

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA
DE AGUASCALIENTES

CENTRO DE CIENCIAS BÁSICAS

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

TESIS

**OBTENCIÓN Y PURIFICACIÓN DE ANTICUERPOS POLICLONALES
ESPECÍFICOS CONTRA EL CONTAMINANTE EMERGENTE
ESTREPTOMICINA**

PRESENTA

Ivonne Chaidés Zúñiga

**PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRA EN CIENCIAS
AREA TÓXICOLOGIA**

TUTOR (ES)

Dra. Norma Angélica Chávez Vela

Dra. Eva María Salinas Miralles

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

COMITÉ TUTORAL

Dr. Juan Jáuregui Rincón: Asesor

Aguascalientes, Ags., Noviembre de 2014

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA
DE AGUASCALIENTES

M. en C. José de Jesús Ruiz Gallegos
DECANO DEL CENTRO DE CIENCIAS BÁSICAS

PRESENTE

Por medio del presente como Tutor designado del estudiante **IVONNE CHAIDES ZUÑIGA** con ID 98440 quien realizó la tesis titulado: **OBTENCIÓN Y PURIFICACIÓN DE ANTICUERPOS POLICLONALES ESPECÍFICOS CONTRA EL CONTAMINANTE EMERGENTE ESTREPTOMICINA**, y con fundamento en el Artículo 175, Apartado II del Reglamento General de Docencia, me permito emitir el **VOTO APROBATORIO**, para que *ella* pueda proceder a imprimirla, y así como continuar con el procedimiento administrativo para la obtención del grado.

Pongo lo anterior a su digna consideración y sin otro particular por el momento, me permito enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE

"Se Lumen Proferre"

Aguascalientes, Ags., a 19 de Noviembre de 2014.


DRA. NORMA ANGÉLICA CHÁVEZ VELA
Profesora Investigadora y Tutora de tesis


DRA. EVA MARIA SALINAS MIRALLES
Profesora Investigadora y Tutora de tesis


Dr. Juan Jauregui Rincón
Profesor y Asesor

c.c.p.- Interesado
c.c.p.- Secretaría de Investigación y Posgrado
c.c.p.- Consejero Académico
c.c.p.- Minuta Secretario Técnico



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA
DE AGUASCALIENTES

CENTRO DE CIENCIAS BÁSICAS

A.Q.B. IVONNE CHAIDES ZÚÑIGA
ALUMNO (A) DE LA MAESTRÍA EN
CIENCIAS EN EL ÁREA DE TOXICOLOGÍA
P R E S E N T E .

Estimado (a) alumno (a) Chaidés:

Por medio de este conducto me permito comunicar a Usted que habiendo recibido los votos aprobatorios de los revisores de su trabajo de tesis y/o caso práctico titulado: **"OBTENCIÓN Y PURIFICACIÓN DE ANTICUERPOS POLICLONALES ESPECÍFICOS CONTRA EL CONTAMINANTE EMERGENTE ESTREPTOMICINA"**, hago de su conocimiento que puede imprimir dicho documento y continuar con los trámites para la presentación de su examen de grado.

Sin otro particular me permito saludarle muy afectuosamente.

ATENTAMENTE
Aguascalientes, Ags., 19 de noviembre de 2014
"SE LUMEN PROFERRE"
EL DECANO

M. en C. JOSÉ DE JESÚS RUIZ GALLEGOS



TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

c.c.p.- Archivo
JJRG,mjda





Instituto de Biotecnología
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MEXICO

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

Cuernavaca, Morelos a 04 de abril del 2014

A QUIEN CORRESPONDA
PRESENTE

Por medio de la presente, la que suscribe, la Dra. Yvonne Rosenstein Azoulay, investigadora en el Instituto de Biotecnología, UNAM en Cuernavaca (IBT), manifiesto que la alumna Ivonne Chaides Zúñiga ha cumplido satisfactoriamente una estancia académica en este instituto, con la colaboración en el proyecto denominado, "PURIFICACION DE ANTICUERPOS POLICLONALES ESPECIFICOS CONTRA ESTREPTOMICINA PARA MONTAJE DE METODO DE DETECCION ELISA", misma que se efectuó durante el periodo comprendido del 24 de febrero de 2014 al 04 de abril del 2014.

Dicha estancia se llevó a cabo en el Departamento de Medicina Molecular y Bioprocesos.

Sin más por el momento, quedo a su disposición para cualquier duda o información complementaria que sea requerida.

ATENTAMENTE

Dra.-Yvonne Rosenstein

yvonne@ibt.unam.mx

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS



AV. UNIVERSIDAD 2001. COL. CHAMILPA C.P 62210
TELS. (5255) 56 22 76 00- (777)329 16 00 FAX (777)317 23 88
CUERNAVACA, MORELOS, MÉXICO



AGRADECIMIENTOS

De corazón, quiero agradecer de la manera más sincera, a la Dra. Norma Angélica Chávez Vela, ya que confió en mi desde el principio y me permitió trabajar en este proyecto, siempre estuvo al pendiente de mi trabajo de tesis, y más allá de ser mi tutora, es un ejemplo para mí.

Así mismo, a la Dra. Eva María Salinas Miralles, por apoyarme en este trabajo, invitándome a pensar y enseñándome como fundamentar la investigación.

Al Dr. Juan Jáuregui Rincón, por contribuir a la realización de este trabajo, facilitándome equipos, así como por su asesoramiento.

A mi compañera LAQB. Verónica Elizabeth Moreno Córdova, por estar conmigo en todo el desarrollo de este trabajo, apoyándome tanto laboral como emocionalmente.

A la Dra. Yvonne Rosenstein, por permitirme trabajar con ella en la estancia realizada en el IBT, así como a mis compañeros Roberto, Montserrat, Dany, Álvaro, Brenda, Joseph, porque me recibieron en su laboratorio y me ayudaron en todo, brindándome su amistad.

A mi gran amigo Carlos Encarnación, que siempre me apoyo, ya fuera con palabras de ánimo o burlas, así como a mis demás compañeros de la maestría, ya que formaron parte de este proceso de aprendizaje.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), por la beca que me otorgó para realizar los estudios de doctorado y por haber aportado parte de los recursos que permitieron realizar esta investigación.

DEDICATORIAS

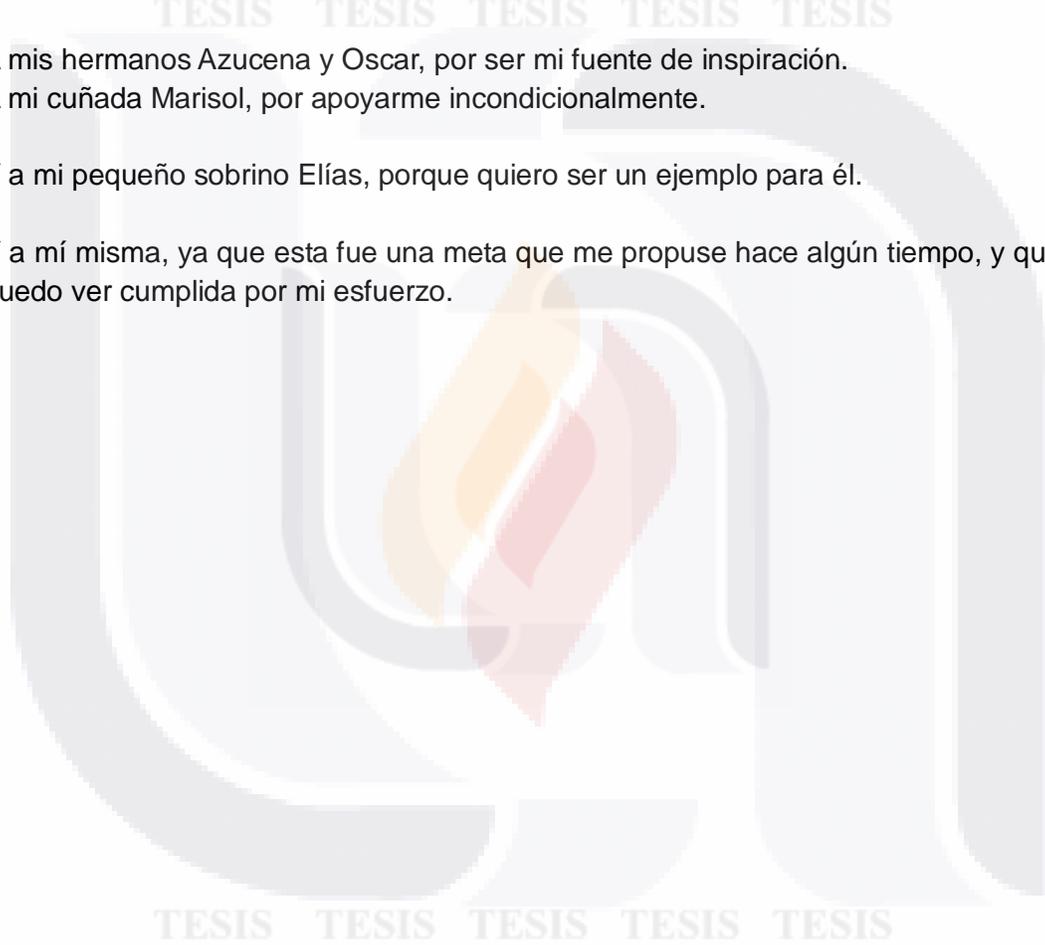
Dedico este trabajo, a todas aquellas personas que han estado a mi lado apoyándome y dándome ánimos para seguir adelante.

A mis padres, María Elena y Abelardo, por enseñare la importancia de esforzarse al máximo y dar todo de sí en el trabajo.

A mis hermanos Azucena y Oscar, por ser mi fuente de inspiración.
A mi cuñada Marisol, por apoyarme incondicionalmente.

Y a mi pequeño sobrino Elías, porque quiero ser un ejemplo para él.

Y a mí misma, ya que esta fue una meta que me propuse hace algún tiempo, y que ahora puedo ver cumplida por mi esfuerzo.



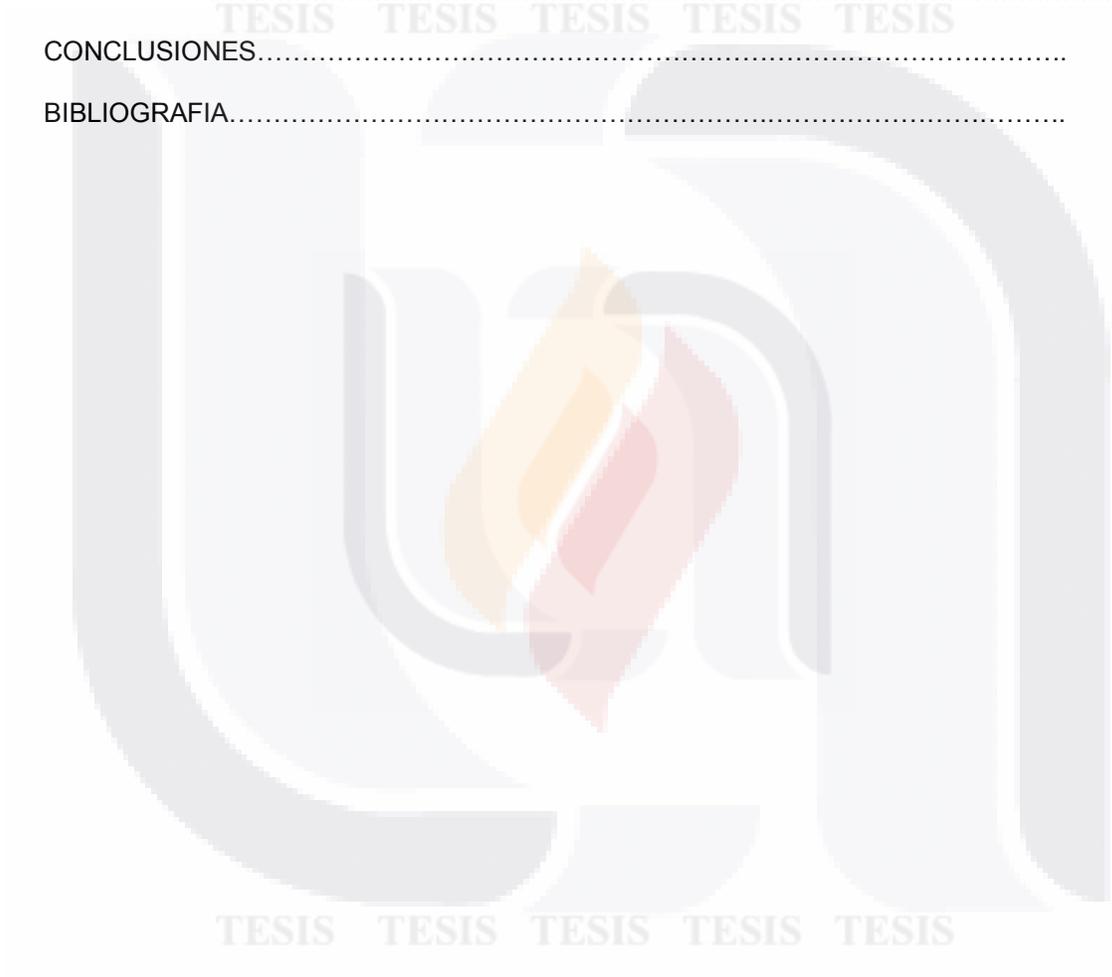
INDICE GENERAL

	Pagina
INDICE DE TABLAS.....	5
INDICE DE FIGURAS	6
ACRONIMOS.....	7
RESUMEN.....	10
ABSTRAC.....	11
INTRODUCCION.....	12
1. ANTECEDENTES.....	13
1.1.Problemática del agua.....	13
1.2.Contaminantes emergentes.....	15
1.2.1.Características de los contaminantes emergentes.....	16
1.2.2.Principales contaminantes emergentes	17
1.3.Los antibióticos como contaminantes emergentes.....	20
1.3.1.Aminoglucósidos.....	20
1. Mecanismos de acción y efectos.....	21
2. Uso de antibióticos aminoglucósidos	21
3. Efectos tóxicos.....	21
4. STR.....	23
1.4.Métodos de detección de contaminantes emergentes.....	24
1.4.1.Métodos Inmunoquímicos.....	26
1.5.Inmunología Básica.....	26
1.5.1.Anticuerpos.....	26
1. Inmunoglobulinas G.....	29
1.5.2.Antígenos e inmunógenos.....	29

1.5.3. Interacciones Antígeno-Anticuerpo.....	30
1.5.4. Anticuerpos policlonales.....	31
1.5.5. Producción de Anticuerpos.....	31
1. Inmunización.....	31
2. Adyuvantes.....	32
3. Portadores Inmunogénicos.....	33
1.5.5.3.1. Hemocianina de lapa californiana o KLH.....	33
1.5.5.3.2. Albumina sérica bovina o BSA.....	34
1.5.5.3.3. Ovoalbúmina u OVA.....	34
1.6. Métodos de purificación de anticuerpos.....	34
1.6.1. Purificación con sulfato de amonio.....	34
1.6.2. Purificación con ácido Caprílico.....	35
1.6.3. Purificación de anticuerpos por cromatografía de afinidad.....	35
1.7. Ensayos inmunológicos.....	35
1.7.1. Técnicas basadas en “Blotting”.....	36
1.8. Antecedentes de la detección de antibióticos en agua residual.....	38
2. JUSTIFICACION.....	40
3. HIPOTESIS.....	41
4. OBJETIVOS.....	42
4.1. Objetivo general.....	42
4.2. Objetivos específicos.....	42
5. MATERIALES Y METODOLOGIA.....	43
5.1. Material.....	43
5.1.1. Material biológico.....	43
5.1.2. Inmunógeno.....	43
5.2. Métodos.....	43

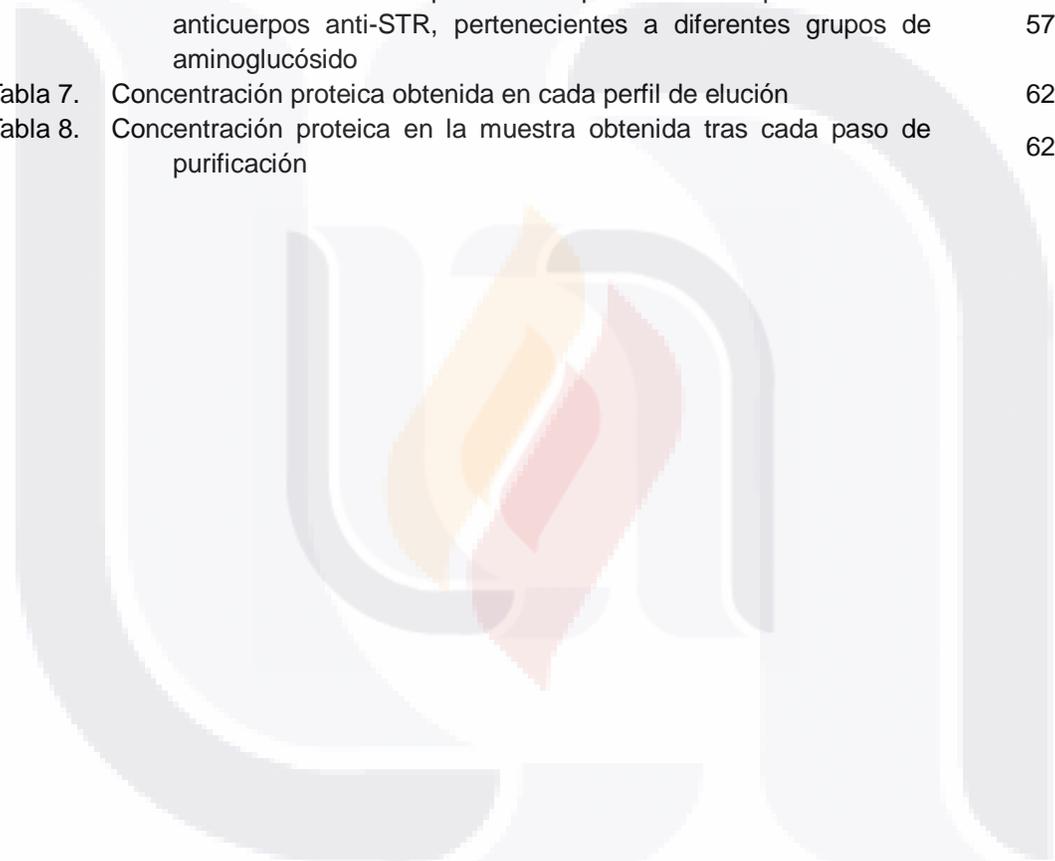
5.2.1.Obtención de anticuerpos policlonales específicos contra STR.....	43
5.2.2.Purificación de anticuerpos policlonales.....	45
1. Purificación de anticuerpos por precipitación con sulfato de amonio.....	45
2. Purificación de anticuerpos por precipitación con ácido caprílico.....	46
3. Purificación de anticuerpos específicos contra STR por cromatografía de inmunoafinidad.....	47
4. Determinación de la pureza de los anticuerpos policlonales anti-STR.....	51
5.2.3. Verificación de la reactividad de los anticuerpos anti-STR.....	55
5.2.4. Verificación de la especificidad de los anticuerpos anti-STR.....	57
1. Diferentes antibióticos aminoglucósidos.....	57
2. Diferentes fármacos, entre ellos antibióticos no aminoglucósidos.....	57
6. RESULTADOS.....	58
6.1.Producción de anticuerpos policlonales específicos contra STR.....	58
6.1.1.Inducción de la producción de anticuerpos policlonales anti-STR.....	58
6.2.Purificación de anticuerpos policlonales contra STR.....	59
6.3.Verificación de la reactividad y especificidad de los anticuerpos anti-STR.....	64
a) Reactividad de los anticuerpos policlonales anti-STR.....	64
b) Evaluación de la especificidad de los anticuerpos anti-STR.....	65
7. DISCUSIONES.....	67
7.1.Producción de anticuerpos policlonales específicos contra STR	67
7.2.Purificación de anticuerpos anti-STR.....	68
7.2.1. Purificación de anticuerpos por cromatografía de inmunoafinidad.....	69
1. Acoplamiento de la STR a la Sefarosa 4B.....	70
2. Estandarización del método de purificación por cromatografía de inmunoafinidad utilizando columna de sefarosa 4B activada con cianógeno.....	70

