediante su presencia y título (concentración/avidez) las huellas inmunológicas de una infección latente o actual

o cuando es posible valorar la magnitud de la avidéz por un epítopo con la que la respuesta policlonal de un paciente se enfrenta a un agente infeccioso. Esta evaluación puede ser definitoria para el pronóstico del desarrollo de la enfermedad [42, 49].

La tendencia actual a la miniaturización seguirá siendo una importante consideración en el diseño y desarrollo de ensayos y analizadores. Los sistemas de alto flujo de pesquisaje para el descubrimiento de nuevas drogas y los análisis a gran escala para los estudios genéticos necesitarán de estos conceptos de miniaturización. Existen numerosos ejemplos de ensayos y procesos analíticos que han sido adaptados con éxito al formato *microchip* y el objetivo tener un laboratorio en un chip parece estar al alcance de la mano. Los microchips fabricados en plástico [174] posibilitan ya la sustitución de los materiales completos en los dispositivos siliconados [175]. Hoy en día el desarrollo de las nanotecnologías en el terreno de la analítica es una realidad con la introducción de los nanochips [176]

Los progresos en los inmunoensayos automatizados has sido impresionantes pero mucho más se vislumbra debido a la necesidad imperiosa de análisis masivos. Muchos inmunoensayos homogéneos son hoy día, casi inadvertidamente, integrados en los pesquisajes rutinarios de química clínica. Muchos de los más demandantes inmunoensayos heterogéneos puestos a punto en sistemas especializados ofrecen hoy atractivas opciones como operación continua y acceso aleatorio a una matriz de muestras lo que permita el análisis puntual y no secuencial como era tradicional. No obstante estas innovaciones. No obstante todavía la calidad analítica de estos en inmunoensayos muy automatizados debe ser mejorada. Nuevos y poderosos marcadores diagnósticos podrán ser introducidos solo si los sistemas automatizados son suficientemente confiables [177]. Por supuesto los mejores resultados de estas pruebas tendrán un costo inherente pero finalmente la automatización misma ayudará a reducir los costos. Las megacorporaciones emergentes en la industria del diagnóstico tienen amplios recursos para enfrentar estos retos pero la comunidad de los laboratorios deberá ser tenaz para demandar la calidad necesaria a precios razonables [178].

La combinación de las cualidades estructurales y funcionales de los anticuerpos los hacen especímenes biomoleculares de relevante importancia como efectores de la Respuesta Inmune Humoral y como herramientas indispensables en la bioanalítica presente y futura. A pesar de los extraordinarios avances tecnológicos que buscan aumentar la eficiencia y sensibilidad en los Inmunoensayos para enfrentar nuevos (y viejos) retos, y que por supuesto implican una enorme disponibilidad de recursos financieros para su desarrollo y utilización, el formato ELISA convencional continúa siendo una herramienta analítica indispensable en todo laboratorio en el que se aíslan, purifican y caracterizan biomoléculas principalmente proteínas. Esta mentalidad inmunoanalítica cualitativa o cuantitativa donde la posibilidad de “crear” un inmnoensayo con fines académicos, investigativos o prácticos pasa, necesariamente, por un conocimiento profundo de la estructura y función de los anticuerpos, sigue teniendo como componente fundamental a las inmunoglobulinas portadoras de esa extraordinaria cualidad que es la especificidad.

## 7. Referencias bibliográficas:

1. Otero A (1997) Producción de Anticuerpos Monoclonales. Tecnología del Hibridoma. Capítulo IX. En: "Inmunología Experimental" (Pico MC, Giraldino I y Otero A, Eds.) Editorial Félix Varela, La Habana, Pág. 271.
2. Lombard M, Pastoret PP, Moulin AM (2007). "A brief history of vaccines and vaccination". *Rev. - Off. Int. Epizoot*, **26**(1): 29.
3. Isenberg, H.D. (1990) Microbiology and Immunology: Parent and (Adult) Offspring. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, **6** (3): 287.
4. Bordet, J (1898) Sur l'agglutination et la dissolution des globules rouges par le serum d'animaux injectes de sang defibrine. *Ann. De l'Inst. Pasteur*. **xii**: 688-695.
5. Ehrlich P (1960) *The collected papers of Paul Ehrlich*, Pergamom, London Vol 3.
6. Winau F, Westphal O, Winau R (2004) Paul Ehrlich: "In search of the magic bullet", *Microbes Infect.* **6** (8): 786.
7. von Behring E, Kitasato S. (1890) On the acquisition of immunity against diphtheria and tetanus in animals (German). *Dtsch. Med. Wochensch*, **16**: 1145.
8. Karl Landsteiner (1933) Die Spezifität der serologischen Reaktionen. Berlin: Springer, 1933. - **IV**, 123 p; 24 cm 0194309.
9. Metchnikoff E (1905) Immunity in Infective Diseases (translated by F.G. Binnie). Cambridge University Press, Cambirdge, England. ISBN 68025143.
10. Wright AE and Douglas SR (1904) An experimental investigation of the role of the body fluids in connection with phagocytosis. *Proc. R. Soc. London*, **72**: 357.
11. Van Epps HL (2006). Michael Heidelberger and the demystification of antibodies. *J. Exp. Med*, **203** (1): 5.
12. Marrack JR (1938). *Chemistry of antigens and antibodies*, 2nd ed., London: HisMajesty's Stationery Office.
13. Tiselius A and Kabat E. (1939) An electrophoretic study of immune sera and purified antibody preparations. *J. Exp. Med.*, **69**, 119.
14. Pauling L (1970) Fifty Years of Progress in Structural Chemistry and Molecular Biology. *Dædalus*, **99** (4): 988.

15. Nelson D and Cox M (2004) Lehninger Principles of Biochemistry, Fourth Edition. W. H. Freeman Pub, ISBN: 0716743396.
16. Frageaus A (1948) Antibody production in relation to the development of plasmacells. *Acta Med. Scan*, (**suppl.**): 204.
17. Jerne NK (1955) The Natural-Selection Theory Of Antibody Formation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **41**: 849.
18. Burnet FM (1957) A modification of Jerne's theory of antibody production using the concept of clonal selection. *Australian Journal of Science*, **20**: 67.
19. Edelman GM and Gally JA (1962). The nature of Bence-Jones proteins. Chemical similarities to polypeptide chains of myeloma globulins and normal gamma-globulins. *J. Exp. Med.*, **116**: 207.
20. Stevens FJ, Solomon A, Schiffer M (1991) Bence Jones proteins: a powerful tool for the fundamental study of protein chemistry and pathophysiology..*Biochemistry*, **30**(28): 6803.
21. Edelman GM and Benacerraf B (1962) On structural and functional relations between antibodies and proteins of the gamma system. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S. A.*, **48**: 1035.
22. Porter RR (1973) Structural studies of immunoglobulins. *Science* **180**: 713.
23. Tomasi TB and Bienenstock J (1968) Secretory immunoglobulins. *Adv Immunol.* **9**: 1.
24. Rowe DS and Fahey JL (1965) A new class of human immunoglobulins. *J. Exp.Med.* **121**: 171.
25. Ishizaka K, Ishizaka T and Hornbrook MM (1966) Physico-chemical properties of human reaginic antibody. IV. Presence of a unique immunoglobulin as a carrier of reaginic activity. *J Immunol*, **97**: 75.
26. Hozumi N and Tonegawa S (1976). Evidence for somatic rearrangement of immunoglobulin genes coding for variable and constant regions. *Proc. Natl. Acad.Sci. U.S.A.*, **73**(10): 3628.
27. Kohler G and Milstein C (1975) Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature* **256** (5517): 495.

28. Pauling L (1948) Molecular structure and biological specificity. [Presidential address at Section 2, 11th International Congress of Pure and Applied Chemistry, London, July 17-24, 1947] *Chem. Ind. Supple*, 1-4.
29. Tramontano A, Janda KD, Lerner RA (1986) Catalytic antibodies. *Science*, **234**: 1566.
30. Winter G and Milstein C (1991) Man-Made Antibodies. *Nature* **349**: 293.
31. Kontermann RE (2004) Intrabodies as therapeutic agents. *Methods*, **34**: 163.
32. Revets H, De Baetselier, P Muyldermans S (2005) Nanobodies as Novel Agents for Cancer Therapy. *Expert Opinion on Biological Therapy*, **5**(1): 111.
33. Andreotti P E, Ludwig GV, Peruski AH, Tuite JJ, Morse SS, Peruski LF (2003) Immunoassays of infectious agents. *BioTechniques*, **35**: 850.
34. Gabaldon JA, Maquieira A, Puchades R (1999) Current trends in immunoassay-based kits for pesticide analysis. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr*, **39**: 519.
35. Sherry J (1997) Environmental immunoassays and other bioanalytical methods: overview and update. *Chemosphere*, **34**: 1011.
36. Yallow RS and Berson SA (1959) Assay of plasma insulin in human subjects by immunological methods. *Nature (London)* **184**: 1648.
37. Engvall E and Perlman P (1971) Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Quantitative assay of immunoglobulin G. *Immunochemistr.*, **8**(9):871.
38. Voller A, Bartlett A and Bidwell D (1981) *Immunoassays for the 80s*. Baltimore: University Park Press.
39. Peruski AH Johnson LH III and Peruski LF Jr. (2002) Rapid and sensitive detection of biological warfare agents using time-resolved fluorescence assays. *J. Immunol. Methods*. **263**: 35.
40. Uithoven KA, Schmidt JC and Ballman ME (2000) Rapid identification of biological warfare agents using an instrument employing a light addressable potentiometric sensor and a flow-through immunofiltration-enzyme assay system. *Biosens. Bioelectron*, **14**:761.
41. Ekins R and Chu RW (1997) Microspot®, array-based, multianalyte binding assays: the ultimate microanalytical technology? En: "Principals and Practices of munoassays 2nd Edition" (Price CP and Newman DJ Edts.) Stockton, New York. Pag 625.

42. Price CP (1998) Progress in immunoassay technology. *Clin Chem Lab Med*, **36**: 341.
43. Körner H, Rodriguez L, Fernandez Yero JL, Schulze M, Horn A, Heredero L, Witkowski R, Tinschert S, Oliva J, Sommer D (1986) Maternal serum alpha-fetoprotein screening for neural tube defects and other disorders using an ultramicro-ELISA. Collaborative study in Cuba and in the German Democratic Republic. *Hum Genet*, **73**(1): 60.
44. Weller MG, Schuetz AJ, Winklmaier M, Niessner R (1999) Highly parallel affinity sensor for the detection of environmental contaminants in water. *Anal Chim Acta*, **393**: 29.
45. Warsinke A, Benkett A and Scheller-Fresenius WJ (2000) Electrochemical immunoassays. *J Anal Chem*, **366**: 622.
46. Nichol ST, Arikawa J and Kawaoka Y (2000) Emerging viral diseases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **97**:12411.
47. Kortepeter MG, and Parker GW (1999) Potential biological weapons threats. *Emerging Infectious Diseases*, **5**: 523.
48. Armstrong WV (2002) Principles and Practice of Monitoring Immunosuppressive Drugs. *J Lab Med*, **26** (1/2): 27.
49. Peruski AH and Peruski LF (2003) Immunological Methods for Detection and Identification of Infectious Disease and Biological Warfare Agents. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, **10**(4): 506
50. Peruski LF and Peruski AH (2003) Rapid diagnostic assays in the genomic biology era: detection and identification of infectious disease and biological weapon agents. *Biotechniques*. **35**(4): 840.
51. Voller A, Bidwell DE, Bartlett A (1976) Enzyme immunoassays in diagnostic medicine. Theory and practice. *Bull World Health Organ*, **53**(1) 55.
52. Wright PF, Nilsson E, Rooij EMV, Lelenta M and Jeggo MH (1993) Standardisation and validation of enzyme-linked immunosorbent assay techniques for the detection of antibody in infectious disease diagnosis. *Rev. Sci. Tech*, **12**: 435.
53. Kohn J (1968) An immunochromatographic technique. *Immunology* **15**: 863.
54. McKenzie S (1988) Whole blood assay of theophylline concentrations using immunochromatographic stick. *Arch. Dis. Child*. **63**: 571.