7.3. Determinación de la pureza, reactividad y especificidad de los anticuerpos policlonales anti-STR.....	71
7.3.1. Determinación de la pureza de los anticuerpos policlonales anti-STR.....	71
7.3.2. Determinación de la reactividad de los anticuerpos policlonales anti-STR.....	72
7.3.3. Determinación de la especificidad de los anticuerpos policlonales anti-STR.....	73
CONCLUSIONES.....	75
BIBLIOGRAFIA.....	76



ÍNDICE DE TABLAS

Tema	Página
Tabla 1. Diferentes condiciones de elución	51
Tabla 2. Formulación reactivo de Bradford	52
Tabla 3. Formulación de gel separador para electroforesis SDS-PAGE	52
Tabla 4. Formulación de gel concentrador para electroforesis SDS-PAGE	53
Tabla 5. Formulación de la solución de muestra para electroforesis SDS-PAGE	54
Tabla 6. Diferentes antibióticos empleados en pruebas de especificidad de anticuerpos anti-STR, pertenecientes a diferentes grupos de aminoglucósido	57
Tabla 7. Concentración proteica obtenida en cada perfil de elución	62
Tabla 8. Concentración proteica en la muestra obtenida tras cada paso de purificación	62



ÍNDICE DE FIGURAS

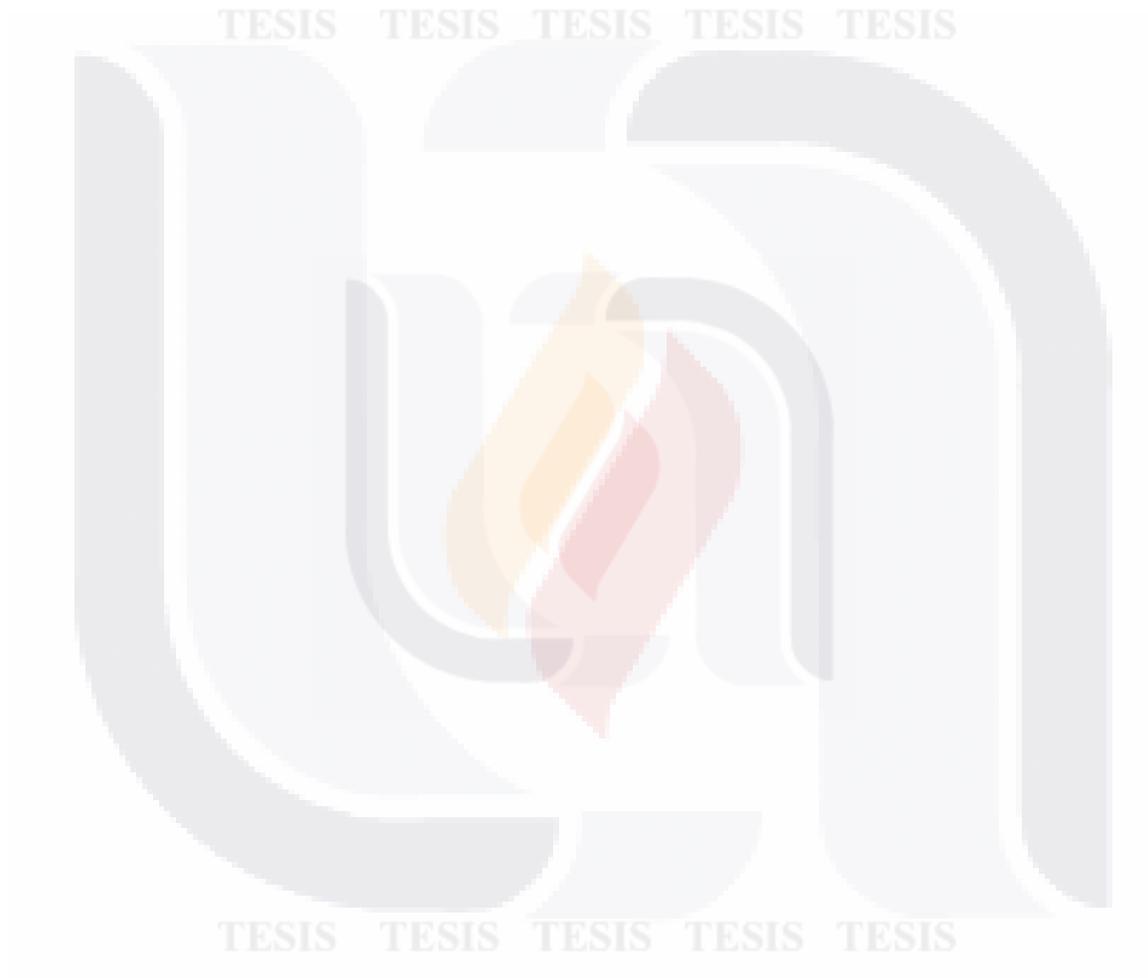
Tema	Página
Figura 1. Ciclo del Agua	13
Figura 2. Estructura química de la STR	23
Figura 3. Estructura de la unidad básica que conforma los anticuerpos	27
Figura 4. Diferentes clases de inmunoglobulinas	29
Figura 5. Etapas de obtención de anticuerpos policlonales de conejo contra la STR	43
Figura 6. Esquema de los componentes de la columna Hi-Trap NHS-activada	47
Figura 7. Prueba de Dot Blot revelada por fosfatasa alcalina para evaluar la generación de anticuerpos anti-STR en cada conejo	58
Figura 8. Dot Blot con revelado por ECL para evaluar la generación de anticuerpos anti-STR en cada etapa de la inmunización de los conejos	58
Figura 9. Gel electroforético teñido con plata diferentes pasos de purificación: Hi-Trap NHS-activada	59
Figura 10. Gel electroforético teñido con plata diferentes pasos de purificación: Sefarosa 4B activada con cianógeno	59
Figura 11. Gel electroforético teñido con azul de Coomassie, prueba de acoplamiento	60
Figura 12. Diferentes perfiles de elución, Sefarosa 4B activada con cianógeno	61
Figura 13. Inmunoblot a las fracciones de anticuerpos por purificación de inmunoafinidad	63
Figura 14. Obtención del título de anticuerpos vs antígeno	64
Figura 15. Evaluación de la reactividad de anticuerpos policlonales anti-STR	65
Figura 16. Dot Blot para determinar la presencia de STR en agua residual	65
Figura 17. Prueba por Dot blot para determinar la especificidad de los anticuerpos anti-STR; diferentes antibióticos aminoglucósido	66
Figura 18. Prueba por Dot blot para determinar la especificidad de los anticuerpos anti-STR; diferentes antibióticos no aminoglucósido	66

ACRONIMOS

(NH ₄) ₂ SO ₄	Sulfato de amonio
°C	Grados Celsius
µg	Microgramo
µl	micro litro
µm	Micrómetros
Ab	Anticuerpos
Abs	Absorbancia
ACF	Adyuvante completo de Freud
Ag	Antígeno
AIF	Adyuvante incompleto de Freud
APS	Persulfato de amonio
BFR'S	Retardantes de llama fluorados
BSA	Albumina sérica bovina
C(-)	Control negativo
C(+)	Control positivo
CaCl ₂	Cloruro de calcio
CH ₃ COONa	Acetato de Sodio
CIM	Concentración inhibitoria mínima
Cmax	Concentración máxima
CNBr	Bromuro de cianógeno
Da	Dalton
DA'S	Drogas de abuso
DEAD	Cromatografía de intercambio iónico
Dm	Distancia recorrida por la muestra
Dt	Distancia total
DTT	Ditrioteitol
ECL	Quimioluminiscencia aumentada
EDAR	Plantas de tratamiento de agua residual
ELISA	Ensayo por inmunoabsorbencia ligado a enzimas
EPA	Agencia para la protección de medioambiente
F(ab)	Fragmento de unión al antígeno
FAO	Organización de las naciones unidas para la alimentación y la agricultura
Fc	Fragmento cristalizabile
FIA	Inmunoensayo por fluorescencia
g	Gravedades
GC-MS	Cromatografía liquida acoplada a espectrofotometría de gases
HC	Cadena pesada
HCl	Ácido Clorhídrico

HPLC	Cromatografía líquida de alta eficiencia
HPLC-MS	Cromatografía líquida de alta eficiencia acoplada a masas
HRP	Peroxidasa de rábano picante
Ig	Inmunoglobulina
IgG	Inmunoglobulina de tipo G
kDa	KiloDalton
Kg	KiloGramo
KH ₂ PO ₄	Fosfato de potasio monobásico
KLH	Hemocianina de lapa californiana
KLH-STR	STR acoplada a hemocianina de lapa californiana
KSCN	Tiocianato de potasio
L	Litros
LC	Cadena ligera
LC-MS-(MS)	Cromatografía líquida acoplada a Cromatografía de masas en tándem
LIA	Inmunoensayo por quimioluminiscencia
Log PM	Logaritmo del peso molecular
mg	MiliGramo
mg	MiliGramo
min	Minutos
ml	Mililitro
mM	Milimolar
Na ₂ HPO ₄	Fosfato de sodio dibásico
NaCl	Cloruro de sodio
NaHCO	Carbonato de sodio
NaN ₃	Azida de Sodio
NaPO ₃	Fosfato de Sodio
nm	Nanómetro
OFL	Ofloxacina
OMS	Organización mundial de la salud
OVA	Ovoalbumina
PBS	Solución tampón de fosfatos
PCB's	Policlorobifinilos
PCCC	Parafinas cloradas
PCP	Productos de cuidado personal
PFOA	Ácido perfluorooctanoico
PFOS	Compuestos perfluorados
pH	Potencial de hidrogeno
PO ₄	Ion fosfato
PVDF	Polifluoruro de vilidieno
QA	Quinolonas
Rf	Coeficiente de migración
SC	Subcutánea

SDS	Dodecilsulfato de sodio
SDS-PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato de sodio
STR	Estreptomina
TBS	Solución tampón tris-salino
TT	Toxoide tetánico
T-TBS	Solución tampón tris-salino con tween



RESUMEN

La principal fuente de generación de antibióticos contaminantes, son las aguas residuales de origen hospitalario, y debido a los problemas que se presentan para su eliminación, existe un peligro latente en la generación de cepas bacterianas, de diferentes microorganismos o/y virus resistentes a los antibióticos. Un antibiótico ampliamente utilizado es la estreptomina (STR, antibiótico aminoglucósidos), la cual se tiene reportado que causa problemas de ototoxicidad y nefrotoxicidad entre otros, en el humano.

Las metodologías más utilizadas para la detección de antibióticos en matrices ambientales requieren el manejo de equipos complejos, costosos, que consumen mucho tiempo en su manejo, además de que su operación no es sencilla. Una opción a este tipo de metodologías, son aquellos basados en interacciones inmunoquímicas. Uno de estos métodos, que han presentado buenos resultados, así como facilidad de desarrollo y alta sensibilidad de detección, son aquellos basados en interacciones inmunológicas entre anticuerpo dirigidos específicamente contra el fármaco. Este tipo de metodologías permite el procesamiento de números elevados de muestras, así como el uso de pequeños volúmenes de la misma, debido a la especificidad que existe entre la interacción antígeno anticuerpo.

Es por esto, que este trabajo se enfocó a la obtención y purificación de anticuerpos policlonales específicos contra la STR, los cuales se produjeron bajo un protocolo de inmunización en conejos adultos jóvenes de la cepa Nueva Zelanda, cuya reactividad fue demostrada mediante pruebas de Dot Blot.

El límite más bajo de detección presentado por estos anticuerpos anti-STR, fue de 25 µg/ml (0.0025%). Sin embargo, estos anticuerpos no fueron específicos únicamente contra la STR, sino que presentaron una reacción cruzada contra otros antibióticos aminoglucósidos (kanamicina, neomicina y paromomicina), pero no con antibióticos no aminoglucósidos. Esto lejos de presentar un problema, acarrea la ventaja de un número mayor de moléculas detectables en aguas residuales. Cabe señalar, que la mayoría de los antibióticos aminoglucósidos se utilizan en combinación, por lo cual, el que solo exista la presencia de uno solo en el agua residual no es viable. Al ser los anticuerpos capaces de reconocer otros antibióticos, la utilización de los mismos en pruebas de detección se amplía a un rango que abarca más moléculas de interés.

Con los anticuerpos obtenidos en el laboratorio, se logró la detección de STR en agua residual adulterada en el laboratorio. Con esto, se demostró, que las condiciones físicas y químicas no controladas en las que se encuentra el agua, no afecta la reactividad de los anticuerpos ante la STR.

ABSTRACT

The main source of generation of antibiotics as contaminants, are hospital wastewaters. One of the problems that arise from their disposal, is that they are a potential risk for the generating of bacterial strains and / or viruses resistant to antibiotics. An antibiotic widely used is the streptomycin (STR, aminoglycoside antibiotic), which is reported to cause ototoxicity and nephrotoxicity problems in human.

The methodologies used for the detection of antibiotics in environmental matrices require complex handling, expensive and time-consuming methodologies and equipment, plus they are not simple to operate. An option to such methodologies are those based on immunochemical interactions. One of these methods, which has presented good results, easy development and high detection sensitivity, are those based on immunological interactions between antibody specifically directed against the drug. Such methods allow the processing of large numbers of samples, and the use of small volumes of the same, due to the specificity between the antigen-antibody interaction.

It is for this reason that the aim of this work was to obtain and purificate specific polyclonal antibodies to STR, which occurred under an immunization protocol in young-adult rabbits strain New Zealand, whose reactivity was demonstrated by Dot Blot tests.

The lowest detecting limit presented by these anti-STR, antibodies was 25 mg / ml (0.0025%). However, these antibodies were not specific only against the STR. they presented a cross reaction against other aminoglycoside antibiotics (kanamycin, neomycin, and paromomycin) but not against non-aminoglycoside drugs. This far from presenting a problem, brings the advantage of a greater number of detectable molecules in wastewater. It is noteworthy that most of the aminoglycoside antibiotics are used in combination, therefore, the solely presence of one of them in the wastewater is not viable. As antibodies are capable of recognizing the other aminoglycoside antibiotics, their use in screening is extended to a range that covers more molecules of interest.

With the antibodies raised in our laboratory, the detection of STR in adulterated residual water was achieved. With this, it was shown that the physical and chemical uncontrolled conditions in which the water is located, does not affect the reactivity of the antibodies to the STR.

INTRODUCCION

Los productos farmacéuticos comprenden un amplio grupo de compuestos químicos, utilizados en grandes cantidades y variedad, sin embargo el estudio del comportamiento de estas sustancias al ingresar a las aguas superficiales, su impacto en el ambiente y posible incidencia en la salud ha recibido atención sólo en los últimos años. Los fármacos luego de su administración son absorbidos y metabolizados por el organismo y finalmente excretados alcanzan a los sistemas acuáticos, aunque en pequeñas cantidades, de forma continua a través de los efluentes de agua residual. (Ankley y cols., 2007).

El perfil de composición y niveles de concentración encontrados varían dependiendo del país y consumo de los fármacos en cuestión. En los últimos años se han desarrollado y optimizado métodos analíticos para la determinación de compuestos farmacéuticos, con el objeto de mejorar la precisión y la sensibilidad, para logra cuantificar con exactitud las concentraciones en muestras ambientales (Kostopoulou y Nikolaou, 2008).

El objetivo del presente trabajo se enfocó a la obtención y purificación de anticuerpos policlonales específicos contra un fármaco antibiótico aminoglucósido, la STR, los anticuerpos se produjeron bajo un protocolo de inmunización en conejos adultos jóvenes de la cepa Nueva Zelanda, cuya reactividad fue demostrada mediante pruebas de Dot Blot.

1. ANTECEDENTES

1.1 Problemática del agua

El agua, es un recurso natural escaso, indispensable para la vida humana y el sostenimiento del medio ambiente, que como consecuencia del rápido desarrollo humano y económico y del uso inadecuado que se ha hecho de ella como medio de eliminación, ha sufrido un alarmante deterioro. Al problema de la contaminación, que comenzó a hacerse notable ya a principios del siglo XIX, cabe añadir el problema de la escasez, aspecto que está adquiriendo proporciones alarmantes a causa del cambio climático y la creciente desertización que está sufriendo el planeta (Postigo, López y Barceló, 2010).

La aparición de elementos "no deseables" y tóxicos en el agua, y la variación en las concentraciones de sus constituyentes comunes, tiene su origen en el denominado "ciclo del agua" (figura 1). En alguna parte de este ciclo, en el cual confluyen distintos compartimentos ambientales y actividades humanas, es donde se produce la contaminación del agua, o mejor dicho, la alteración de su calidad. De acuerdo con este ciclo, las principales vías de entrada de contaminantes en el medio ambiente acuático son las aguas residuales, entre las que se incluyen las urbanas, industriales y las de origen agrícola o ganadero. La prevalencia de una u otra depende en gran medida del tipo de contaminación de que se trate y del nivel de depuración o atenuación natural (si existe) que experimentan (Postigo, López y Barceló, 2011).

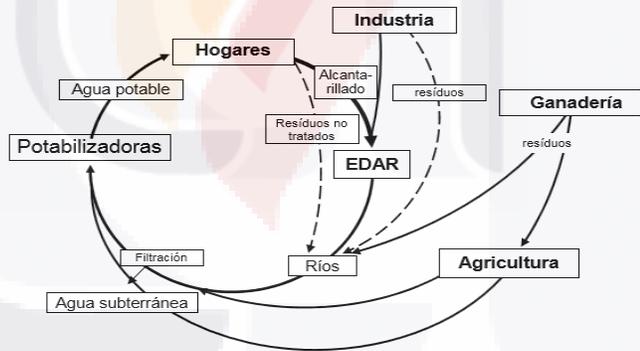


Figura 1. Ciclo del Agua; (Barceló y López, 2011)

Muchas regiones del mundo están experimentando crecientes problemas de déficits hídricos. Esto se debe al crecimiento implacable de la demanda de agua frente a unos recursos hídricos estáticos o en disminución y a las periódicas sequías debidas a factores climáticos. El déficit hídrico también se produce por la contaminación provocada por las aguas residuales de ciudades en expansión, muchas de las cuales solo han sido tratadas de manera parcial, y de la contaminación de los acuíferos por diversas fuentes. Dicha contaminación del agua empeora los efectos de la escasez, al reducir la cantidad de agua segura para el consumo. La escasez de agua en todos sus aspectos conlleva graves costos económicos, sociales e incluso políticos (FAO, 2013).

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

Mientras el consumo doméstico de agua a nivel internacional se sitúa alrededor de 150 litros/persona*día, el valor admitido generalmente para los hospitales está dentro de rango de 400 a 1,200 litros/cama/día. Uno de los análisis que permite evaluar el impacto de la actividad hospitalaria sobre los recursos hídricos es la determinación de la carga contaminante asociada al caudal de aguas residuales que se genera diariamente. Puede estimarse que el 80% del volumen de agua consumido en un hospital en un día corresponde a la generación de aguas residuales.

Este consumo importante de agua en los hospitales genera a su vez significantes volúmenes de aguas residuales cargadas con compuestos químicos tóxicos, residuos de drogas, microorganismos (algunos de los cuales presentan multirresistencia a los antibióticos), elementos radioactivos y radio isótopos, metales pesados y compuestos órgano-halogenados. El agua residual de un establecimiento hospitalario es una mezcla compleja, capaz de generar serios problemas ambientales, pudiendo llegar a ser de 5 a 15 veces más tóxicas que las aguas residuales domésticas (Ramos, 2008).

En México el crecimiento económico no ha tomado en cuenta plenamente las señales de escasez de agua. La concentración de la población y la actividad económica han creado zonas de alta escasez, no sólo en las regiones de baja precipitación pluvial sino también en zonas donde eso no se percibía como un problema al comenzar el crecimiento urbano o al establecer agricultura de riego. Tan sólo para ilustrar la situación extrema en la que se encuentra el agua subterránea, se puede mencionar que, según cálculos de la Comisión Nacional del Agua (CNA), 101 acuíferos de un total de 600 están sobre explotados (Jiménez, 2011).

Los problemas de escasez de agua en México se han agravado en las últimas décadas, lo que genera mayor tensión en la competencia por el recurso, no sólo al interior, sino con otros países. En un intento por regular el uso del agua y de evitar los conflictos, el marco institucional ha ido cambiando, sin conseguir del todo una reforma acorde con el nivel del problema. El diseño de mecanismos de prevención y, en su caso, de mediación y resolución de conflictos, requieren de conocer a fondo la manera en la que surgen y se desarrollan estas problemáticas (Instituto Nacional de Ecología, 2013).

El agua ha sido tema de interés debido al papel vital que este recurso juega en la vida humana y su creciente escasez para abastecer los servicios requeridos. El ahorro de agua potable en el hogar es fundamental para economizarla en cualquier comunidad, sobre todo en zonas donde el servicio o suministro público de agua suele ser costoso y algunas veces irregular.

Cuando la demanda de agua se acerca a los límites de los recursos disponibles, o bien a la capacidad límite de los sistemas de suministro de agua, se puede producir competencia entre los distintos usos del agua. Las áreas urbanas e industrializadas tienen, con frecuencia, una mayor capacidad económica o poder político para crear infraestructuras y desarrollar nuevos suministros de agua o reasignar suministros existentes desde las áreas agrícolas a las urbanas. En la competencia por el agua, las necesidades humanas con frecuencia prevalecen sobre las necesidades de los ecosistemas (FAO, 2013).

Los altos incrementos de la demanda de agua, con frecuencia en lugares donde son escasos los recursos hídricos, han motivado a dirigirse hacia los efluentes de plantas de tratamiento de aguas residuales como una fuente alternativa de recursos hídricos. La consideración del agua residual tratada como un subproducto conlleva diversas exigencias

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

técnicas que pueden resumirse en términos de fiabilidad (garantía) tanto de su calidad como de su cantidad. Esta consideración de producto exige en la práctica una observación estricta de la calidad del agua residual empleada como materia prima (Kestler, 2004).

La caracterización del uso del agua regenerada como “no convencional” no quiere decir que las aguas residuales sean poco comunes o que no se ha demostrado que sean una fuente de suministro de agua efectiva. Las aguas residuales domésticas han sido utilizadas durante siglos en la agricultura y el uso de las aguas residuales tratadas tiene al menos un siglo de antigüedad. Su estatus no convencional refleja el hecho de que sólo en los últimos 30 años el uso de agua regenerada ha tenido importancia en la planificación de los recursos hídricos. Con un tratamiento adecuado, las aguas residuales son aptas para muchos usos urbanos, industriales y agrícolas. Aunque aún no ha sido aprobada en muchos países, el agua regenerada se utiliza como agua potable en algunos lugares, como es el caso de Namibia (Lahnsteiner y Lempert, 2007).

En lugar de utilizar agua potable de consumo público, actualmente se están reutilizando aguas residuales tratadas, con una calidad sanitaria y con características físicas similares a la del agua de abastecimiento. Además de agotar todos los recursos tecnológicos al alcance para disminuir el uso de agua en el hogar y en las actividades comerciales e industriales, es necesario pensar en esquemas que permitan el buen uso del agua en las ciudades (Kestler, 2004).

La creciente competencia entre los usos agrícolas y urbanos por el agua dulce de alta calidad, especialmente en las regiones áridas y semiáridas y densamente pobladas, aumentará la presión sobre este recurso cada vez más escaso. Las aguas residuales pueden ser una fuente de agua más fiable (disponible todo el año) que otras fuentes con las que cuentan los agricultores, aunque esto depende de que las fuentes primarias de aguas urbanas también sean fiables (FAO, 2013).

El re-uso del agua, es esencial para salvar este recurso, así como para alcanzar un mejor aprovechamiento de los recursos hídricos (Scarpa y cols., 2011). Sin embargo, la falta de eficacia de los sistemas convencionales de tratamiento de aguas residuales para eliminar contaminantes emergentes pone de manifiesto su entrada continua en las aguas superficiales receptoras mediante los efluentes de las depuradoras, y el riesgo que supondría la reutilización (García, 2013). Esto plantea serias interrogantes acerca de la presencia de organismos patógenos o sustancias tóxicas en dichas aguas, como son los contaminantes emergentes (Manahan, 2006). Incluso cuando se someten a un tratamiento biológico, se ha demostrado por muchos estudios que múltiples compuestos orgánicos, tales como productos farmacéuticos, productos de cuidado personal (PCP), hormonas y otros compuestos de disrupción endocrina, escapan a tratamientos convencionales de aguas residuales y algunos de ellos están cada vez más presente en el ambiente (Scarpa y cols., 2011).

1.2 Contaminantes emergentes

Son contaminantes previamente desconocidos o todavía no reconocidos como tales, que todavía no están incluidos en la legislación e implican riesgo por ser tóxicos, persistentes y bioacumulables. Durante décadas, la comunidad científica ha centrado sus esfuerzos en el estudio de estos contaminantes químicos que en su mayoría son apolares, como los hidrocarburos aromáticos policíclicos, los policlorobifenilos (PCBs) o las dioxinas (Postigo y cols., 2010).

Los contaminantes emergentes corresponden, en la mayoría de los casos, a contaminantes no regulados, que pueden ser candidatos a regulación futura, dependiendo de los resultados de la investigación sobre sus efectos potenciales en la salud y del monitoreo de su incidencia (Becerril, 2009). Son compuestos de los cuales se sabe relativamente poco o nada acerca de su presencia e impacto en los distintos compartimentos ambientales (Petrovic y cols., 2003). Así mismo, en cantidades tan pequeñas que no se detectan por los métodos analíticos convencionales (Manahan, 2006). El estudio de estos mismos, se encuentra entre las líneas de investigación prioritarias de los principales organismos dedicados a la protección de la salud pública y medioambiental, tales como la Organización Mundial de la Salud (OMS), la Agencia para la Protección del Medio Ambiente (EPA), o la Comisión Europea (Barceló y López, 2012).

Los compuestos emergentes presentan efectos significativos alterando al sistema endocrino y bloqueando o perturbando las funciones hormonales, afectan a la salud de los seres humanos y de especies animales aun cuando se encuentran en tan bajas concentraciones (García y Gómez, 2010). Por su lado, las bacterias son capaces de desarrollar mecanismos de resistencia, adquiridos y transmisibles, que consisten fundamentalmente en la producción de enzimas bacterianas que inactivan los antibióticos o en la aparición de modificaciones que impiden la llegada del fármaco al punto diana o en la alteración del propio punto diana (Daza, 1998). Aunque estos contaminantes se encuentran en muy bajas concentraciones, sus efectos son significativos, por lo que es necesario implementar adecuados diseños de tratamientos de aguas para su eficiente remoción (García y Gómez, 2010).

Los contaminantes emergentes se convierten en un riesgo ambiental para la salud pública en el mundo. Entre estos se destacan los principios activos farmacéuticos y los productos para el cuidado personal, que se encuentran en cuerpos de agua para el consumo humano y de reserva. Ensayos de eco-toxicidad han demostrado *in vivo* e *in vitro* el efecto tóxico sobre las cadenas trófica, y su identificación cuantificación constituyen la primera etapa dentro de la toma de decisiones para preservación del recurso (Jiménez, 2011).

La mayoría de los compuestos utilizados en la práctica médica son eliminados directamente en los efluentes hospitalarios o a las redes municipales sin metabolizar o solo parcialmente metabolizados, impactando finalmente en los ambientes acuáticos y en los sedimentos. Aquellos que sean más hidrosolubles tendrán mayor movilidad en este medio y los que poseen elevado carácter lipofílico serán adsorbidos por barros y sedimentos (Löschl y cols., 2005).

1.2.1 Características de los contaminantes emergentes

- Previamente desconocidos o no reconocidos
- Su presencia en el medio ambiente no es necesariamente nueva, pero si la preocupación por las posibles consecuencias de la misma
- Son compuestos de los cuales se sabe relativamente poco o nada acerca de su presencia e impacto en los distintos compartimentos ambientales, razón por la cual y a su vez, la disposición de métodos para su análisis en nula o limitada.
- Compuestos de elevada producción y consumo, por lo cual es continua su introducción al medio ambiente.
- Pueden no ser persistentes y causar efectos negativos.

- Pueden proceder tanto de aplicaciones industriales como de usos domésticos.

1.2.2 Principales contaminantes emergentes

a) *Retardantes de llama bromados (BFR's)*

Se emplean en una gran variedad de productos comerciales, muebles, plásticos, tejidos, pinturas y aparatos electrodomésticos. Cuentan con una gran ubicuidad, siendo detectados en un amplio abanico de muestras, tanto humanas, animales y de medio ambiente, así como en áreas alejadas de su área de producción y uso. Su persistencia, biodisponibilidad e indicios sobre posibles efectos adversos como neurotoxicidad, disrupción endocrina y cáncer, aún no están demostradas completamente. Algunos ejemplos de estos compuestos son: Tetrabromo bisfenol A (TBBPA), el hexabromociclododecano (HBCD), y los polibromodifenilesteres (PBDe's) (UNAD, 2014).

b) *Parafinas cloradas*

Las parafinas cloradas de cadena corta (PCCC) son un grupo de compuestos sintéticos utilizados principalmente como fluidos para el trabajo con metales, líquidos de obturación, retardantes de llamas en gomas y textiles, en el tratamiento del cuero y en pinturas y revestimientos.

Los datos de disponibilidad de estos compuestos en zonas apartadas a su fuente de origen y uso, ponen en manifiesto la contaminación de la biota y del aire por las PCCC. Hay estudios que han medido PCCC en sedimentos, agua, suelos y aire. No se descomponen de manera natural. También se han medido en distintos organismos. Un ejemplo son las mediciones realizadas en nematodos (Sochová y cols., 2007) o su detección en aves (Reth y cols., 2006). Los PCCC son altamente tóxicos para organismos acuáticos.

Una ruta de exposición para los niños es la leche materna, debido a su lipofila, estas sustancias tienden a bioacumularse en tejido graso. Su persistencia, bioacumulación y toxicidad pueden producir efectos nocivos en el medio ambiente.

c) *Pesticidas y metabolitos*

La organización para la agricultura y la alimentación de las naciones unidas (FAO) y la organización mundial de la salud (OMS) definen el término pesticida, denominado también plaguicida, como cualquier sustancia o mezcla de ellas utilizada para prevenir o controlar cualquier especie de planta o animal indeseable, incluyendo sustancias destinadas a utilizarse como reguladoras de crecimiento de plantas, o como defoliantes o desecantes, durante la producción, almacenaje, transporte, comercialización o procesado de alimentos para el hombre o los animales.

Los pesticidas se pueden clasificar, entre otros, según las siguientes características:

- Tipo de organismo al que se desea controlar: insecticida, acaricida, herbicida, fungicida, rodenticida, etc.

- Grupo químico del principio activo: compuestos órganoclorados, órganofosforados, carbamatos, triazinas, derivados del ácido fenoxiacético, etc.
- Su persistencia en el medio ambiente: Persistentes, poco persistentes o no persistentes.
- Su toxicidad aguda: según la toxicidad aguda oral en ratones y ratas, clasificándose según la OMS y la agencia para la protección del medio ambiente (EPA) en: muy tóxico, moderadamente tóxico, poco tóxico y mínimamente tóxico.

d) *Compuestos perfluorados*

Los compuestos perfluorados constituyen una familia amplia de contaminantes, de origen antrópico, de la cual destacan el sulfonato de perfluorooctano (PFOS) y el ácido perfluorooctanoico (PFOA). Estas sustancias son muy estables, tienen una gran resistencia térmica, química y biológica. Son sustancias anfipáticas, es decir, se pueden disolver en agua y grasa. Por estas propiedades se utilizan en multitud de productos industriales, como cosméticos, productos textiles, revestimientos antiadherentes e impermeabilizantes, productos quita manchas, productos de limpieza, fitosanitarios, etc.

Algunos compuestos perfluorados como los PFOS y los PFAS son persistentes en el medio ambiente y se acumulan a lo largo de la cadena trófica. Además, estas dos sustancias son el compuesto final de la degradación de muchos compuestos perfluorados en el ambiente y dentro de los organismos vivos.

La alimentación, especialmente de los productos de pesca, es la principal vía de exposición del hombre a estos compuestos.

e) *Drogas de abuso*

En los últimos años se han identificado las drogas de abuso (DAs) como contaminantes ambientales. En la última década se han publicado los primeros estudios sobre la contribución de las drogas a la carga ambiental y varios estudios recientes han demostrado efectos negativos de las drogas de abuso sobre los organismos vivos (Chicharro y cols., 2014)

La falta de datos eco-toxicológicos no permite predecir o tener en cuenta los posibles efectos adversos de las DAs sobre la fauna. La evaluación de riesgos en los seres humanos tras la exposición a estos compuestos a través de otras vías como el agua potable y/o los alimentos, requiere un mayor conocimiento, siendo que actualmente no está disponible (EFSA, 2008).

f) *Fármacos*

Está demostrada la presencia de restos de productos farmacológicamente activos en las aguas residuales, así como su baja eliminación en los procesos de depuración convencionales. Así mismo se han detectado muchos de estos compuestos en las aguas superficiales y subterráneas, existiendo estudios sobre los efectos acumulativos y tóxicos en los peces. Además se cree que a medio o largo plazo podrían llegar a producir efectos perjudiciales sobre la fauna acuática y sobre la salud humana (Cortacans y cols., 2014).

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

Las investigaciones en este campo se vienen desarrollando hace ya 20 años; y si bien no se trata de compuestos persistentes, su constante utilización y vertimiento los hacen estar presentes en nuestro entorno. La principal fuente de ingreso al ecosistema de este tipo de compuestos son las descargas de aguas no tratadas y los efluentes de las plantas de tratamiento; y en lo que respecta a la presencia de productos y subproductos farmacéuticos en el agua para consumo humano, existe ciertamente un riesgo menor para la población, que debe ser estudiado. Actualmente las plantas de tratamiento, ya sean las plantas de tratamiento de agua para consumo humano, como las de aguas residuales, no están diseñadas para tratar y eliminar productos y subproductos farmacéuticos, por lo que conocer su presencia en nuestro entorno es fundamental (Henríquez, 2010).

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

Los productos farmacéuticos pueden ser clasificados de varias maneras, según su estructura química, su tipo de acción o su espectro de actividad (Basfar y cols., 2009). Dentro de las sustancias farmacológicamente activas que se detectan en las aguas, pueden considerarse como más representativos los siguientes grupos terapéuticos:

- Anti-inflamatorios y analgésicos: dentro de este grupo, los compuestos más empleados son el paracetamol, ácido acetilsalicílico, ibuprofeno y diclofenaco.
- Antidepresivos: los más frecuentes son las benzodiazepinas.
- Antiepilépticos: el más común es la carbamazepina.
- Antilipemiantes: se aplican, fundamentalmente, para bajar los niveles de colesterol en sangre en personas con arterioesclerosis. Los fármacos más frecuentes son los fibratos.
- β -bloqueantes: los más utilizados son el atenolol, propranolol y metopronol, entre otros.
- Antiulcerosos y antihistamínicos: comúnmente, se emplean la ranitidina y la famotidina, entre otros.
- Antibióticos: entre los más importantes se encuentran las tetraciclinas, macrólidos, β -lactámicos, penicilinas, quinolonas, sulfamidas, fluoroquinolonas, cloranfenicol, aminoglucósidos (ej. STR) y derivados imidazólicos.
- Otras sustancias: cocaína, barbitúricos, metadona, anfetaminas, opiáceos, heroínas y otros narcóticos (Prados, 2010).

El alto potencial en la proliferación continua de fármacos y productos de uso personal, medicamentos veterinarios, y de otros productos químicos antropogénicos, plantea desafíos substanciales y quizá insuperables para su regulación y control, desde el punto de vista de su evolución y del diseño de sistemas viables para su aplicación. Por otra parte, la investigación y el desarrollo de drogas y compuestos bioactivos evoluciona rápidamente y, en muchos casos, los mecanismos de acción son nuevos para los sistemas biológicos, por lo que las consecuencias en el ambiente son inciertas (Becerril, 2009). Además de los contaminantes químicos, el efluente secundario de las plantas de tratamiento de aguas residuales contienen a menudo varios microorganismos causantes de enfermedades, que requieren la desinfección en casos donde los seres humanos pueden entrar después en contacto con el agua (Manahan, 2006).

1.2.3 Los antibióticos como contaminantes emergentes

Alrededor de 3 000 medicamentos diferentes se emplean con diferentes propósitos, tales como: antibióticos, reguladores de lípidos, agentes citostáticos, beta-bloqueadores, analgésicos, antiinflamatorios y antiepilépticos, entre otros. Estos compuestos se transforman frecuentemente en el organismo y una mezcla de medicamentos y/o sus metabolitos son excretados por los pacientes. A su vez, los medicamentos se descargan en los hospitales y en las casas, a través de las aguas residuales (Ramos, 2009). Los antibióticos ocupan el tercer puesto en volumen de uso de todos los fármacos empleados en medicina humana, y el 70% de los empleados en medicina veterinaria (Díaz-Cruz y cols., 2003; Barceló y López 2008).

Los antibióticos están diseñados para tener un efecto que persiste después de su uso terapéutico, así si las cepas bacterianas que se encuentran en la naturaleza entran en contacto con estos antibióticos y se adaptan a ellos, pueden generar más resistencia, por lo que, en un futuro, estos fármacos no serán capaces de hacerles frente y se tendrán que aumentar las dosis, como ya se está haciendo o se tendrán que desarrollar fármacos nuevos (Díaz-Cruz y cols., 2003; Barceló y López 2008).

Hoy en día los contaminantes emergentes, como los antibióticos son ignorados además de no ser monitoreados. Sus efectos adversos en la vida acuática y humana han sido reportados en diversas investigaciones, es por eso que el impacto sobre la salud y medio ambiente ha promovido el estudio de estos contaminantes (García-Gómez y cols., 2011).

Las concentraciones a las que se han encontrado los antibióticos en aguas superficiales, como consecuencia de una eliminación incompleta en las plantas de depuración de aguas, o en aguas subterráneas, debido a la escasa atenuación que experimentan algunos compuestos durante la filtración a través de suelos, se sitúan normalmente en el rango de ng/L o µg/L, mientras que en suelos y sedimentos, en donde pueden persistir durante largos periodos de tiempo (la vida media del ácido clofibríco, por ejemplo, se estima en 21 años), alcanzan concentraciones de hasta g/Kg (Hernando y cols., 2006; Díaz-Cruz y Barceló, 2005).

1.3 Aminoglucósidos.

Los aminoglucósidos son antibióticos que fueron descubiertos en el transcurso de una intensa investigación llevada a cabo para encontrar agentes antimicrobianos activos frente a organismos Gram negativos. Los microbiólogos Waksman y Schatz (1943), examinaron multitud de actinomicetos de suelos para ver si producían compuestos antimicrobianos. En 1943 se aisló una cepa de *Streptomyces griseus* que produjo la STR. Tiempo después fueron descubiertas otras drogas relacionadas con la STR incluida la neomicina, la gentamicina, la tobramicina, la kanamicina y la amikacina (Winter, 1994).