55. Horton JK, Swinburne S and O'Sullivan MJ (1991) A novel, rapid, single-step immunochromatographic procedure for the detection of mouse immunoglobulin. *J. Immunol. Methods*, **140**: 131.
56. Valenti S, Sarkissian A, Giordano G and Dahl KD (1995) A technique for sorting rat gonadotropes using anti-LH or anti-FSH antibodies covalently attached to magnetic beads. *J. Neuroendocrinol*, **7**: 673.
57. Evangelista RA, Pollak A, Allore B, Templeton EF, Morton RC and Diamandis EP (1988) A new europium chelate for protein labelling and time-resolved fluorometric applications. *Clin. Biochem*, **21**: 173.
58. Peruski AH, Johnson LH III and Peruski LF Jr (2002) Rapid and sensitive detection of biological warfare agents using time-resolved fluorescence assays. *J. Immunol. Methods*, **263**: 35.
59. Yu H (1998) Comparative studies of magnetic particle-based solid phase fluorogenic and electrochemiluminescent immunoassay. *J. Immunol. Methods*, **218**: 1.
60. Lea T, Vartdal F, Nustad F, Funderud S, Berge A, Ellingsen T, Schmid R, Stenstad P and Ugelstad J (1988) Monosized, magnetic polymer particles: their use in separation of cells and subcellular components, and in the study of lymphocyte function in vitro. *J. Mol. Recognit*, **1**: 9.
61. Yang H, Leland JK, Yost D and Massey RJ (1994) Electrochemiluminescence: a new diagnostic and research tool. ECL detection technology promises scientists new "yardsticks" for quantification. *Bio/Technology*, **12**: 193.
62. Gatto-Menking DL, Yu H, Bruno JG, Goode MT, Miller M and Zulich AW (1995) Sensitive detection of biotoxoids and bacterial spores using an immunomagnetic electrochemiluminescence sensor. *Biosens. Bioelectron*, **10**: 501.
63. Puchades R, Maquieira A, Atienza J and Herrero MA (1990) State of the art in on-line techniques coupled to flow injection analysis FIA/on-line. A critical review. *Journal of Automatic Chemistry*, **12**(4): 163.
64. Stockein W, Blasey H, Ross A and Scrimps R (1989) Proceedings of the International Symposium in Liquid Chromatography and Flow Injection Analysis (HPLC/FIA) Cordoba, Spain, p 48.

65. Yelton DE, Margulies DH, Diamond B and Scharff M (1980) Plasmacytomas and Hybridomas. Development and applications. En “Monoclonal Antibodies. Hybridomas: A New Dimension in Biological Analyses” (Kennett R.H, McKearn T.J and Bechtold KB eds.) Plenum Press. New York and London, . I: Introduction, Pag 3.
66. Potter M (1972) Immunoglobulin-producing tumors and myeloma proteins of mice. *Physiol. Res*, **52**: 631.
67. Potter M, Rudikoff S, Radian EA and Vrana M (1977) Covalent structure of the antigenbinding site: Antigen binding myeloma proteins of the Balb/c mouse. En: “Antibodies in Human Diagnosis and Therapy”. (Harper E and Krauser RM Eds.) Raven Press New York, Pag 9.
68. Yelton DE, Margulies DH, Diamond Band Scharff D (1980) Plasmacytomas and Hybridomas. Developments and Applications. En: “Monoclonal Antibodies. Hybridomas: A New Dimension in Biological Analysis”. (Kennett RH, McKearn J and Bechtol KB Eds.) Plenum Press. New York and London, III: The fusion of mouse Myeloma to immuno spleen cells, Pag 8.
69. Kennett RH, comunicación personal, Escuela de Medicina, Universidad de Pennsylvania, Philadelphia, E.E.U.U., 1983.
70. Gavilondo JV (1995) Anticuerpos Monoclonales. Elfos Scientiae, La Habana, Cuba.
71. Aiba S, Humphrey AE and Millis XF (1964) Biochemical Engineering. Academic Press , New York and London, Pag 100.
72. Sinclair WK and Ross DW (1969) Modes of Growth in Mammalian Cells. *Biophysical Journal*, **9**: 1056.
73. Sherley JL, Stadler PB and Stadler JS (1995) A quantitative method for the analysis of mammalian cell proliferation in culture in terms of dividing and non-dividing cells. *Cell Prolif.*, **28**(3): 137.
74. Schoenherr I, Stapp T and Ryll T (2000) A comparison of different methods to determine the end of exponential growth in CHO cell cultures for optimization of scale-up. *Biotechnol Prog.*, **16**(5): 815.
75. Skehan P, Friedman SJ (1984) Non-exponential growth by mammalian cells in culture. *Cell Tissue Kinet*, **17**(4): 335.

76. Smith FE (1952) Experimental methods in population dynamics: a critique. *Ecology*, **33**: 441.
77. Kun E and Abood LG (1949) Colorimetric estimation of succinic dehydrogenase by triphenyltetrazolium chloride. *Science* **109**:144.
78. Pearse AGE (1972) Principles of oxidoreductase histochemistry. En: "Histochemistry, Theoretical and Applied", 3<sup>rd</sup> Ed, Churchill Livingstone, Edinburgh, Cap. 20.
79. Altman FP (1977) Tetrazolium salts and formazans. *Prog. Histochem Cytochem.***9**: 1.
80. Divecchia L and Somerson NL (1973) Tetrazolium Reduction as a Measure of Metabolic Activity For Glass-Adherent Mycoplasma Pneumoniae. *Applied Microbiology*, **26**: 298.
81. Schaeffer WI and Friend K (1976) Efficient detection of soft-agar grown colonies using a tetrazolium salt. *Cancer Letters*, **1**: 275.
82. Alley MC and Lieber MM (1984) Improved optical detection of colony enlargement and drug cytotoxicity in primary soft agar cultures of human solid tumour cells. *Br. J. Cancer*, **49**: 225.
83. Mosmann T (1983) Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods*, **65**: 55.
84. Scudiere DA, Shoemaker RH, Paul, KD, Monks A, Tierney S, Nofziger TH, Currens MJ, Seniff D and Boyd MR (1988) Evaluation of a Soluble Tetrazolium/Formazan Assay for Cell Growth and Drug Sensitivity in Culture Using Human and Other Tumor Cell Lines. *Cancer Research*, **48**: 4827.
85. Pollack R (1981) Mechanisms of growth control. En "Readings in Mammalian Cell Culture" (Pollack R Ed.) Cold Spring Harbor, New York, Pag 243.
86. Holley RW and Kierman RA (1968) Contact inhibition of cell division in 3T3 cells. *Proc. Natl. Acad. Sci*, **60**: 300.
87. Holley RW (1975) Control of growth in mammalian cell cultures. *Nature*, **258**: 487.
88. Aarden LA, Lansdorp PM and De Groot ER (1985) A growth factor for B cell hybridomas produced by human monocytes. *Lymphokines*, **10**: 75.
89. Aarden LA, De Groot ER, Schaap OL, Lansdorp PM (1987) Production of hybridoma growth factor by human monocytes *Journal of Immunology*, **17**: 1411.

90. Cabrera L, Hernández S y Gavilondo J (1986) Utilización del hibridoma B de ratón IOR-L1 en un micro ensayo para la detección de factores estimuladores de la proliferación de células de origen B. *Libro de resúmenes: II Seminario Cubano sobre Interferón, I Seminario Cubano sobre Biotecnología. La Habana, Cuba, Pag 04-50.*
91. Astaldi GC, Janssen MC, Lansdorp P, Willems C, Zeijlemaker WP and Oosterhof F (1980) Human endothelial culture supernatant (HECS): a growth factor for hybridomas. *Journal of Immunology*, **125**(4): 1411.
92. Sugasawara RJ, Cahoon BE, Karu AE. (1985) The influence of murine macrophage-conditioned medium on cloning efficiency, antibody synthesis and growth rate of hybridomas. *J Immunol Methods*, **79**(2): 263.
93. Rathjen DA and Geczy CL (1986) Conditioned medium from macrophage cell lines supports the single-cell growth of hybridomas. *Hybridoma*, **5**(3): 255.
94. Liu RS, Ta D, Payne J, Coccia M, Kuus-Reichel K (1998) Generation of murine monoclonal antibodies in serum-free medium. *Hybridoma*, **17**(1): 69.
95. Phillips SM and Zodda DM (1984) Monoclonal antibodies and Immunoparasitology. En: "Monoclonal Antibodies and Functional Cell Lines. Progress and Applications" (Kennett RH, Bechtol K and McKearn TJ Eds.) Plenum Press New York and London, Pag 239.
96. César Milstein, comunicación personal, Hospital Karolinska, Estocolmo, Suecia, 1991.
97. Tecno SUMA Internacional S.A., Ciudad Habana, Cuba
98. Mushens RF, Guest AR and Scott ML (1993) Quantitation of monoclonal antibodies by ELISA: The use of purified mouse IgG and mouse IgM monoclonal antibodies as standards in a quantitative ELISA measuring monoclonal antibodies produced by cell culture. *J. Immunol Methods*, **162**: 77.
99. Harris WJ and Adair JR (1997) Antibody Therapeutics, CRC Press, Boca Raton, Pags 73, 89 y 277.
100. Sulimenko T and Dráber P (2004) A fast and simple dot-immunobinding assay for quantification of mouse immunoglobulins in hybridoma culture supernatants. *J. Immunol. Methods* **289**: 89.

101. Fleming JO, Pen JB (1988) Measurement of the concentration of murine IgG monoclonal antibody in hybridoma supernatants and ascites in absolute units by sensitive and reliable enzymelinked immunosorbent assays (ELISA). *J. Immunol. Methods* **110**: 11.
102. Delaunay T, Louahed J and Bazin, H (1990) Rat (and mouse) monoclonal antibodies: VIII. ELISA measurement of Ig production in mouse hybridoma culture. *J. Immunol. Methods* **131**: 33.
103. Gupta RK and Siber GR (1995) Methods for quantitation of mouse IgG subclass antibodies in mouse serum by enzyme-linked immunosorbent assay. *J. Immunol. Methods* **181**: 75.
104. Lejon V, Legros D, Richer, M 4, Ruiz JA, Jamonneau V, Truc P, Doua F, Dje N, N'Siesi FX, Bisser S, Magnus E, Wouters I, Konings J, Vervoort T, Sultan F, and Buscher P (2002) IgM quantification in the cerebrospinal fluid of sleeping sickness patients by a latex card agglutination test. *Tropical Medicine and International Health* .7(8): 685.
105. Arai K, Yoshinari K, Matsumoto K and Misaki H (1998) An ELISA to determine the biodistribution of human monoclonal antibody in tumor-xenografted SCID mice. *Journal of Immunological Methods*, **217** (1-2): 79.
106. Janata J (1975) An immunoelectrode. *J Am Chem Soc*, **97**: 2914.
107. Bergveld P (1991) A critical evaluation of direct electrical protein detection methods. *Biosen Bioelectron*, **6** :55.
108. Weber StG, Long JT (1988) Detection limits and selectivity in electrochemical detectors. *Anal Chem*, **60**: 903A.
109. Jenkins SH, Halsall HB, Heinemann WR (1988) Extending the detection limit of solid-phase electrochemical enzyme immunoassay to the attomole level. *Analytical Biochemistry*, **168**: 292.
110. Self CH. *Patente Europea*. Appl. 80 303 478.4 (15.04.81)
111. Johannsson A, Ellis DH, Bates DL, Plumb AM, Stanley CJ (1986) Enzyme amplification for immunoassays. Detection limit of one hundredth of an attomole. *J Immunol Meth*, **87**: 7.