Son antibióticos de espectro restringido que inhiben la síntesis de proteínas bacterianas en bacilos Gram-negativos y estafilococos. En ocasiones se utilizan en combinación con la penicilina. Todos los miembros de esta familia —en especial la neomicina— tienen mayor toxicidad que la mayor parte del resto de los antibióticos. Los efectos adversos asociados con la utilización prolongada de aminoglucósidos son frecuentes e incluyen lesión de la región vestibular del oído interno, pérdida auditiva y lesiones en el riñón (Pérez, 2005).

1.3.1 Mecanismo de acción y efectos.

Su acción bactericida se debe a la fijación en el receptor proteico subunidad 30S ribosomal, interfiriendo con la formación del complejo RNAm y subunidad 30S, inhibiendo de esta forma la síntesis de proteínas al alterar la lectura del DNA.

Su absorción en el organismo es buena y progresiva, no presenta ningún metabolismo en los mamíferos. El inicio de su acción es 1 y 1.5 horas después de su ingesta, y la duración de ésta es de 24 horas. Su eliminación por vía renal es del 80% - 90%, vía biliar 1%, y también se puede eliminar por leche y saliva. Su uso está indicado para tratar enfermedades como: tuberculosis, tularemia y peste, siendo los organismos sensibles a esta: micobacterias, colibacilos, *Hemophilus*, *Klebsiella*, *Brucella*, *Yersinia* y estreptococos (Palomino y Pachón, 2003).

Los aminoglucósidos no se absorben por el tracto gastrointestinal, de manera que hay que administrarlos por vía parenteral (Díaz y cols., 2010). Por vía intramuscular se absorben totalmente, obteniéndose la concentración máxima (Cmax) sérica entre 30 y 90 min. Por vía intravenosa se recomienda administrarlos mediante perfusión durante 15-30 min, y si la dosis es elevada (caso de mono dosis), el tiempo de perfusión se debe incrementar hasta 30-60 min para evitar la aparición de bloqueo neuromuscular. No se recomienda su administración en las cavidades pleural y peritoneal por la posibilidad de absorción rápida y toxicidad subsiguiente (Palomino y Pachón, 2003).

Los aminoglucósidos muestran un patrón de actividad bactericida que es dependiente de la concentración del antimicrobiano, pero no del tiempo de exposición de las bacterias. Por tanto, el objetivo del tratamiento con aminoglucósidos debe ser incrementar al máximo la Cmax administrando la dosis más alta posible que permita el límite de toxicidad. Los estudios clínicos han comprobado que existe una relación directa entre la Cmax del aminoglucósido y la respuesta terapéutica en el tratamiento de la bacteremia y la neumonía por bacilos Gramnegativos y que existe una graduación dosis-respuesta entre el cociente de concentración máxima y concentración inhibitoria mínima (Cmax/CIM) y la respuesta clínica (Palomino y Pachón, 2003). Asimismo, se ha constatado que un cociente $C_{max} / CIM \geq 10$ consigue el máximo efecto bactericida y disminuye la selección de subpoblaciones resistentes (Shakil y cols., 2008).

1.3.2 Uso de antibióticos aminoglucósidos.

Los antibióticos aminoglucósidos se utilizan solamente para tratar infecciones graves en enfermos hospitalizados. Son muy efectivos frente a ciertas infecciones renales causadas por bacterias Gram negativas aerobias. Su uso está limitado, principalmente, por su elevado grado de toxicidad. Todos los aminoglucósidos pueden dañar de forma irreversible el oído interno y el riñón, si los niveles sanguíneos aumentan demasiado y persisten durante un largo periodo de tiempo. Otra desventaja es la elevada frecuencia con la que surgen cepas resistentes a estas drogas. La resistencia a la STR se desarrolla con tanta frecuencia que la droga debe utilizarse siempre en combinación con otro agente antimicrobiano (Shakil y cols., 2008).

1.3.3 Efectos tóxicos

A pesar de ser varios los estudios que se han realizado para lograr establecer una asociación directa entre los factores de riesgo y el desarrollo de oto o nefrotoxicidad, no existe una

fórmula (nomograma) con la cual podemos predecir el grado de daño que desarrollará cada paciente. Sin embargo, en dichos estudios se han encontrado correlaciones significativas entre ciertas condiciones (tanto de los aspectos del paciente como de los aspectos farmacológicos). Los efectos adversos graves más frecuentes de los aminoglucósidos son la ototoxicidad y la nefrotoxicidad (Rodríguez- Álvarez, 2002).

A) Ototoxicidad

- La vida media de los aminoglucósidos es cinco veces mayor en los líquidos óticos (endolinfa y perilinfa) que en plasma.
- Ocurre por la destrucción directa de las células sensoriales, tanto vestibulares como cocleares, las cuales son altamente sensibles al daño por aminoglucósidos. El daño coclear se manifiesta con pérdida de la audición (la percepción de los sonidos del rango de alta frecuencia es la primera en ser afectada).
- El daño vestibular se manifiesta con vértigo y/o ataxia. La ototoxicidad puede ocurrir días o semanas después de suspender el tratamiento (Gilbert, 2000).
- El daño es permanente.
- La incidencia está directamente relacionada con la dosis diaria y la duración del tratamiento. Se ha descrito una relación entre el tiempo de duración de la administración del medicamento (mayor de 2 semanas) y la aparición de ototoxicidad (Chambers, 2001).
- La administración conjunta de ácido etacrínico, furosemida, vancomicina o amfotericina B aumenta el riesgo de ototoxicidad (Cunha, 1990)

B) Nefrotoxicidad

- El riesgo de desarrollo de nefrotoxicidad por aminoglucósidos en población hospitalaria abierta es de 5-10% (Mingeot-Leclercq y Tulkens, 1999).
- El daño renal está determinado por dos condicionantes, principales: el potencial intrínseco del fármaco para dañar las estructuras subcelulares y la cantidad de fármaco acumulado en la corteza renal (Nordström y cols., 1990).

Otros efectos adversos menos frecuentes, aunque de igual seriedad que los anteriores, son el bloqueo de la placa neuromuscular y las reacciones de hipersensibilidad.

C) Bloqueo de la placa neuromuscular.

- Puede resultar cuando se administra un aminoglucósido en dosis altas o en dosis múltiples fraccionadas, con un tiempo de administración corto, incrementando los niveles séricos (y con toxicidad) rápidamente.
- Es el resultado de la inhibición de la liberación presináptica de acetilcolina y un bloqueo de los receptores post-sinápticos de acetilcolina.
- Se ha descrito bloqueo de la placa neuromuscular en pacientes tratados con neomicina, STR, kanamicina, tobramicina, gentamicina, amikacina y netilmicina. El riesgo de bloqueo de la placa neuromuscular aumenta en pacientes que reciben simultáneamente succinilcolina, y agentes similares (L'Hommedieu y cols., 1988).

- Existe un reporte de fatiga neuromuscular por gentamicina en un neonato de término nacido de una madre con preclampsia tratada con sulfato de magnesio (Giamarellou y Antoniadou, 2001).
- Clínicamente se caracteriza por rigidez de la musculatura respiratoria, parálisis flácida y midriasis.
- El gluconato de calcio o la neostigmina pueden ser utilizados como antídotos para el bloqueo de la placa neuromuscular (Mattie y cols., 1989).

D) Reacciones de hipersensibilidad.

Es muy poco frecuente con las preparaciones de uso parenteral, pero en pacientes que reciben preparaciones tópicas de neomicina, más del 8% desarrollan erupción o irritación cutánea (Rodríguez - Álvarez, 2002).

1.3.4 Estreptomina

La STR fue el primer antibiótico efectivo contra la tuberculosis. Actúa contra bacterias Gram negativas y diversas micobacterias, entre ellas la *Mycobacterium tuberculosis*. La estructura de la STR es la siguiente:

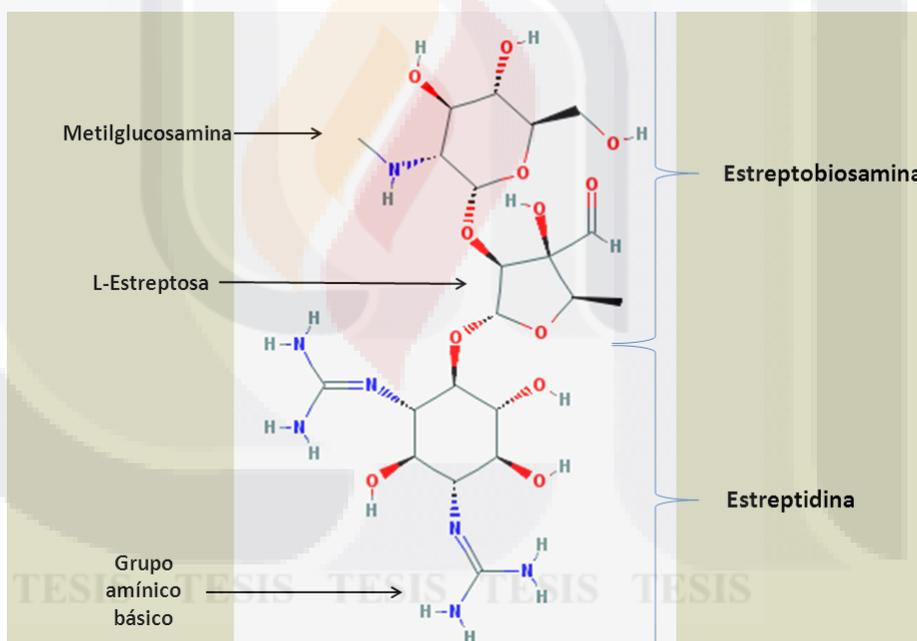


Figura 2. Estructura química de la STR
(Fuente: http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/summary/summary.cgi?cid=5999&loc=ec_rcs)

La STR se administra por vía intramuscular o intravenosa variando la dosis entre 0.5 a 1 g diarios. Se administra también en el tratamiento de enfermedades como: tularemia (producida por *Francisella tularensis*), brucelosis (Fiebre de Malta) por bacterias del género *Brucella*, endocarditis bacteriana (producida por bacterias Gram negativas y positivas), y peste producida por *Yersinia pestis* (US. National library of medicine., 2013).

Este antibiótico permanece por bastante tiempo en los riñones luego de la administración parenteral y en el lugar de la inyección. En cambio, si la vía utilizada es la oral, permanece poco tiempo en los órganos por ser muy escasa su absorción (Pérez, 2005).

Existen diferentes mecanismos de resistencia frente a la STR: inactivación enzimática en el cual se sintetizan enzimas que catalizan la inactivación; alteración del ingreso, por diversos mecanismos como las bombas de extrusión o el cambio en la conformación de la molécula (por ejemplo, añadir una adenina a la STR impidiendo así el paso de ésta al interior de la bacteria); alteración del sitio de unión al ribosoma, se produce la mutación de la proteína S12 (Extension Toxicology Network, Cornell University, 2013).

La STR tiene además otros usos habituales, como plaguicida para controlar plagas bacterias en los cultivos agrícolas, como puede ser el caso del fuego bacteriano, enfermedad producida por *Erwinia amylovora*. En la actualidad existen unos 16 productos plaguicidas con STR registrados (US. National library of medicine., 2013).

1.4 Métodos de detección de contaminantes emergentes

Si se toma una muestra desconocida del ambiente (agua, suelo o aire incluso), una porción considerable de sus componentes orgánicos no podrá ser identificada, debido a limitaciones analíticas, ya que en la mayoría de los casos no está disponible un estándar para comparar el compuesto puro con el que se encuentra en la muestra. En este caso, la toxicidad se puede asociar con los compuestos que es posible identificar y analizar (analitos), así como con los compuestos que permanecen en la muestra, pero que por limitaciones del análisis químico no es posible identificar (Becerril, 2009).

El primer paso para dar una respuesta a algunas de las muchas incógnitas que plantean los contaminantes emergentes es desarrollar métodos analíticos para la determinación de estos contaminantes en matrices ambientales (aguas subterráneas, superficiales, potables, sedimentos, suelos, etc.). El fin último de estos estudios es identificar los compuestos y/o aéreas más preocupantes, sobre los cuales poder actuar para mejorar la calidad del agua y otros recursos naturales, así como optimizar las explotaciones de los recursos hídricos disponibles, o ambos (Barceló, López de Alda, 2012)

La medición de la tasa de degradación natural de los compuestos emergentes en aguas superficiales y efluentes de desecho son esenciales para lograr una asociación entre los riesgos y el hecho de que algunos de estos compuestos están diseñados para ser biológicamente activos en concentraciones traza. Para muchos de estos micro- contaminantes, no existen métodos analíticos disponibles, ya que no son capaces de medir concentraciones traza. La determinación de estos compuestos en aguas residuales es difícil debido a la alta salinidad del medio. Al mismo tiempo, la identificación química de los disruptores endocrinos es prácticamente imposible debido a que su evaluación en muestras ambientales complejas requiere la aplicación de métodos integrativos como análisis químicos combinados con ensayos biológicos (Petrovic y cols., 2003).

Métodos analíticos clásicos como, cromatografía de gases acoplada a espectrofotometría de masas (GC-MS), Cromatografía líquida acoplada a espectrofotometría de masas en tándem (LC-MS-MS) y cromatografía líquida de alta resolución (HPLC, por sus siglas en inglés), son

empleados usualmente para la determinación de estos compuestos, sin embargo, estas técnicas presentan varias desventajas:

- i. Son difíciles de aplicar, caros, y se requiere un tiempo prolongado para obtener resultados
- ii. Se necesitan procedimientos específicos para medir los compuestos de interés en muestras complejas.
- iii. Se requieren grandes volúmenes de muestra.
- iv. Se requiere purificación de la muestra (Caliman y Gavrilescu, 2009)

Los grupos de fármacos que en la actualidad se consideran más peligrosos y demandan investigación son:

- Los antibióticos, por la posibilidad de que se desarrollen cepas bacterianas resistentes que hagan que estos compuestos resulten ineficaces para el fin para el que fueron diseñados (Díaz-Cruz y cols., 2003).
- Los medios de contraste en rayos X, porque son muy persistentes, no resultan eliminados en las plantas de tratamiento, y alcanzan fácilmente las aguas subterráneas por percolación a través de suelos.
- Los citostáticos, porque debido a su gran potencia farmacológica, exhiben con frecuencia propiedades carcinogénicas, mutagénicas o embriogénicas, y, al igual que los anteriores, parecen presentar una eliminación imperceptible o insignificante en los procesos de depuración.
- Los estrógenos, utilizados fundamentalmente como anticonceptivos y para el tratamiento de desórdenes hormonales tan frecuentes como la menopausia, que son los responsables en muchos casos de la aparición de fenómenos de feminización, hermafroditismo, y disminución de la fertilidad (Postigo y cols., 2010).

Las técnicas que más se utilizan hoy en día para la determinación de fármacos en matrices ambientales son HPLC y HPLC acoplado a masas (HPLC-MS) (Petrovic y cols., 2005; Roberts y Thomas, 2006). Estos métodos requieren mucho trabajo, el equipo es complejo, además de que los reactivos y el equipo son costosos. Recientemente se han comenzado a utilizar métodos inmunoquímicos, aunque estos se han enfocado principalmente a la detección de hormonas.

Varios métodos para la detección de antibióticos residuales han sido establecidos, tales como microbiológicos, cromatográficos y ensayos inmunológicos. Sin embargo, los estudios microbiológicos consumen mucho tiempo, cuentan con baja sensibilidad para diversos grupos de antibióticos y no permiten la identificación de las sustancias.

Los métodos cromatográficos son caros y son usados de manera restringida solo para fines confirmatorios. Los métodos inmunológicos basados en enzimas (ELISA y en fluorescencia (FIA) son excelentes herramientas exploratorias debido a su alto rendimiento, facilidad de uso y portabilidad (Bang-Ce y cols., 2008).

1.4.1 Métodos Inmunoquímicos

Estos engloban a todas aquellas herramientas analíticas que utilizan como principio básico de medida la interacción antígeno-anticuerpo. La ventaja que tienen estos métodos que utilizan la interacción específica entre un anticuerpo y un antígeno determinado, es que a los anticuerpos se les puede unir diferentes moléculas que nos ayudan a su detección sin perder su afinidad hacia el antígeno y así utilizarlos en diversas técnicas unidos a enzimas (o ELISA), a fluorocromos (ensayos inmunofluorométricos), con elementos radiactivos (ensayos inmunoradioactivos) o a sustancias quimioluminiscientes (LIA) (Chávez y cols., 2008; Bailón, 2009).

Estos métodos son muy selectivos, gracias a la gran especificidad de la unión antígeno-anticuerpo y, además, presentan otras ventajas como son la rapidez, la facilidad de ejecución, la gran sensibilidad, la reducción del tiempo de análisis, uso de instrumental poco complejo, se requiere menor cantidad de muestra, así como el bajo costo necesario para su aplicación (Bailón, 2009)

El uso de anticuerpos en farmacología hace que sea posible llevar a cabo el seguimiento de drogas y aumenta la eficacia y la seguridad del tratamiento. Los inmunoquímicos aplicados en pruebas farmacológicas, por ejemplo, el ELISA, no requieren instrumentos de registro caros, son muy sensibles y específicos (en comparación con los métodos microbiológicos), y evitan una larga preparación de la muestra (en comparación, por ejemplo con el HPLC, la cromatografía de gases, o la electroforesis capilar de zona) (Staroverov y cols., 2008). Los métodos de cromatografía de gases usualmente tienen falta de sensibilidad y requieren de una compleja preparación de muestra (limpieza de la cámara, enriquecimiento preliminar y procesos derivados), mientras que los métodos de HPLC necesitan continuamente pasos de limpieza, así como una extracción en fase sólida, además de que no pueden ser usados para la medición de un gran número de muestras (Fang-Shi y cols., 2007).

Recientemente, los métodos inmunoquímicos, han sido utilizados para la detección de diferentes sustancias, debido a que son rápidos, simples, sensibles, y especialmente utilizables para procesar una gran cantidad de muestras y para la detección en el sitio (Fang-Shi y cols., 2007).

1.5. Inmunología básica

1.5.1 Anticuerpos

Un anticuerpo se define como una inmunoglobulina (Ig) capaz de una combinación específica con el antígeno que ha causado su producción en un animal susceptible. Ellos son producidos en respuesta a la invasión de moléculas foráneas en el cuerpo. Los anticuerpos existen como una o más unidades en forma de Y, compuesta por cuatro cadenas polipeptídicas. Cada Y contiene dos copias idénticas de una cadena pesada (HC, heavy chain), y dos copias idénticas entre sí de una cadena ligera (LC, light chain), llamadas así por sus pesos moleculares relativos que son de aproximadamente 50kDa la cadena pesada y de cerca de 25kDa la cadena ligera. Estas cadenas se mantienen unidas mediante enlaces disulfuros intercatenarios. Estas cadenas pueden separarse por reducción de los enlaces S-S y acidificación (Calderón, 2007).

ESTRUCTURA DE LA UNIDAD BÁSICA QUE FORMA LOS ANTICUERPOS

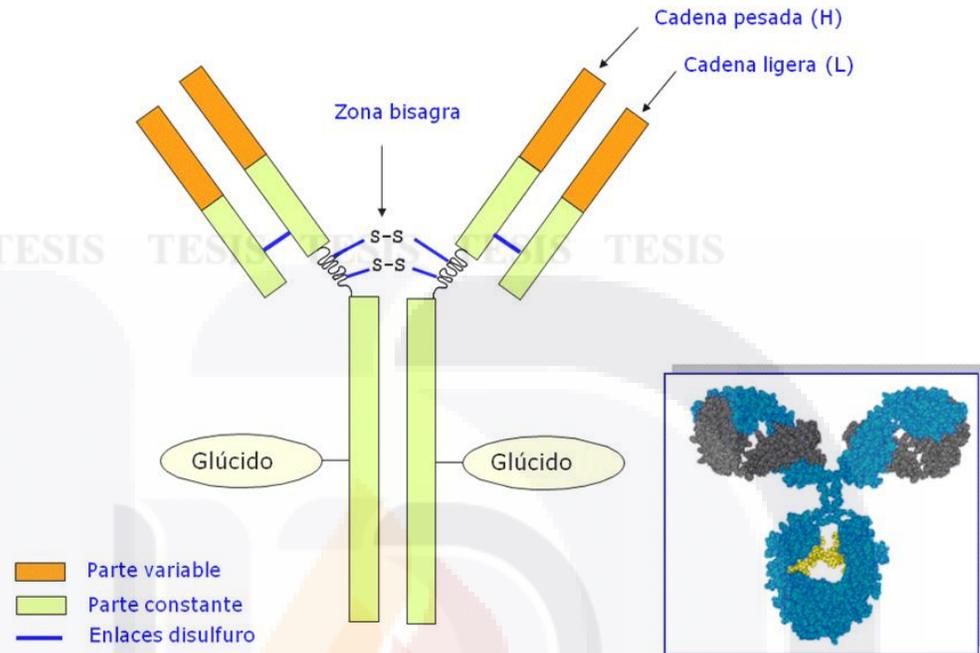


Figura 3. Estructura de la unidad básica que conforma a los anticuerpos
 (Fuente: http://web.educastur.princast.es/proyectos/biogeno_ov/2bch/B5_MICRO_INM/T52_INMUNOLOGIA/informacion.htm)

La estructura básica de cualquier Ig consiste en 4 cadenas polipeptídicas unidas entre sí por puentes disulfuro. Tanto las cadenas pesadas como ligeras tienen series de unos 110 aminoácidos de longitud que se pliegan independientemente en un motivo globular común denominado dominio de las Ig. Estos dominios suelen mantenerse “cerrados” mediante puentes S-S (puentes disulfuro). Otras muchas moléculas de importancia en inmunología tienen esa estructura, formando lo que se denomina la superfamilia de las Ig (Iáñez, 2014).

Las cadenas pesadas y ligeras de las Ig se componen de regiones variables (V) amino terminales y regiones constantes (C) carboxi terminales. La región V de una cadena H (V_H) se asocia con la región V de una cadena L (V_L) para formar un sitio de unión al antígeno (por lo que en una molécula de Ig puede haber 2 sitios de unión a Ag.). Los dominios de la región C de las cadenas pesadas interaccionan con otras moléculas y células efectoras del sistema inmune, por lo que el reconocimiento antigénico y las funciones efectoras de las moléculas de anticuerpo están separadas espacialmente en la región V y la región C, respectivamente (García-Cozar y cols., 2014):

- Región Constante (C_L y C_H) que no varía mucho entre anticuerpos de la misma clase y subclase (constituyen el isotipo y el alotipo, como ya veremos).

- Región variable (V_L y V_H) que es diferente entre los diferentes anticuerpos (constituyen el idiotipo) (Melchers, 2005).
- Las 4 cadenas de las Ig se unen en forma de Y con una región central bisagra. Con proteasas vegetales (pepsina, papaína) se liberan dos fragmentos proteicos:
 - El tallo se denomina Fragmento cristalizante (F_c) y es la región constante por donde el anticuerpo puede unirse a la célula con un receptor específico.
 - La parte bifurcada de la Y constituye el fragmento denominado Fragmento de unión al antígeno (F_{ab} : fragment antigen-binding). Es la zona más variable y se une a cada determinante antigénico compatible.
 - Como ya hemos dicho, la estructura se mantiene tanto por puentes S-S entre cadenas (4) como intracatenarios, formando los bucles denominados dominio de inmunoglobulina.
 - En los dominios variables de las Ig existen 3 regiones que son especialmente variables de unas Ig a otras y se denominan regiones determinantes de la complementariedad (CDR) o regiones de hipervariabilidad. Con el plegamiento espacial, las regiones CDR se proyectan hacia el exterior y forman la superficie de interacción con el Ag (Galaktionov, 2004).

Los anticuerpos pueden ser divididos en cinco clases: IgG, IgM, IgA, IgD e IgE, basado en la región constante de la cadena pesada. Las cadenas ligeras de cualquier anticuerpo pueden ser clasificadas como tipo kappa (κ) o lambda (λ), basadas en pequeñas diferencias estructurales polipeptídicas en sus regiones constantes; sin embargo, las regiones constantes de las cadenas pesadas determinan la subclase de cada anticuerpo (Calderón, 2007).

Las subclases de anticuerpos difieren en el número de puentes disulfuro y la longitud de la región “bisagra”. El anticuerpo más comúnmente usado en ensayos inmunoquímicos es el de la clase IgG debido a que son las inmunoglobulinas más abundantes en la circulación en el suero, la región bisagra expuesta tiene estructura extendida debido al alto contenido de prolina, por lo que es vulnerable al ataque proteolítico; en consecuencia, es muy fácil escindir la molécula en el laboratorio mediante papaína, para obtener dos fragmentos $F(ab)$ idénticos, cada uno con un único sitio de combinación para el antígeno, y un tercer fragmento, F_c , que carece de capacidad para fijar el antígeno (García-Cozar y cols., 2014).

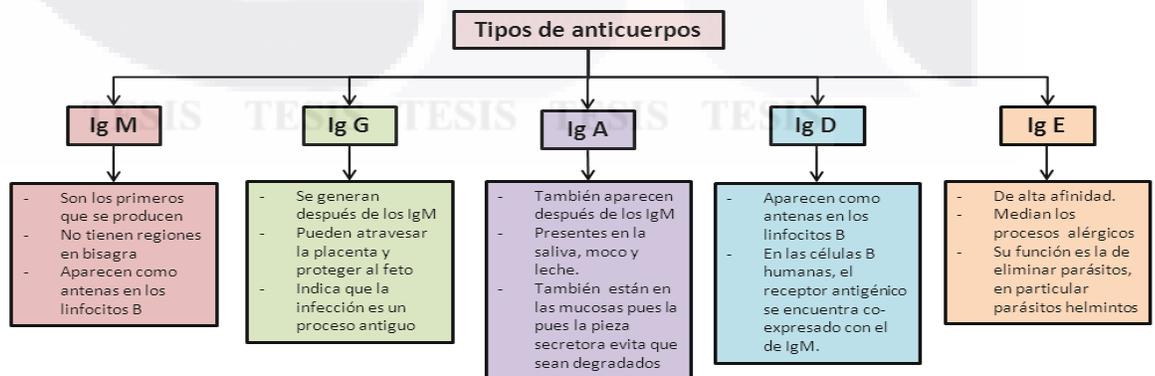


Figura 4. Diferentes clases de inmunoglobulinas.

1.5.1.1. Inmunoglobulinas G

La clásica forma Y de un IgG está compuesta de dos variables: brazos antígeno específico F(ab), los cuales son críticos para la unión del antígeno, y la “cola” constante Fc que sirve como “mango” para la manipulación del anticuerpo durante muchos procedimientos inmunoquímicos. El número de regiones Fab en un anticuerpo, depende de su subclase, y determina la valencia del anticuerpo (Calderón, 2007).

Son las inmunoglobulinas más abundantes y representan más del 70 % de las Igs séricas totales (5-10mg/ml); las diferentes subclases (IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4) se presentan en proporciones muy diferentes (IgG1, 20-30% IgG2, 5-8% IgG3 y 1-3% IgG4. La cantidad de diferentes subclases IgG presentes en el torrente sanguíneo varía dependiendo de la edad), se sintetiza tardíamente tras un primer contacto con el antígeno, sin embargo, tras un segundo contacto la mayoría de las Igs formadas pertenecen a esta clase (Respuesta Secundaria) (Calderón, 2007).

1.6.2 Antígenos e inmunógenos

La definición clásica de inmunógeno es cualquier sustancia que induce una respuesta inmune cuando es introducida dentro de tejidos de animales susceptibles y que son capaces de combinar con los anticuerpos específicos formados. Los antígenos se definen como cualquier sustancia que se une de forma específica a una molécula del anticuerpo o receptor celular T. De tal manera que todos los inmunógenos son antígenos, pero no todos los antígenos son inmunógenos. Los inmunógenos son generalmente de alto peso molecular y comúnmente son proteínas o polisacáridos. Polipéptidos, lípidos, ácidos nucleicos y otras moléculas pueden también funcionar como inmunógenos. La respuesta inmune puede también ser generada contra sustancias pequeñas, llamadas haptenos, solo si estos están acoplados a una proteína acarreadora, como la albúmina de suero bovino (BSA) u otras matrices sintéticas. Una variedad de moléculas como drogas, azúcares simples, aminoácidos, pequeños péptidos, fosfolípidos o triglicéridos pueden funcionar como haptenos. Así, cualquier sustancia foránea será identificada por el sistema inmune y evocará la producción de un anticuerpo específico. Sin embargo, esta respuesta inmune específica es altamente variable y depende mucho en parte del tamaño, estructura y composición de los antígenos. Los antígenos que desarrollan una fuerte respuesta inmune se dice que son altamente inmunogénicos (Iáñez, 2014).

Las partes de las regiones hipervariables del anticuerpo que contactan con el antígeno se denominan paratopos y la región de un antígeno que puede específicamente unirse a un anticuerpo es llamado epítotope. Para que exista una eficiente interacción entre el antígeno y el anticuerpo, el epítotope debe estar fácilmente disponible para la unión. Si la molécula blanco es desnaturalizada, por ejemplo por la fijación, cambios de pH o durante la preparación para el gel de electroforesis, el epítotope puede ser alterado y esto puede afectar su habilidad para interactuar con un anticuerpo (Calderón, 2007).

Características de un buen inmunógeno incluyen:

- Áreas de estabilidad estructural dentro de la molécula

- Un peso molecular mínimo de 8000 a 10000 Daltons, aunque los haptenos con pesos moleculares tan bajos como 200 Da han sido usados en presencia de proteínas acarreadoras.
- La habilidad de ser procesado por el sistema inmune.
- Regiones inmunogénicas accesibles al mecanismo formado por el anticuerpo
- Elementos estructurales que sean suficientemente diferentes al huésped
- Para antígenos peptídicos, regiones que contengan por lo menos 30% de aminoácidos inmunogénicos. Isómeros L y los aminoácidos fenilalanina o triptófano aumentan considerablemente las posibilidades de un reconocimiento antigénico eficiente (García, 1997).
- Para antígenos peptídicos, significante hidrofobicidad o residuos cargados.

Las proteínas son las moléculas más inmunogénicas, mientras que los carbohidratos, los lípidos y ácidos nucleicos son poco inmunogénicos. En general, mientras más purificado y menos heterogéneo sea un antígeno, mayor será la probabilidad de obtener el anticuerpo deseado con alta especificidad. El principal problema con las preparaciones de antígenos heterogéneas es la falta de especificidad deseada en el antisuero resultante, ya que algunas moléculas contaminantes de la preparación son frecuentemente más antigénicas que el inmunógeno de interés y el antisuero resultante podría tener mayor especificidad hacia las moléculas contaminantes que hacia la sustancia de interés (Abbas y cols., 2008).

Muchos antígenos importantes, son poco reactivos cuando se inyectan en seres vivos en una forma soluble. Sin embargo, es posible mejorar significativamente su inmunogenicidad por conjugación a una proteína portadora altamente inmunogénica tal como el toxoide tetánico (TT) o la hemocianina de lapa californiana (KLH).

La magnitud de esta respuesta inmune depende también de la dosis del antígeno administrada. Dosis muy bajas o muy altas de antígeno no estimulan respuestas inmunes o inducen un estado de tolerancia o ausencia de respuesta inmune (anergia). En líneas generales, los conejos se inmunizan con dosis entre 10 y 1,000 µg, mientras que los ratones son inmunizados con dosis entre 1 y 100 µg (Abbas y cols., 2008).

1.5.3 Interacción Antígeno – Anticuerpo

Una de las propiedades más características de los anticuerpos, es su capacidad de reaccionar específicamente con los antígenos inductores de su producción (antígenos homólogos). La reacción antígeno-anticuerpo ocurre en dos etapas. En la primera sucede la interacción físico-química entre las moléculas del antígeno y el anticuerpo, y en la segunda esta interacción se hace manifestar por la formación de un precipitado, cuando el antígeno es soluble, o de un aglutinado, cuando el antígeno es particulado. En el caso de los haptenos simples, su interacción con el anticuerpo homólogo ocurre, pero no hay manifestación visible de la interacción. Es un fenómeno que depende de la complementariedad química de los reactantes. Esta, depende a su vez de la conformación de las moléculas y de la carga de sus elementos constituyentes (Rojas-Espinosa, 2006).

Esta unión compromete varios aspectos, tales como las estructuras proteicas de las moléculas, las fuerzas de unión, que en su mayoría no son covalentes sino de tipo puentes de

hidrogeno, las uniones electrostáticas y las fuerzas de Van der Waals. Este tipo de uniones, aunque es débil, aumenta su capacidad de unión entre mayor número de enlaces se posean. Así pues, la unión antígeno-anticuerpo es reversible, pero bajo ciertas condiciones (Florentino y cols., 1994).

1.5.4 Anticuerpos policlonales

Los anticuerpos policlonales son particularmente valiosos como reactivos biológicos para el estudio de proteínas, células y tejidos cuando se utilizan en técnicas muy diversas, tales como: ELISA, inmunofluorescencia e inmunoblot (Coligan y cols., 1992).

La selección del animal para la producción de anticuerpos policlonales depende de la cantidad de antisuero deseada, y de la experiencia previa con el inmunógeno. En el laboratorio se inmunizan frecuentemente conejos puesto que son fáciles de mantener, responden bien frente a un amplio rango de antígenos y es posible obtener hasta 25 ml de suero de cada desangrado sin efectos dañinos para el animal (Coligan y cols., 1992). La constitución genética del animal influye sobre el tipo y grado de respuesta inmune del animal inmunizado. Los genes que codifican el complejo mayor de histocompatibilidad (MHC), los receptores de antígeno de los linfocitos T y B y otros genes involucrados en los mecanismos inmunoreguladores juegan un papel fundamental en la respuesta inmune. Por tal razón se suele inmunizar de dos a tres conejos (Delves, 1997).

La producción de anticuerpos policlonales depende en gran medida de la calidad, cantidad y pureza del inmunógeno así como la especificidad y sensibilidad del ensayo donde se desee utilizar el anticuerpo (Abbas, y cols. 2008).

Algunas de las propiedades de anticuerpos policlonales son:

- Los anticuerpos policlonales frecuentemente reconocen múltiples epítopes haciéndolos más tolerantes a pequeños cambios en la naturaleza del antígeno. Son frecuentemente la opción preferida para la detección de proteínas desnaturalizadas.
- Pueden ser generados en una variedad de especies, incluyendo conejos, cabras, ovejas, asnos, gallinas y otros, dándole al usuario muchas opciones en el diseño experimenta.
- Los anticuerpos policlonales son a veces usados cuando la naturaleza del antígeno en una especie no estudiada no se conoce.
- Los anticuerpos policlonales al unirse a múltiples epítopes generalmente proveen una detección más robusta (Calderón, 2007).

1.5.5 Producción de anticuerpos

1.5.5.1 Inmunización

Las respuestas inmunitarias específicas se adquieren habitualmente tras la exposición de un individuo a un agente extraño. Los mecanismo que actúan en este tipo de respuestas son de dos tipos (celular y humoral) dependiendo del componente del sistema que participa principalmente en la respuesta. Cuando la respuesta inmunitaria específica actúa

mayoritariamente mediante la producción de anticuerpo que reconoce y elimina los agentes extraños (antígenos), se recibe el nombre de inmunidad humoral (Salinas, 2014)

Los métodos de inmunización experimental son muy variados y dependen del uso que se le quiera dar a los anticuerpos producidos (Abbas y cols., 2008). En general, al establecer un protocolo de inmunización experimental se debe tomar en consideración un conjunto de factores que afectan el tipo y la magnitud de la respuesta humoral del animal inmunizado. Estos factores son los siguientes: la especie del animal utilizado, la constitución genética del animal, el tipo, la dosis y la ruta de administración del inmunógeno, el número de inmunizaciones (refuerzos) y el uso de adyuvantes (Delves, 1997).

Se pueden emplear vías tales como la oral, nasal, intramuscular intravenosa, intracardiaca, intraperitoneal, intradérmica, subcutáneas, etc. El estado físico del antígeno (particulado o soluble) debe tenerse en cuenta para escoger la ruta de inmunización: es decir, los antígenos particulados por lo general son introducidos por vía intravenosa, mientras que los antígenos en solución pueden introducirse por otras vías como la intramuscular, la intraperitoneal, la subcutánea o la intradérmica. Con estas dos últimas vías preferentemente se utiliza al antígeno acompañado con adyuvante (Manual de laboratorio de inmunología, 1998).

1.5.5.2 Adyuvantes

Los adyuvantes son sustancias o procedimientos que aceleran, prolongan o potencian la respuesta inmune específica contra los antígenos inoculados. Son sustancias inmunomoduladoras que constituyen una familia muy heterogénea si se toman en consideración su origen, naturaleza química y actividad biológica específica. Se les atribuyen funciones fundamentales: la estimulación de la resistencia no específica del huésped contra las enfermedades infecciosas y el cáncer; y, por otra parte, la potenciación de la inmunogenicidad de las vacunas comerciales y de la respuesta de los animales de laboratorio durante la inmunización experimental con vistas a la producción de antisueros (Gupta y cols., 1993). Son sustancias o preparados que incorporados al antígeno o inyectados simultáneamente con él, hacen más efectiva la respuesta inmune. Con su empleo se logra una economía de antígeno y de tiempo, así como un mayor nivel de anticuerpos específicos (Correa y Mandujano, 2000). Es importante que los protocolos de inmunización, cuenten con por lo menos con dos refuerzos de la inmunización, esto debido a que la producción de inmunoglobulinas del isotopo IgG se sintetiza principalmente, tras un segundo contacto con el antígeno (Davies y Chacko, 1993).

El adyuvante incompleto de Freund (FIA) es una mezcla de aceite mineral (Drakeol, Bayol o Nujol) con un detergente (Falba, Arlacel, Aquafor) en diferentes proporciones. Por ejemplo, Arlacer-Drakeol (1:9); Arlacel-Bayol (3:17). El adyuvante completo de Freund (FCA) contiene además del aceite y el detergente, una micobacteria inactivada (*M. tuberculosis*, *M. bovis* u otras) cuya cantidad es variable (de 1 a 5 mg de la bacteria, peso seco, por cada mL de la mezcla incompleta de Freund). Este ha sido utilizado durante más de 50 años en la producción de antisueros en animales y es empleado con frecuencia cuando se dispone de cantidades limitadas de antígenos o cuando presentan una baja inmunogenicidad. La gravedad de su toxicidad fue reconocida inmediatamente, pero los esfuerzos por encontrar opciones igualmente efectivas y menos tóxicas no han resultado del todo exitosos (Guerrero y Gattas, 1982).

1.5.5.3 Portadores inmunogénicos

Tal como se ha mencionado anteriormente el portador o carrier, es un complejo proteico grande, usados para unirse con péptidos u otros haptenos, los cuales no son suficientemente grandes o complejos para generar por si mismos una respuesta inmune. Por lo tanto, el portador confiere inmunogenicidad al hapteno conjugado, resultando en la producción de anticuerpos frente a epítopes del hapteno y el portador. Este tipo de proteínas se escogen basándose en su inmunogenicidad, solubilidad y disponibilidad de grupos funcionales en los cuales se puede conjugar el hapteno. Las dos más comúnmente usados son la hemocianina de lapa californiana (KLH) y la albumina de suero bovino (BSA).