112. Bergel A, Soupe J, Comtant M (1989) Enzymatic amplification for spectrophotometric and electrochemical assays of NAD<sup>+</sup> and NADH. *Anal Biochem*, **179**: 382.
113. Tang X, Johansson G (1995) Enzyme Electrode for Amplification of NAD /NADH Using Glycerol Dehydrogenase and Diaphorase with Amperometric Detection. *Anal Lett*, **28**: 2595..
114. Tang HT, Lunte CF, Halsall HB, Heineman WR (1988) p-Aminophenyl phosphate: an improved substrate for electrochemical enzyme immunoassay. *Anal Chim Acta*, **214**: 187.
115. Wijayawardhana CA, Halsall HB, and Heineman WR (1999) Micro volume rotating disk electrode (RDE) amperometric detection for a bead-based immunoassay. *Analytica Chimica Acta*, **399**(1-2): 3.
116. Bickerstaff GF and Zhou H (1993) Protease activity and autodigestion (autolysis) assays using Coomassie blue dye binding. *Anal Biochem*, **210**: 155.
117. Sarath G, de la Motte, RS and Wagner FW (1989) Protease assay methods En: "Propteolytic enzymes: A prectical approach" (Beynon RJ and Bond JS, Eds.) IRL Press, Oxford, Pag 22.
118. Wunderwald P (1984) Proteinases (proteins as substrates) En: "Methods of Enzymatics analysis" (Bergmeyer HU and Grassl M, Eds.). Verlag Chemie, Deerfield Beach, Fla, vol 5, Pag 258.
119. Saleemuddin M, Ahmad H and Husain A (1980) A simple, rapid, and sensitive procedure for the assay of endoproteases using Coomassie brilliant blue G-250. *Anal Biochem*, **105**: 202.
120. Hatakeyama T, KohzakiH and Yamasaki N( 1992) A microassay for proteases using succinylcasein as a substrate. *Anal Biochem*, **204**: 181.
121. Kunitz M (1947) Crystalline Soybean Trypsin Inhibitor: II. General Properties. *Jour.Gen Physiol*, **30**: 291.
122. Burokerkilgore M and Wang KKW (1993) A Coomassie Brilliant Blue G-250-Based Colorimetric Assay for Measuring Activity of Calpain and Other Proteases *Anal Biochem*, **208**: 387.

123. Barret AJ, Kirschke H (1981) Cathepsin B, cathepsin H, and cathepsin L En: "Methods in Enzymology" (Lorand L , Ed.) Academic Press, New York, vol 80: Pag 535.
124. Murray PF, Silberstein S, Cantore ML and Passeron S (1989) . A radioactive method for the measurement of trypsin and trypsin-like activities *Anal Biochem*, **179**: 56.
125. Waxman L (1981) Calcium-activated proteases in mammalian tissues. En: "Methods in Enzymology" (Lorand L , ed.) Academic Press, New York, vol 80: Pag 664.
126. Dupont D, Lugand D, Rolet-Repecaud O and Degelaen J (2007) ELISA To Detect Proteolysis of Ultrahigh-Temperature Milk upon Storage *J. Agric. Food Chem.*, **55**(17): 6857.
127. Yoshioka H, Oyamada I and Uzuku G (1987) An assay of collagenase activity using enzyme-linked immunosorbent assay for mammalian collagenase *Anal Biochem*, **166**: 172.
128. Koritsas VM and Atkinson HJ (1995) An assay for detecting nanogram levels of proteolytic enzymes. *Anal Biochem*, **227**: 22.
129. Mansfeld HW, Schulz S, Grütz G, von Baehr R, Ansorge S (1993) Detection of inhibition of HIV-1 protease activity by an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *J Immunol Methods*, **161**(2): 151.
130. Fournout S, Roquet F, Salhi SL, Seyer R, Valverde V, Masson JM, Jouin P, Pau B, Nicolas M, Hanin V (1997) Development and standardization of an immuno-quantified solid phase assay for HIV-1 aspartyl protease activity and its application to the evaluation of inhibitors. *Anal Chem*, **69**(9): 1746.
131. Sarubbi E, Nolli L, Andronico, F, Stella S, Saddler G, Selva E, Siccardi A, Denaro A (1991) A high throughput assay for inhibitors of HIV-1 protease. Screening of microbial metabolites, *FEBS. Lett*, **279**: 265.
132. Salas E, Ramirez A, Otero-Bilbao A, Vazquez, R, Reyes O, Mendiola J, Duarte C, Otero AJ, Gutierrez O and Chavez MA (2004) A heterogeneous enzymatic immunoassay for the quantification of Plasmepsin II activity and the evaluation of its inhibitors. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, **34**: 833.

133. Kennett R.H, Bechtold KB and McKearn T.J (1984) Reflections of Nine Years of Monoclonal Antibodies and Hybridomas. En: "Monoclonal Antibodies and Functional Cell Lines. Progress and Applications" (Kennett RH, Bechtol K and McKearn TJ Eds.) Plenum Press New York and London, I: Biotechnology's "Coming Age", Pag 3.
134. Otero AJ (1995) Anticuerpos monoclonales murinos: descripción de protocolos técnicos. *Revista Biomédica, CIR, UADY*, **6**: 157.
135. Asai T, Tena G, Plotnikova J, Willmann MR, Chiu WL, Gomez-Gomez L, Boller T, Ausubel FM, Sheen J (2002) MAP kinase signalling cascade in Arabidopsis innate immunity. *Nature*, **415**(6875): 977.
136. Balint-Kurti PJ and Churchil ACL (2004) Towards a molecular understanding of Mycosphaerella / banana interactions. En: "Banana Improvement: Cellular, Molecular Biology, and Induced Mutations" (Jain SM, Swennen R Eds). Science Publishers, Plymouth, Pag 147.
137. Melby JM, Stave JW. (1995) ELISA evaluation of banana black Sigatoka disease status. *J Clin Ligand Assay*, **18**: 166.
138. Ekins R (1989) A shadow over immunoassay. *Nature* **340**: 256.
139. Gosling JP (1990) A decade of development in immunoassay methodology. *Clin Chem* **36**: 1408.
140. Paing MM, Stutts AB, Kohout TA, Lefkowitz RJ and Trejo J (2002)  $\beta$ -Arrestins regulate protease-activated receptor-1 desensitization but not internalization or down-regulation. *J. Biol. Chem.* **277**: 1292.
141. Somai BM and Keinath AP (2002) Development of PCR-ELISA for Detection and Differentiation of *Didymella bryoniae* from Related *Phoma* species. *Plant Disease*, **86**: 7.
142. Porstmann B, Porstmann T and Nugel E (1981) Comparison of chromogens for the determination of horseradish peroxidase as a marker in enzyme immunoassay. *J. Clin.Chem. Clin. Biochem*, **19**: 435.

143. Hall J, Jilg W, Hottenträger B, Bonnar P, Fang C and Baker L (1998) Performance of a chemiluminescent immunoassay for HBsAg on the new high-throughput and fully automated ACS: Centaur<sup>TM</sup> system. *Clin. Lab*, **44**: 349.
144. Voller A. and Bidwell DE (1976) Enzyme-immunoassays for antibodies in measles, cytomegalovirus infections and after rubella vaccination. *British J. of Exp. Path*, **57**: 243.
145. Filice GA, Yeager AS, Remington JS. (1980) Diagnostic significance of immunoglobulin M antibodies to *Toxoplasma gondii* detected after separation of immunoglobulin M from immunoglobulin G antibodies. *J Clin Microbiol*, **12**(3): 336.
146. Griner PF, Mayewski RJ, Mushlin AI (1981) Selection and interpretation of diagnostic tests and procedures: principles and applications. *Ann Intern Med*, **94**: 557.
147. Van Loon AM, Van der Logt JTM and Van der Venn J (1981) Enzyme Linked Immunosorbent Assay for measurement of antibody against Cytomegalovirus and Rubella virus in a single serum dilution. *J. Clin Pathol*, **34**: 665.
148. Steward MD (1986) Overview: introduction to methods used to study the affinity and kinetics of antibody:antigen reactions. En "Handbook of Experimental Immunology" (Weir MD, Ed.) Blackwell Scientific Publications, Oxford, Pag 25.1.
149. Richmond JFL, Lu S, Santoro JC, Weng J, Shiu-Lok Hu, Montefiori DC, and Robinson HI (1998) Studies of the Neutralizing Activity and Avidity of Anti-Human Immunodeficiency Virus Type 1 Env Antibody Elicited by DNA Priming and Protein Boosting. *Journal of Virology*, **72**: 9092.
150. Griswold WR, Lucas AH, Bastian JF and Garcia G (1989) Functional affinity of antibody to the *Haemophilus influenzae* b polysaccharide. *J. Infect. Dis*, **159**: 1084.
151. William R. Usinger D and Lucas AH (1999) Avidity as a Determinant of the Protective Efficacy of Human Antibodies to Pneumococcal Capsular Polysaccharides. *Infection and Immunity*, **67**(5): 2366.
152. Gray BM and Shaw DR (1993) Artifacts with the thiocyanate elution method for estimating relative antibody avidity. *J. Immunol. Methods* **157**: 269.

153. Rath S, Stanley CM and Steward MW (1988) An inhibition enzyme immunoassay for estimating relative antibody affinity and affinity heterogeneity. *J. Immunol. Methods* **106**: 245.
154. Steward MW, Stanley CM, Dimarchi R, Mulcahy G and Doel TR (1991) High-affinity antibody induced by immunization with a synthetic peptide is associated with protection of cattle against foot-and-mouth disease. *Immunology*, **72**: 99.
155. Binley JM, Arshad H, Fouts TR, Moore JP (1997) An investigation of the high-avidity antibody response to glycoprotein 120 of human immunodeficiency virus type 1. *AIDS Res Hum Retroviruses*, **13**(12): 1007.
156. Cole KS, Rowles JL, Jagerski BA, Murphey-Corb M, Unangst T, Clements JE, Robinson J, Wyand MS, Derosiers RC, Montelaro RC (1997) Evolution of envelope-specific antibody responses in monkeys experimentally infected or immunized with simian immunodeficiency virus and its association with the development of protective immunity. *J. Virol*, **71**: 5069.
157. Clements JE, Montelaro RC, Zink MC, Amedee AM, Miller, Trichel AM, Jagerski B, Hauer D, Martin LN, Bohm RP and Murphey-Corb M (1995) Cross-protective immune responses induced in rhesus macaques by immunization with attenuated macrophage-tropic simian immunodeficiency virus. *J. Viro*, **69**: 2737.
158. Girard M, van der Ryst E, Barré-Sinoussi F, Nara P, Tartaglia J, Paoletti E, Blondeau C, Jennings M, Verrier F, Meignier Band Fultz PN (1997) Challenge of chimpanzees immunized with a recombinant canarypox-HIV-1 virus. *Virology*, **232**: 98.
159. Hammond SA, Cook SJ, Lichtenstein DL, Issel CJ and Montelaro RC (1997) Maturation of the cellular and humoral immune responses to persistent infection in horses by equine infectious anemia virus is a complex and lengthy process. *J. Viro*, **71**: 3840.
160. Moog C, Fleury HJA, Pellegrin I, Kirn A, and Aubertin AM (1997) Autologous and heterologous neutralizing antibody responses following initial seroconversion in human immunodeficiency virus type 1-infected individuals. *J. Virol*, **71**: 3734.