En una respuesta inmune típica los anticuerpos son producidos por linfocitos B (normalmente en conjunción con células T cooperadoras y células presentadoras de antígeno) (Kolaskar A. y Tongaonkar P., 1990). En el sistema clásico hapteno-portador, los linfocitos T reconocen al portador y cooperan en la activación de las células B hapteno específicas, las cuales inducen una respuesta de anticuerpos específicos contra el hapteno (Cultek S.L.U, 2013)

La respuesta de anticuerpo se dirigirá contra epítopes de ambas moléculas, portador y hapteno. Es muy importante planificar cuidadosamente como los anticuerpos específicos al hapteno van a ser identificados y purificados del suero inmunizado final. Para crear el mejor inmunógeno, puede ser importante preparar el conjugado con diferentes portadores y con diferentes coeficientes o índices de unión hapteno-portador (Harris y Markl, 1999).

1.5.5.3.1 Hemocianina de lapa californiana o KLH

El KLH tiene una función natural como inmunoadyuvante. Es una proteína respiratoria de las lapas gigantes que viven en aguas costeras poco profundas del mar. Es una mezcla de dos isoformas inmunológicamente distintas, ambas conformadas por dodecámeros a partir de polipéptidos de 400 kDa (Qing-Tong y cols., 2011).

Es ampliamente usado como portador por su gran peso molecular (agregados de 450,000-8,000,000 kDa compuestos de subunidades de 350 y 390 kDa) y muchos grupos lisina disponibles. Es una proteína que contiene cobre y pertenece a un grupo de proteínas llamadas hemocianinas que se encuentran en artrópodos y moluscos. Se aísla del molusco *Megathura crenulata*. Los cationes divalentes ayudan en la formación de grandes agregados, estos agregados no se disocian con la simple extracción de los cationes divalentes de la suspensión (Harris y Markl, 1999).

Debido a su tamaño, KLH muchas veces es poco soluble en agua, pero esto no afecta a su inmunogenicidad. La manipulación del KLH en solución puede ser difícil. Incluso retirando las partículas insolubles de la solución de KLH, es difícil determinar la cantidad de KLH presente. Las soluciones de KLH son turbias, por lo que las lecturas de absorbancia a 280 nm son imprecisas (Qing-Tong y cols., 2011). Es el portador más frecuentemente seleccionado para la inmunización de vertebrados, muestra una mayor inmunogenicidad en comparación con BSA debido a su mayor peso molecular y al alto número de aminas primarias para el acoplamiento de los haptenos. El KLH altamente activado muestra más de 400 grupos de unión por molécula, de los cuales unos 200 -300 normalmente reaccionan con péptidos (Thermo scientific, 2013).

1.5.5.3.2 Albumina sérica bovina o BSA

La albúmina sérica bovina (BSA; peso molecular 67,000) pertenece a la clase de proteínas séricas llamadas albúminas. Las albúminas constituyen más o menos la mitad del contenido de proteínas del plasma y son bastante estables y solubles. BSA es mucho más pequeña que el KLH pero es completamente inmunogénica. Es un portador bastante popular para compuestos poco antigénicos. Es un polipéptido de cadena simple con 59 residuos de lisinas, 30-35 de los cuales tienen aminas primarias que son capaces de reaccionar con reactivos de conjugación. Tiene numerosos grupos carboxilos que dan al BSA su carga negativa neta (Cultek S.L.U, 2013).

El BSA es utilizado comúnmente en el desarrollo de inmunoensayos porque es completamente soluble y tiene numerosos grupos funcionales útiles para facilitar la unión de pequeñas moléculas que de otro modo no se unirían eficientemente. Una desventaja de BSA es que se utiliza en muchos experimentos como un reactivo en solución de bloqueo. Si antisueros contra el péptido-BSA conjugados se utilizan en tales ensayos, pueden producirse falsos positivos, ya que estos sueros contienen anticuerpos contra BSA (Thermo scientific, 2013).

Por esta razón, BSA se utiliza frecuentemente como proteína portadora no-relevante en pruebas de anticuerpos e inmunoensayos después de usar KLH para provocar la respuesta inmune contra el hapteno. Solo usando diferentes portadores en la misma inmunización y pasos de muestreo/purificación podemos asegurarnos la detección de anticuerpos hapteno-específico en vez de portador-específico (Cultek S.L.U, 2013).

1.5.5.3.3 Ovoalbúmina u OVA

La ovoalbúmina (OVA; peso molecular 45.000), es también conocida como albúmina de huevo. Constituye el 75% de las proteínas en los huevos de gallinas. Contiene 20 grupos lisina y es una buena elección como una segunda proteína portadora, para verificar anticuerpos que son específicos contra el péptido y no contra la proteína portadora (por ejemplo, BSA). La OVA activada muestra cerca de 5-15 grupos de unión por molécula para el acoplamiento directo de haptenos (Thermo scientific, 2013). También contiene 14 residuos de ácido aspártico y 33 residuos de ácido glutámico que aportan grupos carboxilo, los cuales se pueden utilizar para la conjugación con los haptenos (Cultek, 2013).

1.6 Métodos de purificación de anticuerpos

1.6.1 Purificación con sulfato de amonio.

La precipitación con sulfato amónico es uno del método más utilizado para la separación de los anticuerpos del inmunosuero. El método se basa en que las proteínas solubles forman puentes de hidrógeno con las moléculas de agua a través de sus grupos polares. Cuando se añaden concentraciones elevadas de iones fuertemente cargados como el amonio y el sulfato, éstos compiten con las moléculas proteicas por el agua. De esta forma, las proteínas, al perder su unión con las moléculas de agua, disminuyen su solubilidad, lo que origina su precipitación. La concentración de sulfato amónico necesaria para precipitar las inmunoglobulinas varía con la especie animal de la que proceden, aunque la más conveniente en la mayoría de los casos es una solución al 50% (Harlow y Lane, 1988). Los factores que pueden afectar la concentración a la cual una proteína particular precipite incluyen el número y posición de los grupos polares,

el peso molecular de la proteína, el pH de la solución y la temperatura a la cual se lleva a cabo el proceso.

1.6.2 Purificación con Ácido Caprílico

El ácido Caprílico (Octanoico) se puede utilizar para purificar IgG de mamífero a partir de suero, plasma, fluido de ascitis, y sobrenadante de cultivo de hibridoma por la precipitación de proteína IgG. Otros métodos han sido descritos donde el ácido Caprílico se ha usado para precipitar inmunoglobulinas dependiendo de la concentración utilizada. La concentración de ácido Caprílico requerida para purificar IgG varía según la especie. Las fracciones purificadas de IgG se pueden utilizar para la mayoría de los procedimientos inmunoquímicos, tales como placas de revestimiento para ensayos de captura de antígeno y la preparación de columnas de inmunoadfinidad, pero no sería adecuado para la conjugación con radioisótopos, enzimas, biotina y donde las proteínas contaminantes se reducirán la actividad específica.

El Ácido Caprílico es un ácido graso de cadena corta, el cual, bajo condiciones mediamente acididad precipita la mayoría de las proteínas séricas con excepción de las moléculas de IgG. este tipo de precipitación es muy útil para grandes volúmenes de muestra, sin embargo, este proceso conlleva a la obtención de fracciones impuras de anticuerpos. Para aumentar la eficiencia de la purificación, es necesario acoplar otros pasos posteriores de purificación, por ejemplo, cromatografía de afinidad (DEAD) (Kuhlmann W. 2008).

1.6.3 Purificación de anticuerpos por cromatografía de afinidad

La cromatografía de afinidad con columnas de antígeno, es el método más común y efectivo para purificar anticuerpos antígeno-específicos obtenidos de suero, fluido ascítico y cultivo de células. En este procedimiento, inmunoadsorbentes insolubles en agua son preparados acoplado covalentemente el antígeno puro a un soporte sólido. Uno de los métodos de acoplamiento más populares es unir el antígeno a perlas de agarosa activadas con cianógeno, las cuales son subsecuentemente colocadas en una columna. A los anticuerpos específicos para este antígeno, e les permite unirse; los anticuerpos que no se unen, así como los contaminantes proteicos se remueven con varios lavados. Finalmente, anticuerpos específicos son eluidos por medio de diversos ciclos de lavado con solución tampón de pH bajo y alto. Algunos anticuerpos de alta afinidad puede que no se eluyan bajo estas condiciones, por lo cual se aconsejan eluciones con soluciones de iones caotrópicos (por ejemplo KSCN). La ventaja principal de la cromatografía de inmunoadfinidad es la capacidad única de aislar anticuerpos de una mezcla. Las desventajas de este procedimiento son la necesidad de grandes cantidades de antígeno puro y que las condiciones de elución pueden guiar a la pérdida del anticuerpo por inactivación (Kuhlmann, 2008).

1.7 Ensayos inmunológicos

Los ensayos inmunológicos son procedimientos en los cuales se utilizan anticuerpos como reactivos enlazantes “específicos” y tienen aplicación universal para la determinación o cuantificación de fármacos terapéuticos y no terapéuticos, diversas sustancias biológicas, sustancias infecciosas o anticuerpos de respuesta del huésped en el suero, en la orina, en el líquido cefalorraquídeo en saliva y en cualquier líquido biológico donde se encuentre la sustancia a investigar. (Guzmán-Vázquez, 2004)

A pesar de que el fundamento de todas estas técnicas requiere de la utilización de un anticuerpo específico, las técnicas existentes se diferencian en función del soporte en el que tiene lugar la reacción y en la forma de revelar la presencia de este antígeno. El revelado de la presencia del antígeno se realiza mediante anticuerpos conjugados. Los anticuerpos a través del fragmento Fc pueden ser fijados a partículas y también pueden unirse químicamente a enzimas, moléculas fluorescentes, radioactivas o lumínicas (Alonso y cols., 2005).

Las principales técnicas de detección de antígenos son:

- a) Contrainmunolectroforesis
- b) Técnicas de aglutinación
- c) Inmuno cromatografía
- d) Enzimo inmunoanálisis
- e) Inmunofluorescencia
- f) Métodos luminométricos
- g) Inmunoblotting (Alonso y cols., 2005).

1.7.1 Técnicas basadas en "Blotting"

El término "Blotting" se refiere a la transferencia de muestras biológicas de un gel a una membrana y su posterior detección en la superficie de la membrana. La especificidad de la interacción anticuerpo-antígeno permite que una proteína diana sea identificada en una compleja mezcla de proteínas (Badiola, 2008). Se utiliza para determinar la presencia y cantidad de antígenos y de anticuerpos específicos. En la actualidad el Western blot o inmuno blot es la técnica analítica más usada para detectar proteínas específicas en una muestra determinada. Mediante una electroforesis en gel se separan las proteínas atendiendo al criterio que se desee: peso molecular, estructura, hidrofobicidad, etc. (Calderón, 2007). Esta técnica puede producir datos cualitativos y semicuantitativos sobre esa proteína (Badiola, 2008).

Después de la separación por electroforesis de la proteína en gel de poliacrilamida, se transfieren las bandas polipéptidicas a un soporte sólido, como lo es una membrana (típicamente de nitrocelulosa o de PVDF), para poder buscar la proteína de interés con anticuerpos específicos contra ella (Calderón, 2007). Para ello, la membrana se pone en contacto con el gel (a esto se le llama sándwich) y se transfiere en una cámara de electroforesis. Es posible que parte de la muestra se lave, y la proteína se re-naturalice parcialmente, es decir, recupere su estructura 2D y 3D. Sin embargo, la carga eléctrica aplicada, para hacer que las proteínas viajen verticalmente del gel hacia la membrana, genera que migren en la misma dirección en la que viajaron en el gel. De ese modo, las bandas proteicas quedan unidas a la membrana (Cultek, 2014). Finalmente, se detecta la unión antígeno-anticuerpo por actividad enzimática, fluorescencia entre otros métodos. De esta forma se puede estudiar la presencia de la proteína en el extracto y analizar su cantidad relativa respecto a otras proteínas (Calderón R. 2007).

Esta técnica es hoy en día imprescindible en varios campos de la biología, como la biología molecular, la bioquímica, la biotecnología o la inmunología. Existe toda una industria especializada en la venta de anticuerpos (monoclonales y policlonales) contra decenas de miles de antígenos diferentes.

Hay sin embargo otros métodos de transferir o aplicar proteínas u otras muestras sobre una membrana. El más sencillo es aplicarlas directamente en forma de una pequeña gota de una

solución concentrada sobre la membrana. La absorción de la gota provoca la adhesión de la muestra a la membrana, quedando en forma de una mancha o 'Dot' (es el caso del **'Dot Blot'**).

Trabajar con las proteínas fijadas sobre una membrana tiene ventajas sobre el emplearlas dentro del propio gel:

- Son más rápidas de teñir y desteñir.
- Se detectan cantidades menores de proteínas pues se concentran en la superficie y no se diluyen en todo el espesor del gel.
- El blot es un registro conveniente y cómodo de manipular.
- Las membranas son mucho más fáciles de manipular que el propio gel

Todo procedimiento de blotting consta de 5 etapas:

- Inmovilización de proteínas sobre la membrana ya sea mediante transferencia (electroforética, aspiración, presión, etc.) o mediante aplicación directa.
- Saturación de todos los lugares de unión de proteínas de la membrana no ocupados para evitar la unión no específica de anticuerpos, que son proteínas.
- Incubación del blot con anticuerpo primarios contra la/s proteína/s o muestras de interés.
- Incubación del blot con anticuerpos secundarios, o reactivos que actúan de ligando del anticuerpo primario unidos a enzimas u otros marcadores.
- Las bandas de proteínas marcadas con enzimas se hacen visibles por incubación con los sustratos apropiados para formar productos coloreados insolubles en el lugar donde se encuentra la muestra a analizar (Calderón R. 2007).

Las técnicas de inmunotransferencia utilizan anticuerpos (u otros ligandos específicos) para identificar proteínas diana entre un número de especies de proteínas no relacionadas. Cuando el ligando no es un anticuerpo, la reacción puede ser visualizada utilizando un ligando que está marcado directamente. La inmunotransferencia es ahora ampliamente utilizada en conjunción con electroforesis en gel de poliacrilamida bidimensional, no sólo para objetivos tradicionales, tales como la identificación de inmunofinidad de proteínas y análisis de las respuestas inmunes, sino también como una técnica de interfaz de genoma-proteoma (Magi y Liberatori, 2005).

Al entrar en contacto cada uno de los diferentes anticuerpos con el suero problema, este reaccionará inmunológicamente con su antígeno correspondiente formándose tantas bandas como reacciones antígeno/anticuerpo haya tenido lugar. Esta acción se pone en evidencia añadiéndose una anti-Ig marcada con una enzima. Finalmente, la adición de un sustrato incoloro da lugar a bandas coloreadas (Miranda E. y col, 2010)

El Dot Blot es un procedimiento simplificado en el que las muestras no están separadas por electroforesis y son vistas directamente sobre la membrana, es una técnica simple y sencilla, que puede ser empleada para la determinación de si los anticuerpos, así como el sistema de detección en el que son empleados son efectivos. Esta técnica puede ser utilizada ya sea como un método cualitativo para la detección rápida de un gran número de muestras o como una técnica cuantitativa. Es especialmente útil para probar la adecuación de los parámetros de diseño experimentales (GBiosciences, 2014).

La diferencia entre el Dot Blot y el Inmunoblot es que en el primero no se requiere la separación previa de los componentes de la muestra que se va a estudiar. Solo se necesita un

soporte sobre el cual se pega la mezcla que sirve como antígeno, y sobre ello se lleva a cabo la reacción antígeno-anticuerpo-enzima. El sustrato utilizado es de tipo insoluble y permite la visualización de puntos de reacción (dots) que pueden ser informados en forma cualitativa como positivos o negativos, o pueden ser cuantificados en un densitómetro de acuerdo a la intensidad del color (Florentino y cols., 1994)

1.8 Antecedentes de la detección de antibióticos en agua residual.

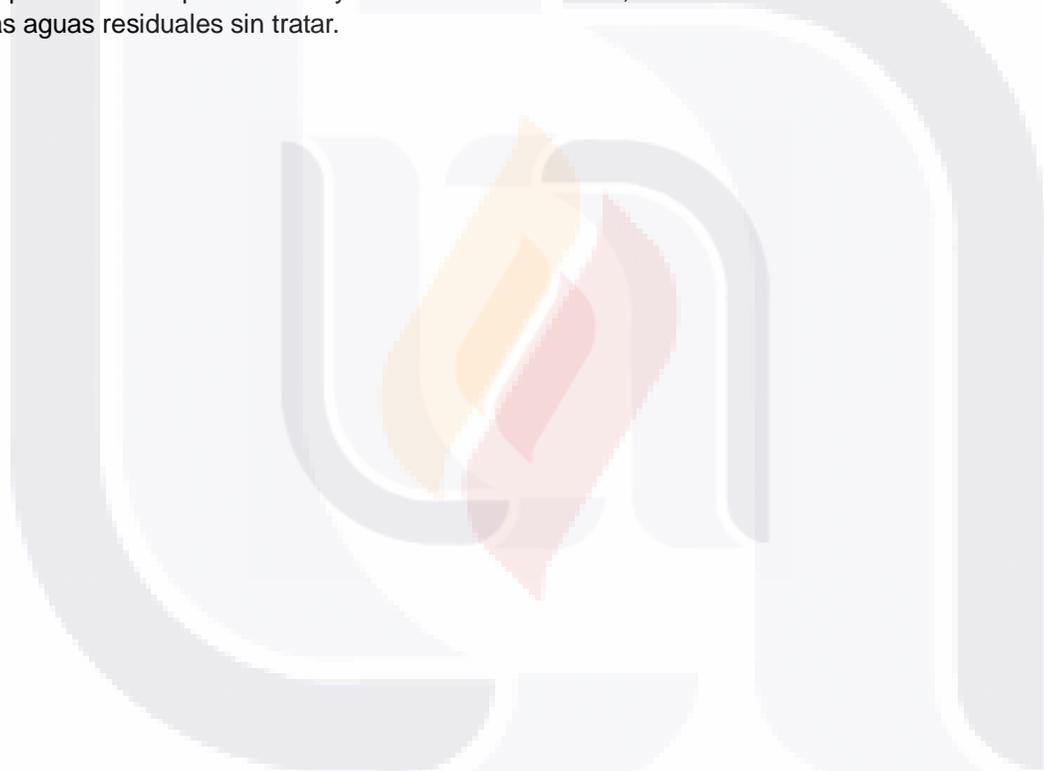
Un método de análisis fue desarrollado para la determinación de antibióticos macrólidos en los efluentes de aguas residuales tratadas y en agua a temperatura ambiente basados en la extracción en fase sólida. En las plantas de tratamiento de aguas residuales (EDAR) los macrólidos son sólo parcialmente eliminados y, por tanto, pueden llegar al medio ambiente acuático. En los efluentes tratados de tres EDARs en Suiza, la claritromicina, la roxitromicina, y la eritromicina-H₂O, fueron encontradas. Las determinaciones de flujo de masas en los efluentes tratados y en el agua del río en la cuenca del Valle de Glatt mostraron que la eliminación de la claritromicina a lo largo del tramo de río de 36 kilómetros es insignificante (<20%). Las investigaciones en el río Glatt antes y después de la desviación mayor del EDAR revelaron una disminución observable en cargas de claritromicina (McArdell y cols., 2003).

En 2004 Nakata y cols. investigaron la aparición de los antibióticos quinolonas (QA) en efluentes de aguas residuales y aguas superficiales o de ríos de lagos en los EE.UU. y Canadá. La ofloxacina (OFL) fue detectada en efluentes secundarios y finales de un EDAR en East Lansing, Michigan, en concentraciones de 204 y 100 ng / L, respectivamente. Las concentraciones OFL en efluentes de aguas residuales medidas en el estudio fueron comparables o inferiores a los observados en varios países europeos. QAs no fueron detectados en las aguas de ríos y lagos analizados en el estudio, lo cual pudo deberse a los efectos de dilución y de los límites de detección más altos, en relación con los reportados previamente. Considerando que los lodos residuales se aplican a la tierra como abono, los organismos del suelo podrían experimentar una mayor exposición a dichos antibióticos. Los estudios de vigilancia de QA en las aguas residuales de las EDAR y en los sedimentos/suelo cerca de las instalaciones de acuicultura y granjas ganaderas son necesarios para la evaluación, de la distribución ambiental y del riesgo de estos compuestos.

En 2005, muestras de varias instalaciones de tratamiento de aguas residuales en Wisconsin fueron examinados para la presencia de 21 compuestos antibióticos. Estas instalaciones abarcaron un rango del de la comunidad servida, procesos de tratamiento secundario, lugares geográficos en todo el estado, y descargas de los efluentes tratados a aguas tanto superficiales y subterráneos. Se detectaron un total de seis compuestos antibióticos (1-5 compuestos por sitio), incluyendo dos sulfonamidas (sulfametazina, sulfametoxazol), una tetraciclina (tetraciclina), fluoroquinolona (ciprofloxacina), macrólidos (eritromicina-H₂O) y trimetoprima. La frecuencia de detección de antibióticos fue en el siguiente orden: tetraciclina y trimetoprima (80%)> sulfametoxazol (70%)> eritromicina-H₂O (45%)> ciprofloxacina (40%)> sulfametazina (10%). Las concentraciones detectadas fueron dentro de un orden de magnitud a los reportados para sistemas similares en Europa y Canadá: eran dentro de un factor de dos en comparación con los reportados para Canadá. Futuros programas intensivos de monitoreo de aguas residuales en Wisconsin pueden estar limitados a los seis compuestos antibióticos detectadas en este estudio. (K.G. Karthikeyan y Michael, 2005).

En la última década, cerca de 50 estudios publicados se han enfocado a la determinación de quinolonas en matrices acuosas que se consideran relativamente “limpias” o que contienen bajas concentraciones de materia orgánica, la cual es considerada la mayor interferencia en la determinación de quinolonas en matrices ambientales, Únicamente Xiao y cols en el 2008. Lograron desarrollar y validar un ensayo que involucra la detección de más de 13 compuestos de forma simultánea en agua residual.

El objetivo del estudio realizado por Zuccato y cols., en el 2010 fue el de proporcionar una evaluación actualizada de los antibióticos que contaminan el ambiente acuoso en Italia, para una mejor comprensión de los riesgos para el ecosistema y la salud humana. Los antibióticos se enumeran en primer lugar en el orden de sus cargas ambientales teóricas. A continuación, se midieron en las aguas residuales de algunas plantas de tratamiento de aguas residuales (EDAR) y en los ríos de Italia. Los macrólidos, especialmente claritromicina y espiramicina y quinolonas, especialmente ciprofloxacina y l-floxacina / ofloxacina, fueron los antibióticos más abundantes en las aguas residuales sin tratar.



TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

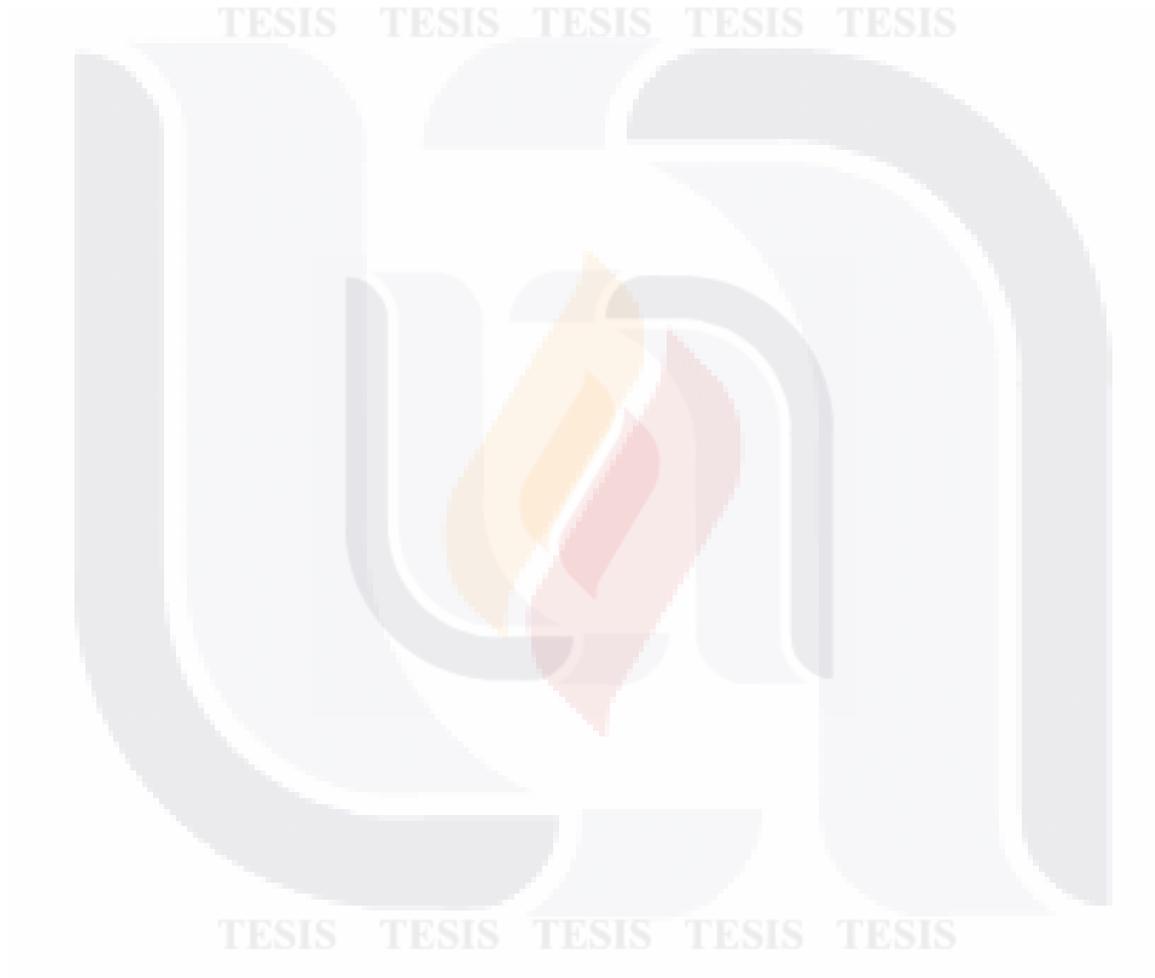
2. JUSTIFICACION

Hoy en día, con el desarrollo de la tecnología se han producido muchos compuestos químicos sintéticos, considerados una amenaza potencial para el ambiente y los seres vivos. Un ejemplo de estos compuestos, son los productos farmacéuticos como los antibióticos, los cuales son liberados en el medio acuático, representando un riesgo ambiental. Sus efectos adversos en la vida acuática y humana se han reportado en diversas investigaciones. Es por eso que el impacto sobre la salud y medio ambiente ha promovido el estudio de estos contaminantes. Existe también la posibilidad de que se desarrollen cepas bacterianas resistentes que hagan que estos compuestos resulten ineficaces para el fin para el que fueron diseñados ya que se ha comprobado que no son eliminados en las plantas de tratamiento y alcanzan fácilmente las aguas subterráneas por percolación a través de suelos. Además, algunos de ellos como es el caso de la STR son tóxicos al hombre.

Por todo lo expuesto hasta ahora, el consumo de antibióticos obliga al control de sus residuos en el medio ambiente, para con esto se implementen adecuados diseños de tratamiento de aguas para su eficiente remoción y así se garantice que no exista un riesgo para la salud pública. Esto sólo se puede llevar a cabo si se dispone de técnicas analíticas lo suficientemente sensibles y selectivas que originen datos fiables como es el caso de los inmunoensayos.

3. HIPOTESIS

Es posible inducir la producción de anticuerpos anti-STR en conejos adultos de la cepa *Nueva Zelanda*, mismos anticuerpos que pueden ser empleados posteriormente para desarrollar inmunoensayos para detectar este contaminante emergente en agua residual.



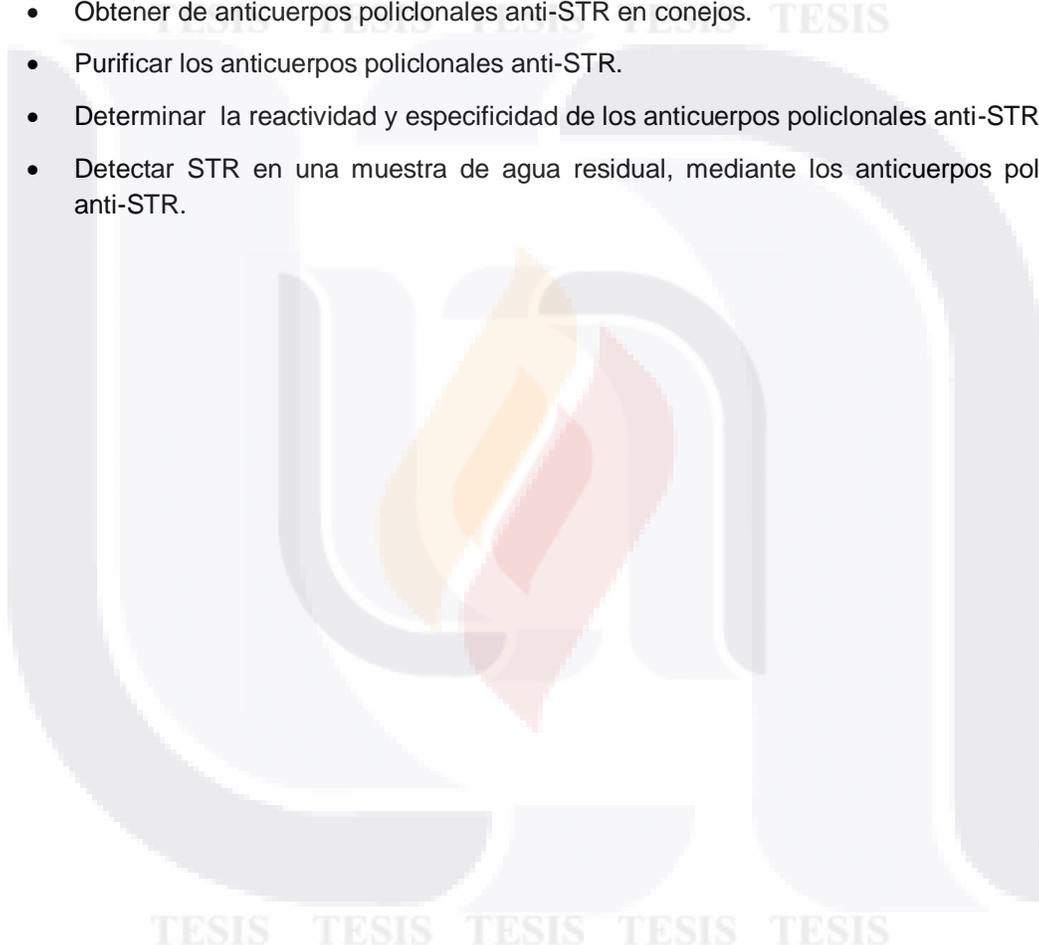
4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo general

- Obtener y purificar anticuerpos policlonales específicos contra un contaminante emergente, la STR.

4.2 Objetivos específicos

- Obtener de anticuerpos policlonales anti-STR en conejos.
- Purificar los anticuerpos policlonales anti-STR.
- Determinar la reactividad y especificidad de los anticuerpos policlonales anti-STR.
- Detectar STR en una muestra de agua residual, mediante los anticuerpos policlonales anti-STR.



5. MATERIALES Y METODOS

5.1 Materiales

5.1.1 Material biológico:

Conejos: Se trabajó con cuatro conejos adultos de la cepa *Nueva Zelanda* (tres machos y una hembra), los cuales fueron proporcionados por el bioterio de la Universidad Autónoma de Aguascalientes, y fueron mantenidos por separado en jaulas metabólicas en el animalario de la misma institución.

5.1.2 Inmunógeno:

STR acoplada a KLH: Este reactivo se consiguió de una casa comercial (Bio-World, Ohio, USA) ya preparado y listo para su utilización, se procedió a separar el volumen total del mismo en alícuotas las cuales fueron utilizadas en cada una de las inmunizaciones realizadas.

5.2 Métodos

El trabajo experimental se llevó a cabo en tres etapas. La primera consistió en la inmunización de los conejos con el inmunógeno (STR acoplada a KLH), para con ello, obtener anticuerpos anti-STR (anti-STR); la segunda etapa fue la purificación de estos anticuerpos, y la tercera etapa fueron las pruebas de reactividad y especificidad de los anticuerpos anti-STR.

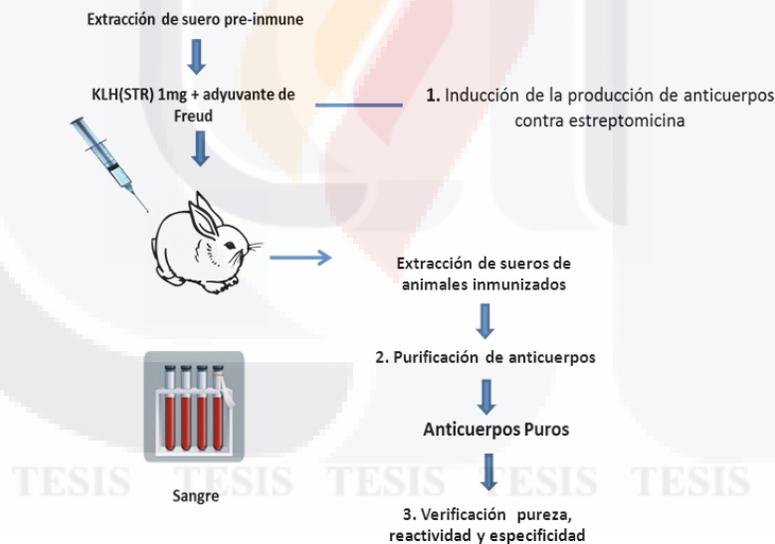


Figura 5. Etapas para la obtención de anticuerpos policlonales de conejo contra la STR.

5.2.1 Obtención de anticuerpos policlonales específicos contra STR:

La obtención de anticuerpos se llevó a cabo en 2 etapas:

1. Inducción de la producción de anticuerpos policlonales contra STR.
2. Extracción del suero de los animales inmunizados.

a) Inducción de la producción de anticuerpos policlonales

Para la inducción de la producción de anticuerpos se utilizó el conjugado STR-KLH.

Preparación del inmunógeno:

Se inmunizó 4 conejos con 1 mg de STR-KLH por conejo. Antes de la inoculación del antígeno, se tomó una muestra de sangre de la vena marginal de la oreja de cada conejo, con la finalidad de obtener suero pre-inmune y con este, comprobar la ausencia de reactividad de los animales frente a la STR.

Previamente a la inmunización, se rasuró la zona del lomo del animal, donde se procedió a inyectar subcutáneamente el inmunógeno STR-KLH. Se realizaron 4 pautas de inmunización bajo el siguiente esquema:

- 1ª Inmunización: se inyectó 1 mg del inmunógeno. Para esto se preparó una emulsión mezclando 2 ml de solución salina de STR-KLH (0.5 mg/ml) con 2 ml de ACF. Se aplicaron 10 inyecciones subcutáneas (SC) de unos 400 µl cada una a cada conejo.

$$\frac{1 \text{ mg STR/KLH}}{2 \text{ ml de solución salina}} + 2 \text{ ml Adyuvante completo de Freud}$$

→ 10 inyecciones subcutáneas (400µl cada una)

- Siguientes 3 inmunizaciones de refuerzo: Se preparó una emulsión de 2 ml de solución salina de STR-KLH (0.5 mg/ml) con 2 ml de AIF. Se aplicaron 10 inyecciones SC de unos 400 µl cada una. Estas inmunizaciones de refuerzo se hicieron cada 5 semanas.

$$\frac{1 \text{ mg STR/KLH}}{2 \text{ ml de solución}} + 2 \text{ ml Adyuvante incompleto de Freud}$$

→ 10 inyecciones subcutáneas (400µl cada una)

b) Extracción del suero de los animales inmunizados

Se realizó el sangrado de los animales entre los días 12 – 14 después de cada inmunización, mediante la extracción de la sangre por la vena marginal de la oreja de cada animal. Se obtuvieron aproximadamente 7 ml de muestra de sangre de cada animal.

Para obtener el suero se hizo:

- Se recolectó sangre de cada conejo en tubos de vidrio de 10 ml.

- Se dejó que se formara el coágulo a temperatura ambiente (entre 15 - 20 minutos) y con la ayuda de un aplicador de madera, se separó el coagulo de las paredes del tubo.
- Se centrifugaron las muestras a 1750 x g durante 15 minutos en centrifuga clínica.
- Se colectó la mayor cantidad de suero posible, evitando arrastrar paquete celular. El suero, se depositó en tubos cónicos de 10 ml.
- Estos tubos se conservaron por separado a -20°C para posteriormente verificar la producción de anticuerpos específicos contra el STR mediante análisis por Dot Blot.

Una vez que mediante Dot Blots se observó una buena producción de anticuerpos anti-STR en las muestras de sueros extraídos, se procedió a la sangría final de los conejos con el fin de obtener un gran volumen de suero:

Sangría final de los conejos

- Se pesaron los conejos y por vía intravenosa se anestesiaron con pentobarbital sódico (40 mg/kg de peso).
- Se colocaron los animales en una mesa de cirugía en cúbito dorsal, sujetándoles las patas al lado de la mesa y se les rasuró el abdomen.
- Se les hizo una incisión en la línea media del esternón a la sínfisis del pubis. Con la mano se retraen los órganos y por disección roma se expuso la arteria aorta abdominal con una troca del número 16, conectada a un tubo.
- Se desangraron los animales colectando la sangre en tubos de 50 ml hasta que murió el animal. Se dejó que se formara el coágulo a temperatura ambiente (20 - 30 min.) y se procedió a obtener el suero por el método descrito anteriormente.
- Se tomó una muestra de suero (200 µl) que se congeló a -20° C para analizarlo posteriormente por Dot Blot. Con el suero restante se procedió a purificar los anticuerpos policlonales.

5.2.2 Purificación de los anticuerpos policlonales

La purificación de los anticuerpos policlonales del suero de los conejos se hizo en tres etapas: una primera utilizando una solución saturada de sulfato de amonio, una segunda etapa que involucró precipitación con ácido caprílico y finalmente se purificaron por inmunoafinidad.

5.2.2.1 Purificación de anticuerpos por precipitación con sulfato de amonio.

- Una vez que se tuvo el suero de los conejos inmunizados, se midió el volumen, se transfirió a un recipiente limpio y se agitó suavemente con barra magnética.
- Mientras se agitaba el suero, se añadió lentamente 1.0 volúmenes de solución saturada de sulfato de amonio $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (4.1 M). Se dejó a 4° C toda la noche.
- Se centrifugo la muestra a 3,000 x g durante 30 min. a 10° C para recuperar las Ig precipitadas.
- El precipitado se resuspendió en 0.5 volúmenes de solución tampón de fosfatos (PBS) pH 7.4 (NaCl 0.14 M, KCl 2.7 mM, Na_2HPO_4 0.1 M, y KH_2PO_4 1.8 mM)

La muestra de anticuerpos en PBS se ultrafiltró a 4° C con una membrana de celulosa regenerada de corte de 10 kDa (Amicon 8050, Millipore Corporation Bedford, USA). La ultrafiltración se dejó hasta tener un volumen de 10 ml de remanente (precipitado). Este se lavó y ultrafiltró varias veces con PBS hasta que se eliminó el $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$.