161. Ward KN, Dhaliwal W, Ashworth KL, Clutterbuck EJ and Teo CG (1994) Measurement of antibody avidity for hepatitis C virus distinguishes primary antibody responses from passively acquired antibody. *J. Med. Virol*, **43**: 367.
162. Kangro HO, Manzoor S, and Harper DR (1991) Antibody avidity following varicella-zoster virus infections. *J. Med. Virol*, . **33**: 100.
163. Leinikki PO, Shekarchi I, Dorsett P, and Sever JL (1978) Enzyme-linked immunosorbent assay determination of specific rubella antibody levels in micrograms of immunoglobulin G per milliliter of serum in clinical samples. *J. Clin. Microbiol*, **8**: 419.
164. Broliden PA, Makitalo B, Akkerblom L, Rosen J, Broliden K, Utter G, Jondal M, Norrby E and Wahren B (1991) Identification of aminoacids in the V3 region of gp120 critical for virus neutralization by human HIV-1 specific antibodies. *Immunology*, **73**: 371.
165. Broliden K, Hinkula J, Bratt G, Persson C, Otero AJ, Ekstrom A, Sandstrom E, Broliden PA and Wahren B (1996) Analyses of functional antibody responses in HIV-1 infected individuals after vaccination with r-gp 160. *Clinical and Diagnostic Virology*, **6**: 115.
166. Landsteiner K and van der Scheer J (1928) Serological differentiation of steric isomers. *Journal of Experimental Medicine*, **48** :315.
167. Vaughan TJ, Williams AJ, Pritchard K, Osbourn JK, Pope AR, Earnshaw JC, McCafferty J, Hodits RA, Wilton J, Johnson KS (1996) Human antibodies with sub-nanomolar affinities isolated from a large non-immunized phage display library. *Nature Biotechnol*, **14** :309.
168. Rader C, Barbas CF (1997) Phage Display of Combinatorial Antibody Libraries. *Current Opinion in Biotechnology*, **8** :503.
169. Hanes J, Plückthun A (1997) In vitro selection and evolution of functional proteins by using ribosome display. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **94**: 4937.
170. He M, Taussig MJ (1997) Antibody-ribosome-mRNA (ARM) complexes as efficient selection particles for in vitro display and evolution of antibody combining sites, *Nucleic Acid Res*, **25** :5132.

171. Dooley H, Grant SD, Harris WJ, Porter AJ (1998) Stabilization of antibody fragments in adverse environments, *Biotechnol Appl Biochem*, **28** :77.
172. Harris B (1999) Exploiting antibody-based technologies to manage environmental. Pollution, *Trends Biotechnol*, **17**: 290.
173. Blake Ch, Gould BJ (1984) Use of Enzymes in Immunoassay Techniques: A Review. *Analyst*, **109**: 533.
174. McCormick RM, Nelson RJ, Alonos-Amigo MG, Benvegno DJ, Hooper HH (1997) Microchannel electrophoretic separations of DNA in injection-molded plastic substrates. *Anal Chem.*, **69**: 2626.
175. Shoffner MA, Cheng J, Hvichia GE, Kricka LJ, Wilding P (1996) Chip PCR. I. Surface passivation of microfabricated silicon-glass chips for PCR. *Nucleic Acids Res*, **24**: 375.
176. Kricka LJ (1998) Miniaturization of analytical systems. *Clinical Chemistry* **44**(9): 2008.
177. Bock JL (1999) Cardiac troponin: how specific is specific? *Am J Clin Pathol.*, **112**: 739.
178. Bock JL (2000) The New Era of Automated Immunoassay. *Am J Clin Pathol*, **113**: 628.

## 8. Anexos

### 8.1. Cobertura de la Tesis:

50 artículos científicos (14 principales)

7 conferencias en instituciones científicas

103 resúmenes en eventos científicos

1982-1989: Centro Nacional de Investigaciones Científicas, CNIC.

1990-1998: Instituto de Medicina Tropical “Pedro Kourf”, IPK.

1999-2008: Centro de Estudios de Proteínas, CEP, Facultad de Biología,  
Universidad de La Habana.

### 8.2. Artículos científicos en el tema de inmunodetección e inmunodiagnóstico (14 principales, subrayados):

1. **Otero AJ**, Sarracent J, Fernandez Yero JL, and Rodriguez I (1984) A 10 Microliter Indirect Ultramicro ELISA for Detection of Monoclonal Antibodies Against Human Alphafetoprotein. *Hybridoma*, **3**: 391.
2. **Otero AJ** and Kennett RH (1984) ELISA for immunoglobulin subclass determination. En “Monoclonal Antibodies and Functional cell lines. Progress and Applications”. (Kennett RH, Bechtold KB and McKearn TJ Eds.) Plenum Press, New York, Pag 374.
3. **Otero AJ**, Sarracent J, Rodríguez I, Alfonso JL, Cabrera L, Gavilondo J, Hermida C y Torres K (1986) Medio metabolizado por macrófagos transformados de ratón: un suplemento adecuado para la generación, clonaje y expansión de hibridomas B murinos. *Libro de Memorias II Seminario Cubano sobre Interferón y I Seminario Cubano sobre Biotecnología. II parte*. Instituto de Cooperación Iberoamericana. Madrid, Pag 366 (resumen ampliado).
4. **Otero AJ**, Rodríguez I, Rodríguez BL y Pascual C. (1989) Inmunoensayo potenciométrico de enzima ligada (IPELI) para la detección del subtipo "ad" del antígeno de superficie de la Hepatitis B (HBsAg). *Interferón y Biotecnología*, **6**: 299.

5. Otero AJ, Rodríguez BL, Rodríguez I y Pascual C (1991) Sustrato de peroxidasa para revelado de conjugado de fosfatasa alcalina en ensayo tipo ELISA. *Biotecnología Aplicada*, **8**: 95.
6. Otero A, Rodríguez I and Falero G (1991) 2,3,5-Tryphenyl Tetrazolium Chloride (TTC) reduction as exponential phase marker for mammalian cells in culture and for myeloma hybridization experiments. *Cytotechnology*, **6**: 137.
7. Falero G, Sarracent J, **Otero A**, Rodriguez I and Rodriguez BR (1992) Generation of bispecific triomas which recognized the “ad” subtype of Hepatitis B surface antigen. *Hybridoma*, **11(6)**: 815.
8. Jomarrón L, **Otero AJ**, Alvarez M, Marrero M, Laferté J and Rogés G (1993) Design of a pattern curve for the measurement of IgG antibodies against human Cytomegalovirus in a single serum dilution by ultramicroELISA. *Biotecnología Aplicada*, **10**: 200.
9. Ribas MA, Vázquez S, Agmar F y **Otero A** (1992) Serological diagnosis of HIV. *Revista Cubana de Medicina Tropical*. **44(3)**: 229.
10. Guzmán G, Alberti E, Laferté J, del Rosario D, **Otero A** and Resick S (1993) Standardization and evaluation of an indirect ultramicroELISA for Rubeola serology. *Biotecnología Aplicada*, **10**: 166.
11. Rodríguez BL, Sánchez V, Falero G, Zayaz M, **Otero AJ** e Ilnait J (1993) Inmunoensayo enzimático tipo ELISA para la detección de Anticuerpos monoclonales contra lipoproteínas humanas. *Revista CENIC de Ciencias Biológicas*. **24 (3-1)**: 30.
12. Marrero M, Valdés O, Alvarez M, Peñate G, Morales E, Rogés G, **Otero A** y Cutié E (1994) Detection of Human Papilomavirus by non radioactive hybridization. *Diag Microbio Infect Dis* **18**: 95.
13. Ribas MA, **Otero A**, Alvarez M, Marrero M and Vázquez S (1994) Design of a pattern curve for the measurement of IgG antibodies against human Herpes simplex virus in a single serum dilution by ultramicroELISA. *Revista Cubana de Medicina Tropical*, **44(1)**: 32.

14. Miguez J, Alvarez M, Marrero M, Rivero J, Laferté J, **Otero A**, Duarte, C y Sariol C (1994) Respuesta serológica evolutiva neutralizante del VIH-1 (cepa MN) en pacientes infectados con VIH. *Advances in Modern Biotechnology*, **2**: 27.
15. Obregon AM, **Otero A**, Laferte J, Y Lopez, C (1994) ELISA for the detection of human Leptospirosis. *Mem Instituto Oswaldo Cruz*, **89**(3): 365.
16. Savón C, Laferté J, Goyenechea A, Valdivia A, **Otero A**, Morier L y Sariol C (1994) UltramicroELISA adenovirus. A new tool for sero-epidemiological studies. *Advances in Modern Biotechnology*, **2**: 96.
17. Obregón AM, **Otero A**, Laferté J, Toledo, I, Arzola, A (1994) Cuantificación de anticuerpos totales a leptospiras por la técnica de ELISA y un método inmunturbidimétrico acoplado al SUMA. *Advances in Modern Biotechnology*, **2**: 99.
18. M Pupo, H Rodríguez, M Soler, Y Caballero, JC Vilaseca y **A Otero** (1994) Caracterización parcial de tres Anticuerpos Monoclonales contra el virus Dengue 2, cepa cubana A15. *Advances in Modern Biotechnology*, **2**: 97.
19. Vilaseca JC, H Rodríguez, M Pupo, M Bernal y **A Otero** (1994) ELISA para la cuantificación de IgG total y las subclases IgG1, IgG2a e IgG2b de ratón. *Advances in Modern Biotechnology*, **2**: 97.
20. Rodríguez H, J Laferté M Pupo, JC Vilaseca, Y Caballero, **A Otero** y P Más (1994) ELISA sandwich indirecto para detectar anticuerpos de ratón contra aislamiento viral de pacientes con neuropatía epidémica. *Advances in Modern Biotechnology*, **2**: 98.
21. Vázquez S, Pupo M, Pelegrino JL, Morier L, Castillo, A, **Otero A** and Guzmán MG (1994) ELISA for the detection of Monoclonal antibodies against Dengue virus E and NS-1 proteins. *Advances in Modern Biotechnology*, **2**: 99.
22. Balmaseda A, Laferté J, Vázquez S, Rodríguez L, **Otero A**, Vázquez V, Falcón R, Hidalgo JL, Pelegrino JL, Palomero R, Guzmán MG, Resik S, and Más P (1994) ELISA and Ultramicro ELISA for Coxsackie virus A9 and viral antibodies in relation of an outbreak of epidemic neuropathy in Cuba. *Advances in Modern Biotechnology*, **2**: 95.
23. **Otero AJ** (1995) Anticuerpos monoclonales murinos: descripción de protocolos técnicos. *Revista Biomédica, CIR, UADY* **6**: 157.

24. Balmaseda A, Laferté J, Soler M, Vázquez S, Rodríguez L, **Otero A** y Vázquez V (1995) Utilización del ELISA y el ultramicroELISA en la identificación de una cepa de Coxsackie A9 aislada durante la epidemia de neuropatía en Cuba. *Rev Cubana Med Trop*, **47**(1): 44.
25. Vázquez S, Pupo M, Pelegrino JL, Morier L, Castillo A, **Otero A** y Guzmán MG (1995) Ensayo inmunoenzimático para la detección de anticuerpos monoclonales contra las proteínas E y NS1 del virus dengue. *Rev Cubana Med Trop*, **47**(2): 122.
26. Broliden K, Hinkula J, Bratt G, Persson C, **Otero AJ**, Ekstrom A, Sandstrom E, Broliden PA and Wahren B (1996) Analyses of functional antibody responses in HIV-1 infected individuals after vaccination with r-gp 160. *Clinical and Diagnostic Virology*, **6**: 115.
27. Laferté J, Savón C, Goyenechea A, Vázquez V, **Otero A**, Tejero Y y Hernández B (1996) Estimación del título de anticuerpos IgG a Adenovirus utilizando una curva patrón y un ensayo de ultramicroELISA indirecto. *Rev Cubana Med Trop*, **48**(2): 102.
28. Valdivia A, Savón C, Chacón D, Sarmiento L, Morier L, Otero A, Soto Y, Oropesa S and Goyenechea A (1997) Analysis of respiratory syncytial virus in clinical samples by reverse transcriptase – polymerase chain reaction mapping. *Mem Inst Oswaldo Cruz* **92** (3): 389.
29. Vilaseca JC, Pérez L, Savón C, Chacón D, Oropesa S, Rodríguez H, Goyenechea A y **Otero A** (1997) Evaluación de un conjugado anti-IgG de ratón-fluoresceína mediante técnicas de inmunofluorescencia indirecta y citometría de flujo. *Rev Cubana Med Trop*, **49**(2): 120.
30. Vilaseca JC, Pupo M, Bernal M, Matamoros L, Gordillo S, Rodriguez H, Caballero Y and **Otero A**. (1997) Quantitative ELISA for mouse monoclonal antibody determination in culture supernatants and in human serum. *Hybridoma*, **16**(6): 557.
31. Pupo-Antúnez M, Rodriguez H, Vázquez S, Vilaseca JC, Alvarez M, **Otero A**, and Guzmán G (1997) Monoclonal antibodies raised to the dengue 2 virus (Cuban: A 15 strain) which recognize viral structural proteins. *Hybridoma*, **16**(4): 347.
32. Valdivia A, Chacon D, Savon C, Sarmientos L, Valdes O, **Otero A**, D. Rosario, Goyenechea A. (1997) Molecular Characterization of an Outbreak of Respiratory

- Syncytial Virus (subgroup A) in Havana Cuba by Monoclonal Antibodies and Restriction Mapping gene (N). *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, **4**(5): 663.
33. Rodríguez H, Pupo M, Vilaseca JC, Caballero Y, Palomero R, Más P y **Otero A** (1997) Anticuerpos Monoclonales contra el virus Coxsackie A-9 aislado de un paciente con neuropatía epidémica. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología*, **17**(1): 20.
34. Miguez J, Laferte J, Tejero Y, Gonzalez G, **Otero AJ**, Rivero J, Duarte C (1998) Evaluation of the serologic response against two consensus V3 loop peptides from human immunodeficiency virus-1 in Cuban patients. *International Journal of Infectious Diseases*, **2**(4): 221.
35. **Otero AJ** y Linares M (1998) Los anticuerpos monoclonales en el tratamiento de la sepsis provocada por microorganismos gramnegativos. *Rev Cubana Med Trop*, **50**(1): 31.
36. Valdivia A, González G, Cachón D, Savon C, **Otero A.J**, Valdés O, Cancio R, Oropesa S, Melero J.A, Garcia-Barreno A, Goyenechea A. (1999) Antigenic and Genetic Characterization of Twenty-six Strains of Human Respiratory Syncytial Virus (Subgroup A) Isolated During Three Consecutive Outbreaks in Havana City, Cuba. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, **94**(4): 469.
37. Fraga J, Vilaseca JC, Pupo M and **Otero AJ** (2000) A microELISA for the quantitation of mouse monoclonal IgM in hybridoma culture supernatants. *Biotecnología Aplicada*, **17**: 105.
38. Pico MC, del Monte A, Calvo L, Torres Y, Felicó E Y **Otero AJ** (2000) Inmunidad y especificidad antigénica de las St I y II de la anémona de mar *Stichodactyla heliantus*. *Revista Biología*, **14**(2): 156.
39. Pupo-Antunez M, Rodriguez R, Alvarez M, Amin N, Rodriguez H, **Otero A**, Guzman G. (2001) Development of a monoclonal antibody specific to a recombinant envelope protein from dengue virus type 4 expressed in *Pichia pastoris*. *Hybridoma*, **20**(1): 35.
40. Gutierrez OA, Salas E, Hernandez Y, Lissi EA, Castrillo G, Reyes O, Garay H, Aguilar A, Garcia B, **Otero A**, Chavez MA and Duarte CA (2002) An

Immunoenzymatic Solid-Phase Assay for Quantitative Determination of HIV-1 Protease Activity. *Analytical Biochemistry*, **307**(1): 18.

41. Pico MC, Basulto A, Del Monte A, Hidalgo A, Lanio ME, Alvarez CM, Felicó E, and Otero AJ (2004) Cross-Reactivity And Inhibition Of Haemolysis By Polyclonal Antibodies Raised Against St II, A Cytolysin From The Sea Anemone *Stichodactyla helianthus*. *Toxicon*, **43**: 167.
42. Salas E, Ramirez A, Otero-Bilbao A, Vazquez, R, Reyes O, Mendiola J, Duarte C, **Otero AJ**, Gutierrez O and Chavez MA (2004) A heterogeneous enzymatic immunoassay for the quantification of Plasmepsin II activity and the evaluation of its inhibitors. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, **34**: 833.
43. Rodríguez H, Pupo M, Ilnait MT, **Otero AJ** y Martínez G (2005) Anticuerpos monoclonales que reconocen al polisacárido capsular de *Cryptococcus neoformans*. *Revista Cubana de Medicina Tropical*, **57**(2): 162.
44. Basulto A, Perez VM, Noa Y, Varela C, **Otero AJ** and Pico MC (2006) Immunohistochemical targeting of sea anemone cytolysins on tentacles, mesenteric filaments, and isolated nematocysts of *Stichodactyla helianthus*. *Journal of Experimental Zoology*, **305A**(3): 253.
45. L Calderón, E Facenda, L Machado, K Uyema, D Rodríguez, E Gomez, Y Martínez, B González, V Bourg, C Alvarez, **A Otero**, M Russo, A Labrada, ME Lanio (2006) Modulation of the Specific Allergic Response by Mite Allergens Encapsulated into Liposomes. *Vaccine*, **24**(Suppl 2): S38.
46. Gato R, Martínez G, Rodríguez H, **Otero A**, Sarracent J e Ilnait MT (2006) Reconocimiento de células intactas de *Cryptococcus neoformans* por el AcM 4B3 antiglucuronoxilomanano. *Rev Cubana Med Trop*, **58**(2): p.0-0. ISSN 0375-0760.
47. Basulto A, Casadelvalle I, **Otero A**, and Pico MC (2006) Sticholysin II, a cytolysin isolated from the Caribbean Sea anemone *Stichodactyla helianthus*, interacts with serum lipoproteins, Freund adjuvant and specific antibodies to this protein. *Rev. Invest. Mar*, **27**(1): 41.
48. **Otero A** (2006) El valor de corte en ELISA indirecto para la titulación de anticuerpos contra agentes infecciosos. Utilización de una curva estándar con una sola dilución

del suero”. *Publi Lab. Revista de los Profesionales de Laboratorio*. Guayaquil, Ecuador, **2**: 38.

49. **Otero AJ**, Sarracent J, Hernández H, Sánchez M, Muirragui D, Villamar M, Moreta D, Jiménez, MI, Pérez L and Maribona RH (2007) Monoclonal Antibody-based TAS-ELISA for Quantitative Detection of *Mycosphaerella fijiensis* Antigens. *Journal of Phytopathology*, **155** (11-12), 713.
50. Gutiérrez G, Ross U y **Otero AJ**. Estudio de la interacción del Anticuerpo monoclonal 10 anti StII con las sticholysinas, citolisinas de la anémona *Stichodactyla helianthus*. Artículo en preparación. Tesis de diploma de Gladis Gutiérrez. Facultad de Biología UH. Julio 2008.

### **8.3. Tesis presentada y libro publicado en el tema de la tesis**

Tesis de doctorado en Ciencias Biológicas:

“Contribución a la Tecnología de Hibridomas B murinos y producción de anticuerpos monoclonales”.

Centro Nacional de Investigaciones Científicas (CNIC),

La Habana, Cuba. 1987

Tutor: Jorge Sarracent Pérez, Dr. C. Biológicas.

Libro:

María Cristina Pico, Isabel Giraldino y **Anselmo Otero** (1997) “Inmunología Experimental”. Editorial Félix Varela. Ciudad de La Habana. Cuba: Texto de pre-grado en las tres carreras de Facultad de Biología, UH.

#### 8.4. Presentaciones en eventos relacionados al tema de la tesis

1. **Otero, A.J.** (1982) Anticuerpos monoclonales. Mesa Redonda: Inmunoensayo. VIII Seminario Científico CENIC. La Habana, Cuba. p. 255.
2. **Otero, A.** Sarracent, J. y Fernández Yero, J.L. (1982) Detección de anticuerpos monoclonales mediante ultramicroELISA indirecto. Libro de resúmenes. VIII Seminario Científico CENIC. La Habana, Cuba, Pág. 253.
3. **Otero, A.** Sarracent, J. y Rodríguez, I. (1982) Producción de anticuerpos monoclonales contra alfafetoproteína. Resultados preliminares. Libro de resúmenes. VIII Seminario Científico CENIC. La Habana, Cuba, Pág. 255.
4. **Otero, A.J.** (1982) Anticuerpos monoclonales: una nueva dimensión en la perspectiva del análisis biológico. Mesa Redonda: Avances en Inmunoquímica. Reunión Anual de la Sociedad Cubana de Ciencias Biológicas. La Habana, Cuba.
5. **Otero, A.J.** (1984) Anticuerpos monoclonales y su aplicación a la serología. Mesa Redonda. II Congreso de Ciencias Biológicas. La Habana, Cuba.
6. **Otero, A.J.** (1985) Anticuerpos monoclonales. Experiencia cubana. Mesa Redonda: III Jornada Nacional, II Jornada Latinoamericana de Trabajos Cooperativos en Hematología, Inmunología y Hemoterapia. La Habana, Cuba.
7. **Otero, A.J.** Kennett, R.H. (1985) ELISA para la detección de clases y subclases de anticuerpos. Ensayo de anticuerpos monoclonales obtenidos por transfección de DNA. Libro de Resúmenes IX Seminario Científico CENIC. Habana, Cuba p. 336.
8. Rodríguez, I. y **Otero, A.J.** (1985) Método para determinar el tiempo óptimo de hibridización celular en la fase exponencial de crecimiento. Libro de resúmenes. II Forum Científico de Técnicos Medios. CENIC, La Habana, p. 60.
9. Alfonso, J.L. y **Otero, A.J.** (1985) Introducción del cloruro de trifenil tetrazolium (TTC) en el estudio del crecimiento de la línea celular BHK-21-S13. Libro de resúmenes. II Forum Científico de Técnicos Medios. CENIC, La Habana, p. 62.
10. **Otero, A.J.** Sarracent, J. Rodríguez, I. Alfonso, J.L. Cabrera, L. Gavilondo, J. Hermida, C. y Torres, K. (1986) Medio metabolizado por macrófagos transformados de ratón: un suplemento adecuado para la generación, clonaje y expansión de

- hibridomas B murinos. Libro de Resúmenes II Seminario Cubano sobre Interferón y I Seminario Cubano sobre Biotecnología. La Habana, Cuba p. 209.
11. **Otero, A.J.** (1986) Anticuerpos monoclonales. Mesa Redonda. Nuevas Formas Farmacéuticas. V Conferencia Científica de Ciencias Farmacéuticas. Universidad de La Habana. La Habana, Cuba.
  12. **Otero, A.J.** (1987). Aplicaciones analíticas de los anticuerpos monoclonales. Mesa redonda: Uso de los anticuerpos monoclonales en el diagnóstico y tratamiento de diversas enfermedades. Primer Simposium Internacional de Trasplantes y Avances Tecnológicos. Hospital Clínico Quirúrgico Hermanos Ameijeiras y Centro de Investigaciones Médico Quirúrgicas. La Habana, Cuba.
  13. **Otero, A.J.** Rodríguez, I. y Rodríguez, B.L. (1987) Anticuerpos Monoclonales contra el antígeno de superficie de la Hepatitis B. Juego diagnóstico HBsAg Monoclas. III Exposición Internacional "Salud para Todos en el 2000". PABEXPO. Palacio de las Convenciones. La Habana, Cuba.
  14. **Otero, A.J.** Rodríguez, I. and Rodríguez, B.L. (1987) Mouse monoclonal antibodies against Hepatitis B surface antigen (HBsAg). A microELISA for ad-ay classification of HBsAg in serum. Libro de resúmenes. I Taller y Curso Internacional sobre la Tecnología de Anticuerpos Monoclonales. Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología. La Habana, Cuba.
  15. **Otero, A.J.** (1987) Anticuerpos Monoclonales. Mesa redonda: Sistemas Avanzados de Administración de Medicamentos (SAAM). IV Congreso de la Sociedad Cubana de Ciencias Farmacéuticas yII Jornada Científica de la Industria Farmacéutica. La Habana, Cuba.
  16. Alfonso, J.L. y **Otero, A.J.** (1987) Análisis de tres curvas de crecimiento de mielomas de ratón mediante el ploteo de Smith y su relación a la reducción metabólica de una sal de tetrazolium. III Forum de Técnicos Medios y Obreros de las BTJ. CENIC, La Habana, Cuba.
  17. Rodríguez, B.L. y **Otero, A.J.** (1987) Comparación de tres métodos cromatográficos para la purificación de anticuerpos monoclonales de ratón. III Fórum de Técnicos Medios y Obreros de las BTJ. CENIC, La Habana, Cuba.

18. Rodríguez, I y **Otero, A.J.** (1987) Detección y clasificación del antígeno de superficie de la Hepatitis B por ELISA empleando anticuerpos monoclonales. III Fórum de Técnicos Medios y Obreros de las BTJ. CENIC, La Habana, Cuba.
19. Piedra, J. Rodríguez, I y **Otero, A.J.** (1987) Formación y evolución de una colonia de hibridoma. Análisis mediante cinematografía microscópica. III Fórum de Técnicos Medios y Obreros de las BTJ. CENIC, La Habana, Cuba.
20. Rodríguez, B.L. Rodríguez, I. y **Otero, A.J.** (1988) Diagnostic Kit (HBsAg Monoclas) for "ad-ay" clasificación Hepatitis B surface antigen with monoclonal antibodies. Exposición Internacional Juvenil "Zenit". Praga, Checoslavaquia.
21. **Otero, A.J.** Rodríguez, B.L. Rodríguez, I. Falero, G. y Sarracent, J. (1988) Juego diagnóstico (HBsAg Monoclas) para la clasificación "ad-ay" del antígeno de superficie de la Hepatitis B. I Feria y Congreso de Biotecnología, "FENABIO/88". Rio de Janeiro, Brasil.
22. Rodríguez, B.L. Rodríguez, I. y **Otero A.** (1988) Comparación de cuatro métodos para la purificación de un anticuerpo monoclonal de ratón a partir de líquido ascítico: adsorción, intercambio iónico, afinidad e inmunoafinidad. Revista CENIC vol. 19, número Especial: Resúmenes X Seminario Científico CENIC. La Habana, Cuba, pag. 73.
23. **Otero, A.J.** Rodríguez, B.L. Rodríguez, I. y Pascual, C. (1988) Sustrato de peroxidasa para detectar anticuerpos monoclonales mediante ELISA con un conjugado anti-ratón fosfatasa alcalina. Revista CENIC vol. 19, número Especial: Resúmenes X Seminario Científico CENIC. La Habana, Cuba, pag. 73.
24. **Otero, A.J.** Rodríguez, B.L. Rodríguez, I. y Pascual, C. (1988) Inmunoensayo potenciométrico de enzima ligada (PELIA) para la detección de antígeno de superficie de la Hepatitis B con anticuerpos monoclonales. Revista CENIC vol. 19, número Especial: Resúmenes X Seminario Científico CENIC. La Habana, Cuba, pag. 74.
25. Falero, G. Rodríguez, I. Rodríguez, B.L. y **Otero, A.J.** (1988) Generación de triomas productores de anticuerpos monoclonales biespecíficos. Revista CENIC vol. 19, número Especial: Resúmenes X Seminario Científico CENIC. La Habana, Cuba, pag. 73.

26. **Otero, A.J.** (1988) Inmunoensayo enzimático para receptores LDL específicos. Mesa Redonda: Tendencias actuales en el diagnóstico de la Arteriosclerosis. X Seminario Científico CENIC. La Habana, Cuba.
27. **Otero, A.J.** (1988) 13 años de Tecnología de Híbridomas. Mesa Redonda: Anticuerpos Monoclonales y su aplicación en Biomedicina. X Seminario Científico CENIC. La Habana, Cuba.
28. **Otero, A.J.** (1988) Utilización de los anticuerpos monoclonales en el diagnóstico vegetal. III Taller Nacional de Biotecnología Vegetal. Instituto "Jorge Dimitrov". Bayamo, Cuba.
29. **Otero, A.J.** (1988) Anticuerpos monoclonales contra el antígeno de superficie de la Hepatitis B y su aplicación a la epidemiología mediante inmunoensayo enzimático. Mesa Redonda: Anticuerpos monoclonales en enfermedades infecciosas. Resultados y Perspectivas. Congreso 50 Aniversario del Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kourí". La Habana, Cuba.
30. Rodríguez, B.L. Rodríguez, I. y **Otero, A.J.** (1989) Juego diagnóstico (HBsAg Monoclas) para la clasificación "ad-ay" del antígeno de superficie de la Hepatitis B con anticuerpos monoclonales. Libro de resúmenes. V Exposición Nacional Forjadores del Futuro de las Brigadas Técnicas Juveniles. Pabellón Cuba. La Habana, Cuba. p. 129.
31. **Otero, A.J.** González, R. Rodríguez, I. y Rodríguez, B.L. (1989) Purificación de un anticuerpo monoclonal de ratón mediante cromatografía de adsorción en una matriz de hidroxilapatita obtenida a partir de un producto marino. Programa en SC4 para procesamiento de datos de experimento tipo ELISA. Libro de Resúmenes III Seminario Cubano sobre Interferón y II Seminario Cubano sobre Biotecnología. La Habana, Cuba No. SO241-2081.
32. **Otero, A.J.** Rodríguez, I. y Rodríguez, B.L. (1989) Juego diagnóstico HBsAg Monoclas. IV Exposición Internacional "Salud para Todos en el 2000". PABEXPO. Palacio de las Convenciones. La Habana, Cuba.
33. Rodríguez, B.L. y **Otero, A.** (1989) Montaje de un inmunoensayo enzimático tipo ELISA para la detección de anticuerpos monoclonales contra lipoproteínas. II Fórum de Técnicos Medios y Obreros. CNIC, La Habana, Cuba.

34. **Otero, A.**, Falero, G. Rodríguez, I. y Alfonso, J.L. (1989) Reducción del cloruro de 2,3,5 trifenil tetrazolium como marcador fisiológico para células animales en cultivo. Libro de resúmenes.III Conferencia Nacional de Ciencias Fisiológicas. Instituto Superior de Ciencias Médicas de Santiago de Cuba. p.108.
35. **Otero, A.**, Rodríguez, I, and Rodríguez, B.L. (1989) "ad-ay" subtyping of Hepatitis B surface antigen by microELISA using monoclonal antibodies. V Scientific Symposium of Socialist Countries on Biotechnology. Balantonszéplak, Hungría.
36. Rodríguez, B.L. Rodríguez, I. and **Otero, A.** (1989) A microELISA for "ad-ay" subtyping of HBsAg using a monoclonal antibody. Evento de jóvenes científicos Plovdiv, Bulgaria.
37. Rodríguez, B.L. Sánchez, V. Zayas, M. Falero, G. **Otero, A.J.** e Illnait, J. (1989) Inmunoensayo enzimático tipo ELISA para la detección de anticuerpos monoclonales contra lipoproteínas humanas. Libro de resúmenes. Conferencia Nacional sobre Aterosclerosis, CNIC, La Habana, Cuba.
38. **Otero, A.** Más Lago, P. Rivas, M. y Laferté, J. (1990) UMELISA para la detección de anticuerpos monoclonales contra virus Polio tipo 2. Libro de resúmenes, II Jornada Nacional de Laboratorios de diagnóstico SUMA, Las Tunas, Cuba, pag. 62.
39. Hermida, C. Fernández, M. Marrero, M. Alvarez, Rivas, M. Caballeros, Y. **Otero, A.** Muné y M. Marcet, R. (1990) Obtención y caracterización de anticuerpos monoclonales contra Citomegalovirus humano. Libro de resúmenes II Congreso Latinoamericano de Biotecnología, La Habana, Cuba, pag. 3.
40. **Otero, A.**, Rodríguez, I. Rodríguez, B.L. (1990) A Mouse Monoclonal Antibody Which Recognizes "ad" Subtype of Hepatitis B Surface Antigen. Libro de resúmenes VIII Congreso Internacional de Virología, Berlín Oeste, 1990, Pag.. P10-013.
41. Rodríguez, L. Más Lago, P. Balmaseda, **A. Otero, A.** Comellas, M.M. Palomera, R. Delgado, G. y Rodríguez, A. (1990) Desarrollo del diagnóstico virológico de la Hepatitis A. Libro de resúmenes III Congreso Nacional de Higiene y Epidemiología. La Habana, Cuba, pag. 8.
42. **Otero, A.** Tamargo, I. González, M. Pérez, M.Rodríguez, B.L. y Valdivia, J.A. (1990) Purificación de IgG de conejo antineumococo (serotipos) por intercambio

- iónico en una columna Mono Q HR 5/5 (FPLC). Revista CNIC, vol 21 (Resúmenes, XI Seminario Científico CNIC, La Habana, Cuba), No. 1, pag. 53.
43. Ribas, M. A. Vázquez, S. Aguiar, F. **Otero, A.** y Toraño I. (1990) Diagnóstico serológico del VIH en un período de dos años en el Laboratorio de ELISA del IPK. III Jornada Científica Interna, Sanatorio Santiago de Las Vegas, La Habana, Cuba.
  44. Ribas, M.A. Jomarrón, L. **Otero, A.** Vázquez, S. Alvarez, M. Marrero, M. Laferté, J. Rogés, G. and Morier, L. (1991). Estimation of Cytomegalovirus and Herpes simplex virus antibodies in human serum by a 10<sup>7</sup> m1L ultramicroELISA using an standard curve. Proceedings European Group for rapid Viral Diagnosis Society against Virus diseases. Third Joint Meeting. Strasbourg, France. Pag. PS1-86.
  45. **Otero, A.** (1991) Anticuerpos monoclonales en el diagnóstico microbiológico. Conferencia. Reunión Nacional de Anticuerpos Monoclonales. Instituto Superior de Ciencias Médicas de la Habana-Centro de Inmunología Molecular. Facultad de Ciencias Básicas "Victoria de Girón", La Habana, Cuba (Noviembre 5-6).
  46. Wahren, B., **Otero, A.J.**, Ekström, J. Hincula, G. Gilljam, L. Eriksson, G. Bratt and E. Sandström (1992) High affinity antibody and cellular immunity by post exposure HIV vaccination. Robert Gallo meeting on AIDS, NIH, Maryland, USA, August.
  47. **Otero, A.** (1992) Anticuerpos monoclonales en el diagnóstico microbiológico. Conferencia. Reunión Nacional de Anticuerpos Monoclonales. Facultad de Ciencias Médicas de Villa Clara-Centro de Inmunología Molecular Santa Clara, Dic 17-19.
  48. **Otero, A.** (1993) Los anticuerpos Monoclonales y las infecciones sanguíneas generalizadas. Mesa redonda. Anticuerpos Monoclonales. Congreso Latinoamericano de Hematología y Hemoterapia. La Habana. Cuba.
  49. Soler, M. Laferté, J. **Otero, A.** Vázquez, S. y Alonso, A. (1993) Normalización de un UltramicroELISA para la titulación de anticuerpos IgG contra Sarampión por medio de una dilución única del suero y una curva patrón. Libro de resúmenes. IV Congreso Latinoamericano de Medicina Tropical y IV Congreso Ecuatoriano de Medicina Tropical y Parasitología. "Dr. Julio Alvarez Prieto". Guayaquil, Ecuador. pag. 112.
  50. **Otero, A.** Hinkula, J. Wahren, B. (1993) Ajuste de curva para ELISA de competencia en la evaluación de la maduración de la respuesta serológica de individuos HIV

- positivos inmunizados con gp 160 recombinante. Libro de resúmenes. IV Congreso Cubano de Microbiología y Parasitología. I Congreso de Medicina Tropical. pag. 151.
51. **Otero, A.** Nublond, S. y Gilljam, G. (1993) Optimización de un ensayo de neutralización in vitro para el estudio de la cooperatividad de dos Anticuerpos monoclonales contra HIV-1. Libro de resúmenes. IV Congreso Cubano de Microbiología y Parasitología. I Congreso de Medicina Tropical. pag. 146.
52. **Otero, A.** Balmaseda, A. Rodríguez L. y Más P. (1993) Purificación de conjugado anti Hepatitis A- Peroxidasa mediante Superose-12 aumentó 15 veces la dilución de trabajo. Libro de resúmenes. IV Congreso Cubano de Microbiología y Parasitología. I Congreso de Medicina Tropical. pag. 164.
53. Vilaseca, J.C. Rodríguez, H. Caballero, Y. Pupo M. y **Otero A.** (1993) Purificación cromatográfica de IgG de ratón. Libro de resúmenes. IV Congreso Cubano de Microbiología y Parasitología. I Congreso de Medicina Tropical. pag. 226.
54. Pupo, M. Rodríguez, H. Vázquez, S. Marcet, R. Caballero, Y. y **Otero, A.** (1993) Obtención y caracterización primaria de 3 anticuerpos monoclonales para una cepa viral cubana de Dengue 2. Libro de resúmenes. IV Congreso Cubano de Microbiología y Parasitología. I Congreso de Medicina Tropical. pag. 111.
55. Rodríguez, H. Pupo, M. Caballero, Y. Vilaseca, J.C. y **Otero, A.** (1993) Comparación de IgG de ratón policlonal y monoclonal como patrón en ELISA de cuantificación. Libro de resúmenes. IV Congreso Cubano de Microbiología y Parasitología. I Congreso de Medicina Tropical. pag. 226.
56. Pérez, H. Obregón, A.M. López, C. y **Otero, A.** (1993) Estudio de los parámetros de calidad de un sistema ELISA indirecto. Libro de resúmenes. IV Congreso Cubano de Microbiología y Parasitología. I Congreso de Medicina Tropical. pag. 133.
57. Balmaseda, A. Vázquez, S. Laferté, J. Vázquez, V. **Otero, A.** Falcón, R. Hidalgo, R. Rodríguez, L. Palomera, R. Guzmán, G. y Más, P. (1993) Normalización de 2 sistemas ELISA útiles para la detección de antígeno y anticuerpos a Coxsackie A9. Libro de resúmenes. IV Congreso Cubano de Microbiología y Parasitología. I Congreso de Medicina Tropical. pag. 172.
58. Laferté, J. Soler, M. Resik, S. Guzmán, G. Alvarez, M. Balmaseda, A. Vázquez, V. y **Otero, A.** (1993) Demostración de la relación antigénica entre diferentes cepas de

- Coxsackie A9 mediante las técnicas de UMELISA y Western Blot. Libro de resúmenes. IV Congreso Cubano de Microbiología y Parasitología. I Congreso de Medicina Tropical. pag. 173.
59. Laferté, J. Soler, M. Balmaseda, A. Vázquez, V. **Otero, A.** y Falcón, R. (1993) Detección de anticuerpos mediante UMELISA a una cepa de virus Coxsackie A9 aislada durante el brote de Neuritis epidémica. Libro de resúmenes. IV Congreso Cubano de Microbiología y Parasitología. I Congreso de Medicina Tropical. pag. 173.
60. Soler, M. Laferté, J. **Otero, A.** Vázquez, V. y Alonso, A. (1993) Normalización de un UMELISA para la titulación de anticuerpos IgG contra Sarampión por medio de una dilución del suero y una curva patrón. Libro de resúmenes. IV Congreso Cubano de Microbiología y Parasitología. I Congreso de Medicina Tropical. pag. 194.
61. Obregón, A.M. López, C. Pérez, H. **Otero, A.** y Laferté, J. (1993) Diseño de una curva patrón para la detección de inmunoglobulinas totales contra *Leptospira* en un microELISA a partir de una dilución única de trabajo. Libro de resúmenes. IV Congreso Cubano de Microbiología y Parasitología. I Congreso de Medicina Tropical. pag. 133.
62. Vázquez, S. Pupo, M. Pelegrino, J.L. Morier, L. Castillo, A. **Otero, A.** y Guzmán, G. (1993) Ensayo inmunoenzimático para la detección de anticuerpos monoclonales contra las proteínas E y NS1 del virus Dengue. Libro de resúmenes. IV Congreso Cubano de Microbiología y Parasitología. I Congreso de Medicina Tropical. pag. 110.
63. Vázquez, V. Laferté, J. Balmaseda, A. Vázquez, S. Falcón, R. **Otero, A.** e Hidalgo, R. (1993) Purificación de conjugados IgG-peroxidasa por cromatografía de exclusión molecular utilizando Superdex 200 y tecnología FPLC. Libro de resúmenes. IV Congreso Cubano de Microbiología y Parasitología. I Congreso de Medicina Tropical. pag. 226.
64. Ribas, M.A. Jomarrón, L. **Otero, A.** Vázquez, S. Alvarez, M. Marrero, M. Laferté, J. Rogés, G. Morier, L. and Guzmán, M.G. (1993) Estimation of Cytomegalovirus and Herpes simplex virus antibodies in human serum by 10  $\mu$ L ultramicroELISA using an standard curve. Libro de resúmenes. IV Congreso Latinoamericano de Medicina Tropical y IV Congreso Ecuatoriano de Medicina Tropical y Parasitología. "Dr. Julio Alvarez Prieto". Guayaquil, Ecuador. pag. 114.

65. **Otero, A.** (1994) Anticuerpos monoclonales en el diagnóstico microbiológico. Mesa Redonda: Avances en el diagnóstico Microbiológico. II Seminario Latinoamericano de infectología y I Encuentro de Enfermería en Infectología. Hospital "William Soler", La Habana, Cuba.
66. M. Pupo, H. Rodríguez, M. Soler, Y. Caballero, J.C. Vilaseca y **A. Otero.** (1994) Caracterización parcial de tres anticuerpos monoclonales contra el virus Dengue 2 cepa cubana A15. Avances en Biotecnología Moderna 2:97.
67. H. Rodríguez, J. Laferté, M. Pupo, J.C. Vilaseca, Y. Caballero, **A. Otero,** P. Más (1994) ELISA sandwich indirecto para detectar anticuerpos monoclonales de ratón contra aislamiento viral de pacientes con neuropatía epidémica. Avances en Biotecnología Moderna 2:98.
68. J.C. Vilaseca, H. Rodríguez, M. Pupo, M. Bernal y **A. Otero** (1994) ELISA para la cuantificación de IgG total y monoclonal de ratón. Avances en Biotecnología Moderna 2:99.
69. Laferté, J. Savón, C. Goyenechea, A. Vázquez, V. **Otero, A.,** Tejero, Y. Hernández, B. (1995) Utilización de una curva patrón y un inmunoensayo de UMELISA indirecto para la estimación del título de anticuerpos al adenovirus. XII Conferencia Científica del Centro de Investigaciones Médico-Quirúrgicas, La Habana, Cuba.
70. Vilaseca, J.C. Savón, C. Perdomo, Y. Chacón, D. Oropesa, S. Rodríguez, H. Goyenechea, **A. Otero,** A. (1996) Preparación de un conjugado anti IgG-fluoresceína para el diagnóstico virológico. IV Congreso Nacional de Epidemiología. La Habana, Cuba.
71. Miguez, J. Tejero, Y. Savón, C. Laferté, J. Goyenechea, A. González, G. **Otero, A.** Gavilondo, J. (1996) Serodiagnóstico de la infección por el VSR mediante ultramicroELISA. IV Congreso Nacional de Epidemiología. La Habana, Cuba.
72. Miguez, J. Laferté, J. Rivero, J. Duarte, C. **Otero, A.** Gonzalez, G. Tejero, Y. (1996) Caracterización de la respuesta serológica de pacientes cubanos infectados con el VIH1. IV Congreso Nacional de Epidemiología. La Habana, Cuba.
73. Laferté, J. Más, P. Palomera, R. Bello, M. Tejero, J. Miguez, J. González, G. **Otero, A.** (1996) Método rápido para la serología de los poliovirus e identificación de los enterovirus. IV Congreso Nacional de Epidemiología. La Habana, Cuba.

74. Tejero, Y. Laferté, J. Savón, C. Goyenechea, A. Vázquez, V. **Otero, A.** Hernández, B. (1996) Estimación del título de anticuerpos IgG al Adenovirus utilizando una curva patrón y un ensayo ultramicroELISA. *TECNICA MEDICA* 96, Junio 5-6, Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología, La Habana, Cuba.
75. Miguez, J. Laferté, J. Y. Tejero, González, G. Rivero, J. **Otero, A.** (1996) Evaluación de la respuesta inmune serológica a dos péptidos V3 del VIH-1. Estudio Retrospectivo. I Jornada Nacional de Inmunología, C. Habana, Cuba.
76. **Otero, A.** (1996) Los Anticuerpos Monoclonales en Micología Médica. II Congreso Latinoamericano de Micología. La Habana, Cuba.
77. Pupo, M. Rodríguez, H. Vázquez, S. Vilaseca, J.C. Alvarez, M. **Otero, A.** y Guzmán, M.G. (1997) Anticuerpos monoclonales que reconocen proteínas estructurales del virus Dengue 2 cepa cubana A 15. Libro de Resúmenes V Congreso Latinoamericano de Medicina Tropical, V Congreso Cubano de Microbiología y Parasitología, II Congreso Cubano de Medicina Tropical, Congreso 60 Aniversario del Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kourí", pag. 104.
78. Pupo, M. **Otero, A.** Vilaseca, J.C. y Rodríguez, H. (1997) Purificación de la proteína E del virus Dengue 2 A 15 mediante cromatografía de inmutafinidad. Libro de Resúmenes V Congreso Latinoamericano de Medicina Tropical, V Congreso Cubano de Microbiología y Parasitología, II Congreso Cubano de Medicina Tropical, Congreso 60 Aniversario del Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kourí", pag. 120.
79. Miguez, J. Laferté, J. Rivero, J. Duarte, C. **Otero, A.** Y. Tejero y González, G. (1997) Caracterización de la respuesta serológica de pacientes cubanos infectados con el HIV1 utilizando péptidos sintéticos correspondiendo con el lazo V3 de la GP 120V3 del HIV-1. Estudio Retrospectivo. Libro de Resúmenes V Congreso Latinoamericano de Medicina Tropical, V Congreso Cubano de Microbiología y Parasitología, II Congreso Cubano de Medicina Tropical, Congreso 60 Aniversario del Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kourí", pag. 159.
80. Laferté, J. Más, P. Palomera, R. Bello, M. Tejero, Y. Miguez, J. González, G. y **Otero, A.** (1997) Método rápido para la serología de los Poliovirus e identificación de los enterovirus. Libro de Resúmenes V Congreso Latinoamericano de Medicina Tropical, V Congreso Cubano de Microbiología y Parasitología, II Congreso Cubano

de Medicina Tropical, Congreso 60 Aniversario del Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kourí", pag. 168.

81. Miguez, J. Tejero, Rodríguez, R.M. Y. Savón, C. Laferté, J. Goyenechea, A. González, G. **Otero, A.** Gavilondo, J. (1997) Validación del sistema ultramicroanalítico para el diagnóstico Serológico del Virus Sincitial Respiratorio. Libro de Resúmenes V Congreso Latinoamericano de Medicina Tropical, V Congreso Cubano de Microbiología y Parasitología, II Congreso Cubano de Medicina Tropical, Congreso 60 Aniversario del Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kourí", pag. 221.
82. **Otero, A.** (1997) Anticuerpos genéticamente recombinados. Una realidad tecnológica y sus posibilidades en la Medicina Tropical, Microbiología y Parasitología. Libro de Resúmenes V Congreso Latinoamericano de Medicina Tropical, V Congreso Cubano de Microbiología y Parasitología, II Congreso Cubano de Medicina Tropical, Congreso 60 Aniversario del Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kourí", pag. 232.
83. Pico María C, del Monte Alberto, Tores Youdyne, Basulto Ariel, Felicó Eric, **Anselmo Otero** (1999) Production of antibodies specific to Sticholysins I and II Biotecnología Havana, 99.
84. Pico, M.C., Basulto, A., Felicó, E y **Otero, A.J.** (2000) Comparación inmunoquímica de Sticholisinas I y II. Evento por el XXX Aniversario del EPB Finlay (4-6 Dic 2000).
85. M.C. Pico Beltrán, K. Ojito Ramos, V. Capó de Paz, E. Arteaga, A. Basulto Perdomo, E. Sánchez, E. Felicó Yglesias, **A.J. Otero González** (2001) Immunohistochemistry localization of sticholysins IV Congreso Internacional de Química. I Simposio Internacional Bioquímica y Biología Molecular. Palacio de las Convenciones de La Habana.
86. María C. Pico, Ariel Basulto, Eric Felicó y **Anselmo J. Otero** (200) Comparación inmunoquímica de sticholisinas I y II. Evento 30 Aniversario de la EPB Carlos J. Finlay, Salón Camilo Cienfuegos, MINSAP, Ciudad Habana.
87. M.C. Pico Beltrán, A. Basulto Perdomo, E. Felicó Yglesias, **A.J. Otero González** (2001) Immunochemistry comparison of sticholysins I and II, two citolysins from the sea anemone *Stichodactyla helianthus*. IV Congreso Internacional de Química. I

Simposio Internacional Bioquímica y Biología Molecular. Palacio de las Convenciones de La Habana.

88. A high-throughput immunoenzymatic assay for random screening of HIV-PR inhibitors. A model for solid-phase substrate transformation by a soluble enzyme. Gutiérrez, O. A.; Salas, E.; García, B.; Castrillo, G.; Aguilar, A.; Garay, H.; Reyes, O.; Sanchez, J. E.; Hernandez, J.; Espinosa, V.; Gonzalez, S.; **Otero, A.**; Paz, E.; von der Helms, K.; Chavez, M. y Duarte, C. *Revista Cubana de Química* Vol. XIII, (2), 2001: p.75, ISSN-058-5995.
89. María E. Alonso, María C. Pico, **Anselmo Otero**, Isis Casadelvalle, Loany Calvo, Grettell León, Emir Salas y Joaquín Díaz Brito (2002) Immunology teaching to students in biology, biochemistry and microbiology careers. Libro de resúmenes: 6to Congreso Latinoamericano de Inmunología y 3er congreso Cubano de Inmunología. Ciudad Habana.
90. María C. Pico, Ariel Basulto, Isis Casadelvalle y **Anselmo J. Otero** (2002) Neutralization of hemolytic activity of sticholysin II, a cytolysin from the sea anemone *Stichodactyla helianthus*. Libro de resúmenes: 6to Congreso Latinoamericano de Inmunología y 3er congreso Cubano de Inmunología. Ciudad Habana.
91. María C. Pico, Yarielis Noa, Viviana M. Pérez, Odalys Guerra, Juan F. Infante y **Anselmo Otero** (2002) Peroxidase-labeled sticholysin method for localization of sticholysins in the sea anemone *Stichodactyla helianthus*. Libro de resúmenes: 6to Congreso Latinoamericano de Inmunología y 3er congreso Cubano de Inmunología. Ciudad Habana.
92. **Anselmo Otero**, Abdel Hidalgo, María C. Pico (2002) A sensitive competition ELISA with immobilized antigen for quantifying sticholysins I and II, two cytolysins from the sea anemone *Stichodactyla helianthus*. Libro de resúmenes: 6to Congreso Latinoamericano de Inmunología y 3er congreso Cubano de Inmunología. Ciudad Habana.
93. **Otero A.**, Salas E., Gutierrez O, (2002) Immunanalytic tools for the evaluation of enzymatic function. A Cat-ELISA for the detection of HIV protease inhibitors (2002)

Libro de resúmenes: 6to Congreso Latinoamericano de Inmunología y 3er congreso Cubano de Inmunología. Ciudad Habana.

94. María C. Pico Ariel Basulto, Yarielis Noa, Viviana Pérez, Juan F. Infante, Carlos Valera, Aneisi Pérez, **Anselmo J. Otero** (2003) Immunohistochemical localization of sticholysins in the sea anemone *Stichodactyla helianthus* employing two immunoperoxidase stainings. Congreso de Ciencias del Mar (MARCuba 2003). Palacio de las Convenciones Ciudad Habana.
95. Ariel Basulto, María C. Pico, Isis Casadelvalle, **Anselmo J. Otero** (2003) Neutralization of hemolytic activity of sticholysin II by polyclonal antibodies raised to sticholysin II on four animal species. Congreso de Ciencias del Mar (MARCuba 2003). Palacio de las Convenciones Ciudad Habana.
96. Salas, E.; Gutiérrez, O. A.; Ramírez, A.; Otero B., E.; Torrientes, D.; Vázquez, R.; Varela, C.; Hernández, A.; Reyes, O.; Garay, H.; Berry, C.; Otero G., A.; Duarte, C. and Chávez, M. A (2003) quantitative heterogeneous immunoenzymatic assay for Plasmepsin II activity and the random screening of its inhibitors I Latin American Workshop on Enzyme Technology. Matanzas, Cuba. June 17-21 (Poster)
97. María C. Pico Ariel Basulto, Isabel Giraldino, Leida Díaz, Carmen Gilvá, Vismar Torres, **Anselmo J. Otero** (2003) Production of antibodies to sticholysin II in four animal species. Isis Casadelvalle. Congreso de Ciencias del Mar (MARCuba 2003). Palacio de las Convenciones Ciudad Habana.
98. Salas E, Ramírez, C Varela, A Otero, R Vázquez, O Reyes, J Mendiola, C Duarte, **A Otero**, O Gutiérrez, M<sup>Á</sup> Chávez. (2004). Heterogeneous enzymatic assay for random screening of Plm II inhibitors from natural sources. Revista Cubana de Química. Vol16th No. 3 p 393, ISSN 0258-5595.
99. Chávez M, J. Díaz, J. Delfín, Y. González, M. Alonso del Rivero, I. Pascual, O. Gutiérrez, A. Ramírez, V. Marañón, E. Salas, **A. Otero**, JL. Charli, C. Sampaio and FX. Aviles (2004). Protease inhibitors isolated from marine invertebrates: Structure and function. Revista Cubana de Química. Vol 16 th (3), p 336, ISSN 0258-5595.
100. **Otero, A.J.**, Sánchez. M., Muirraguí, D., Villamar, M., Maribona, R., Moreta. D., Jiménez, M.I. and Maribona, R.H. (2005) Detection of miceliar proteins of *Mycosphaerella Fijiensis* (Black Sigatoka) by TAS-ELISA including a monoclonal

antibody as a coating reagent. Presentación oral. Evento Internacional Bioplantas 2005. ISACA. Ciego de Avila, Cuba.

101. MC Pico, I Casadelvalle, JC de Karam, ME Alonso, **AJ Otero** (2006) Clase Práctica sobre la recombinación de genes de inmunoglobulinas. Cartel. Tercer Simposio De Bioquímica Y Biología Molecular, Palacio de las Convenciones de La Habana.
102. MC Pico, I Casadelvalle, **AJ Otero**, A Gort. (2006) Valorando un cambio en el aprendizaje de la inmunología. Cartel. Tercer Simposio De Bioquímica Y Biología Molecular, Palacio de las Convenciones de La Habana.
103. **Otero-González, A. J.**, Maria Neto, Simone, Costa, Fabio Teles, Pereira, Caroline Donzeli, Oliveira, V C, Bloch Jr, Carlos, Silva, Luciano Paulino, Franco, O. L. (2007) Proteomical Analyses Of Animals From Caribbean Sea: A Novel Strategy Identify Antibiotics With Activity Toward Hospital Infection. In: Mpsa Satellite Meeting - Proteomics In Cancer And Infectious Diseases, Varadero, Cuba V 1. P. 1.

## **8.5 Publicación del texto de la tesis con posterioridad a la defensa**

- Otero AJ (2010) Los anticuerpos y su rol como herramientas analíticas en los ensayos inmunoensayos enzimáticos. *Rev Cub Med Trop.* 62(2): 85-92.
- Otero AJ. (2010) Los inmunoensayos enzimáticos para detectar agentes infecciosos o sus productos: Algunos diseños y aplicaciones. *Rev Cub Med Trop.* 62(3): 167-179.