Nota: La eliminación del $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ se verificó tomando muestra del permeato (filtrado) y añadiendo unas gotas de CaCl_2 4.0 M con lo que se observó la formación de precipitado (CaSO_4). Puesto que el calcio también reacciona con las sales de fosfato (PO_4^{-3}) que tiene el PBS, se adicionaron unas gotas del CaCl_2 4.0 M al PBS, se agitó y se calibró con esta muestra un espectrofotómetro a 485 nm. Posteriormente a las muestras de permeato se adicionó CaCl_2 y se les midió absorbancia a la misma longitud de onda. Cuando la absorbancia dio cero, se consideró que se había eliminado el $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$.

5.2.2.2 Purificación de anticuerpos por precipitación con ácido caprílico.

- El volumen de remanente de anticuerpos se ajustó con PBS al volumen que se tenía inicialmente de suero. Se tomó una muestra (200 μl) que se congeló a 20°C para analizarlo posteriormente por electroforesis y Dot Blot con el fin de verificar presencia y especificidad de los anticuerpos anti-STR.

La muestra restante se siguió procesando para purificar los anticuerpos policlonales con ácido caprílico.

- Para esto, se transfirió la muestra de anticuerpos a un recipiente limpio y se agitó con barra magnética suavemente. Se añadieron 2 volúmenes de solución tampón de acetato de sodio 60 mM pH 4.0.
- Se midió el pH de la mezcla y se ajustó a 4.8 con ácido acético glacial. Lentamente y agitando con barra magnética, se añadió gota a gota ácido caprílico (0.75 ml/ 10 ml del volumen original de suero). Se continuó agitando durante 30 min. a temperatura ambiente.
- Se centrifugó a 5,000 \times g durante 10 min. y se decantó cuidadosamente, recuperando el sobrenadante.
- El sobrenadante se ultrafiltró a 4° C con una membrana de celulosa regenerada de corte de 10 kDa.
- La ultrafiltración se dejó hasta tener un volumen de 10 ml de remanente (precipitado). Este se lavó y ultrafiltró varias veces con PBS hasta que se eliminó el ácido caprílico.

Nota: La eliminación del ácido caprílico se verificó tomando muestra del permeato (filtrado) y midiéndole pH. El pH inicial de la muestra era de 4.8 y se lavó y ultrafiltró con PBS hasta que fuera de 7.2, al pH que se tenía en el PBS originalmente.

- Una vez que se terminó de ultrafiltrar la muestra, se ajustó con PBS al volumen que tenía inicialmente, se tomó una alícuota (200 μl) que se congeló a -20°C para analizarlo posteriormente por electroforesis y Dot Blot.

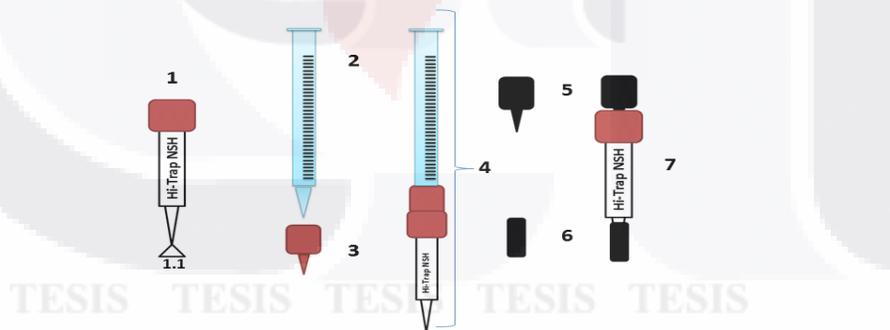
- La muestra de anticuerpos se congeló a -70°C para posteriormente purificar los anticuerpos policlonales por inmunoafinidad (Harlow y Lane, 1988).

5.2.2.3 Purificación de anticuerpos específicos contra STR por cromatografía de inmunoafinidad.

Se utilizaron dos métodos de purificación por inmunoafinidad, uno comercial correspondiente a una columna pre-empacada con N-hidroxisuccilamina y activada Hi-Trap NHS-activada HP (Ge healthcare Bio-sciencies corporation, USA), y el otro, correspondiente a una columna empacada en el laboratorio, empacada con Sefarosa 4B activada con cianógeno (Sigma-aldrich, St Louis, USA).

A) Purificación de anticuerpos por cromatografía de inmunoafinidad en columna Hi-Trap NHS-activada HP

La purificación se llevó a cabo en una columna Hi-Trap NHS-activada HP (Ge healthcare Bio-sciencies corporation, USA), la cual es una columna pre-empacada y lista para su uso, está diseñada para el acoplamiento covalente de ligandos que contienen grupos amino primarios. Contiene agarosa con 6 brazos espaciadores unida a una matriz con epichorohidrina y activada con N-hydroxysuccilamina. El agua y los reactivos químicos para la preparación de solución tampón fueron de alta pureza. Todas las soluciones utilizadas se filtraron a través de un filtro con tamaño de poro de $45\ \mu\text{m}$ (millipore corporation).



1. Columna Hi-Trap sellada con snap-off (1.1)
2. Jeringa de 1ml sin embolo
3. Conector Luer
4. Sistema de columna armado listo para utilización
5. Tapa superior de la columna (conector Luer)
6. Tapa inferior
7. Columna cerrada para refrigeración y posterior uso

Figura 6. Esquema de los componentes de la columna HiTrap NHS-activada,

La columna fue operada con una bomba peristáltica Gallempkamp (modelo FB2-200-W), siguiéndose la siguiente metodología:

a) Acoplamiento del ligando (STR) a la columna de afinidad

- Se preparó una solución del ligando (STR 20 μ M en solución tampón de acoplamiento (NaHCO_3 0.2 M, NaCl 0.5 M pH=8.3)), y se centrifugó con el fin de eliminar impurezas que pudieran obstruir la columna.
- Se removió la capa superior de la columna y se aplicó 1 gota de HCl 1 mM frío en la parte superior de la columna para evitar la formación de burbujas de aire.
- Se conectó el adaptador Iver Hi-Trap a la parte superior de la columna.
- Se removió el Snap off de la parte terminal de la columna (ver figura 6)

b) Preparación de la columna para el acoplamiento del ligando:

- Se lavó el isopropanol (contenido en la columna, el cual previene la inactivación de los grupos NHS) con HCl 1 mM frío, 3x2 ml con un flujo no mayor a 0.5 ml/min.
 - No se excedió el flujo pues se puede compactar la Sefarosa contenida en la columna.

Nota: no se removió el isopropanol en la columna, hasta que la solución de acoplamiento estuvo lista para usarse.

El acoplamiento pudo ser hecho en un rango de pH=6.5 – 9.0, sin embargo el máximo rendimiento se consiguió a un pH= 8.0 a temperatura ambiente (HiTrap NHS-Ativated HP, Instructions manual GE Healthcare).

Nota: antes de comenzar con el acoplamiento, permitir que la columna y la solución tampón alcanzaran temperatura ambiente.

- Inmediatamente se inyectó 1 ml de la solución del ligando.
- Se selló la columna y se dejó de 15-30 min a 25°C (o 4 horas a 4°C).

c) Lavado y desactivación

Para desactivar cualquier exceso de grupos activos no acoplados y lavar los ligandos no unidos específicamente se siguió el siguiente procedimiento.

- Se inyectaron 3 x 2 ml del solución tampón A (Etanolamina 0.5 M, NaCl 0.5 M pH=8.3)
- Se inyectaron 3 x 2 ml del solución tampón B (CH_3COONa 0.1 M, NaCl 0.5 M pH=4.0)

- Se inyectaron 3 x 2 ml de la solución tampón A, y se dejó en reposo por 15-30 min a temperatura ambiente o 4 horas a 4°C.
- Se inyectaron 3 x 2 ml del solución tampón B
- Se inyectaron 3 x 2 ml del solución tampón A
- Se inyectaron 3 x 2 ml del solución tampón B
- Se inyectaron 2 ml de un solución tampón con pH = 7.0 (Na₂HPO₄ 0.05 M)

d) Purificación de los anticuerpos anti-STR

Los anticuerpos se encontraban en PBS pH=7.4, se ultrafiltraron tres veces, con la finalidad de cambiar el PBS por solución tampón de unión (NaPO₃ 20 mM pH=7.0). Para esto se realizaron tres lavados por ultrafiltración en una cámara AMICON (membrana de nitrocelulosa regenerada de corte de 10 kDa).

- Se equilibró la columna con 10 volúmenes de solución tampón de unión
- Se aplicó la muestra (1 ml) usando una jeringa ajustada a un adaptador luer o por bombeo sobre la columna. La velocidad fue de flujo de 0.1 – 0.2 ml/min.
- Se incubó por 30 min a temperatura ambiente.
- Se lavó con solución tampón de unión, de 5 a 10 volúmenes de la columna o hasta que no apareció material proteico en la elución de lavado, lo cual se verificó por lectura de absorbancia de las muestras de lavado a 280nm (Abs_{280nm}).
- Se eluyó con solución tampón de elución (glicina-HCl 0.1 M pH=2.7) (1-3 volúmenes) y se recolecto el eluyente.
- Las fracciones obtenidas se neutralizaron inmediatamente con un volumen de 5-10 µL de solución Tris-HCl 1M pH 9.0

Con los anticuerpos obtenidos se determinó pureza de los anticuerpos, así como reactividad y especificidad frente a la STR.

e) Medida de la eficiencia de acoplamiento (% de STR acoplada)

Se leyó la densidad óptica a 324nm de la solución preparada con STR, antes y después de circular por la columna de inmunoafinidad.

$$\% \text{ de STR acoplada} = \frac{[STR]_0 - [STR]_f}{[STR]_0}$$

Siendo:

- [STR]₀: concentración inicial de STR colocada en la columna de inmunoafinidad.
- [STR]_f: Concentración de STR en la solución tras el acoplamiento en la columna de inmunoafinidad.

B) Purificación de anticuerpos por cromatografía de inmunoafinidad usando una columna de Sefarosa 4B activada con cianógeno.

a) Preparación de la resina, Sefarosa 4B activada con cianógeno (4B CNBr) y acoplamiento del ligando, STR

- Se pesaron 4gr de resina 4B CNBr, a los cuales se le agregaron 20 ml de agua destilada
- Se dejó reposar en agitación suave durante 30 min a temperatura ambiente, con el fin de hidratar la resina.
- Se dejó reposar la resina 10 min. aproximadamente para sedimentar y retirar el agua excedente.
- Con una espátula se recuperó la resina y se agregaron 10 ml de solución de bicarbonato de sodio (0.1 M NaHCO₃; 150 mM NaCl), en la cual se disolvieron previamente 20 mM de STR (carbonatos-STR). Esta solución se preparó antes del lavado de la resina. Así mismo, se tomó una muestra de la solución de carbonatos-STR.
- Se dejó en agitación suave durante toda la noche a 4°C. Posteriormente se tomó una muestra de 1 ml de la resina, a la cual se le dio un pulso en micro centrifuga,
- Para comprobar que realmente se dio el enlace entre el cianógeno de la resina y la STR, se leyó la densidad óptica a 324nm de la solución carbonatos-STR antes y después del contacto con la sefarosa hidratada.
- Se colocó la resina nuevamente en el tubo original.

b) Comprobación del correcto acoplamiento de la STR a la Sefarosa

Se realizó una prueba del acoplamiento utilizando una concentración fija de Sefarosa activada con STR (50 µL de esferas) en incubación de 30 minutos a temperatura ambiente con diferentes concentraciones de suero parcialmente purificado de conejo (100 µL, 75 µL, 50 µL, 25 µL, 12.5 µL, 6.5 µL, 3.5 µL). Así mismo se utilizaron dos controles, el control negativo consistió en únicamente muestra de Sefarosa sin anticuerpos (C (-)), mientras que para el control positivo C (+), se emplearon 25 µL de suero de conejo parcialmente purificado sin Sefarosa (C(+)). Después de la incubación se realizaron 3 lavados de las muestras con solución tampón de fosfatos. Posteriormente se colocaron las muestras en geles de poliacrilamida al 10%.

c) Purificación

- La resina se colocó en una columna de vidrio de 10 ml y se dejó sedimentar.
- Se pasaron 50 ml de la solución tampón de fosfatos pH 7.2 (PBS), para equilibrar la columna.
- A continuación se adicionó un volumen de 4 ml de la muestra de anticuerpos a purificar (previamente filtrado en membrana de 0.22 µm), pasándola a través de la resina por gravedad con flujo muy lento (60 gotas cada 2 minutos).
- Se utilizaron 25 ml de solución tampón PBS colectando 1 ml en tubos separados. Se detuvo el lavado cuando se obtuvo una absorbancia menor a 0.07 con una longitud de onda a 280 nm (A_{280nm}).
- Los anticuerpos se eluyeron con aproximadamente 25 ml de solución tampón de elución (se emplearon diferentes formulaciones de la solución de elución, con la finalidad de

determinar cuál era la condición más óptima para la obtención de anticuerpos anti-STR, ver tabla 1). Se colectaron 40 gotas (2 ml aproximadamente) del eluato en tubos de 16 x 15 cm que contenían 200 µl de 2M Tris-HCl pH 8 para prevenir desnaturalización de anticuerpos.

Nota: Cuando ya se obtuvo una A280nm de 0.07 o menos, no fue necesario seguir colectando.

Tabla 1. Diferentes condiciones de elución.

Método	Condiciones
A)	Elución con glicina 100 mM pH 2.5; incubación 10 minutos
B)	Elución con NaOH pH 13.5, Flujo continuo
C)	Elución con NaOH 50 mM pH 13.5; incubación 5 minutos
D)	Elución con glicina 100 mM pH 10; incubación 10 minutos
E)	Elución con glicina 100 mM pH 10; incubación 10 minutos
F)	Elución con NaOH 50 mM pH 13.5; incubación 10 minutos
G)	Elución con glicina 100 mM pH 10; Flujo continuo
H)	Elución con glicina 100 mM pH 10 y NaOH 0.1N; Flujo continuo

- La columna se lavó con 75 ml de solución tampón PBS pH 7.2, y se almacenó a 4°C en 10 mL de PBS con 0.02% de azida de sodio (NaN₃).

d) Diálisis

Se dializó la muestra de anticuerpos purificados contra 10 volúmenes de PBS pH 7.2, y se realizaron 4 cambios cada hora a temperatura ambiente o se dejó toda la noche a 4°C con 40 volúmenes de PBS pH 7.2.

- Las muestras purificadas se conservaron en congelación a -20°C.

5.2.2.4 Determinación de pureza de los anticuerpos policlonales anti-STR

Para ver la pureza de los anticuerpos anti-STR, se realizó una electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE) al 10% según la metodología descrita por Laemmli (1970). Para la electroforesis se usó un equipo Mini Protean III (Bio-Rad) a 80 volts durante 1.5 h, para posterior tinción de los geles.

Determinación de la concentración proteica en las muestras

Antes de realizar la electroforesis de las muestras de anticuerpos, se cuantificó la concentración proteica de los sueros, así como de las muestras obtenidas tras el proceso de purificación de los anticuerpos, con la finalidad de determinar la cantidad óptima de muestra a analizar por electroforesis. Para esto, se utilizó el método de Bradford, el cual se basa en la unión de un colorante, Coomassie Blue G-250 (también Serva Blue) a las proteínas. El colorante, en solución ácida, existe en dos formas una azul y otra naranja. Las proteínas se unen a la forma azul

para formar un complejo proteína-colorante con un coeficiente de extinción mayor que el colorante libre.

Metodología:

1. Preparación del reactivo de Bradford:

Tabla 2. Formulación reactivo de Bradford

Reactivo	Cantidad a utilizar para 1 lt de reactivo
Azul de Coomassie G-250	1.0 %/v
Etanol	0.5 %/V
Ácido fosfórico	0.01 %/v
Agua destilada	Aforar a 1000 ml

Se mezclaron en el orden indicado, disolviéndose en agitación y filtrando a continuación.

2. Curva patrón: se preparó una solución madre con una concentración de 1 mg/ml de albumina bovina.
3. Se preparó desde un rango desde 0 hasta 60 µg; de tal manera que el volumen final de cada tuvo fuera de 300 µl.
4. Preparación de las muestras: en un tubo limpio se agregaron 5 µl de muestra y 3 ml del reactivo de Bradford, se mezclaron bien en vortex.
5. Se determinaron las absorbancias de la curva patrón y de las muestras a 595 nm.

Electroforesis

a) Gel de separación: en la tabla 3, se muestra la formulación para geles de acrilamida a diferentes porcentajes. Para analizar anticuerpos (IgG), se prepararon los geles a una concentración del 10% de poliacrilamida.

1. Se preparó el persulfato de amonio (APS) al 10% en agua destilada y mismo que se conservó a 4°C hasta su uso.
2. Preparación de los geles; de acuerdo a las muestras que se corrieron, fue el porcentaje de acrilamida. Los geles consistieron de dos partes, el gel separador y el gel concentrante. Se preparó primero el gel separador según la siguiente tabla:

Tabla 3. Formulación de gel separador para electroforesis SDS-PAGE. Se muestran las cantidades empleadas para diferentes concentraciones de acrilamida final en el gel.

	5%	7.5%	10%	13.5%	16%
Agua destilada	8.52 ml	4.5 ml	4.02 ml	2.85 ml	2.05 ml
Tris-HCl pH 8.8 (1.5 M Trizma base, 0.014 M SDS)	3.75 ml	2.5 ml	2.5 ml	2.5 ml	2.5 ml

Acrilamida (30% acrilamida/0.8% bisacrilamida)	2.5 ml	2.5 ml	3.33 ml	4.5 ml	5.3 ml
Persulfato de amonio (APS) 0.44 M	75 µl	50 µl	50 µl	50 µl	50 µl
Tetrametilen etilen- diamina (TEMED)	7.5 µ	10 µl	10 µl	10 µl	10 µl
Total	15 ml	10 ml	10 ml	10 ml	10 ml

3. Se vertió el gel entre los cristales rápidamente con ayuda de una pipeta Pasteur, cuidando que no hubiera fugas por la parte inferior, llenándolos hasta la señal marcada.
 4. Se agregó etanol al 70% hasta el borde del cristal delgado para ayudar a que el gel polimerizara de manera uniforme.
- b. Preparación del gel concentrador:

Tabla 4. Formulación de gel concentrador para electroforesis SDS-PAGE.

Agua destilada	3.5 ml
Tris-HCl pH 6.8 (0.5 M Trizma® Base, 0.014 M SDS)	5.0 ml
Acrilamida (30% acrilamida/ 0.8% bisacrilamida)	1.3 ml
APS 0.44M	50 µl
Temed	10 µl
Total	10 ml

5. Se colocó el peine y se agregó el gel concentrador con cuidado de no hacer burbujas, por un lado del peine.
6. Se deja polimerizar.

Preparación de muestras a analizar

A la muestra de anticuerpos obtenida se le determinó la concentración de proteína por el método de Bradford.

La solución se ajustó a una concentración de 1µg de proteína/µL y se mezclaron 20 µL de esta solución con 10µL de solución de muestra.

Solución de muestra

Tabla 5. Formulación de la solución de muestra para electroforesis SDS-PAGE.

Tris-HCl pH 6.8 (0.5 M Trizma® Base, 0.014 M SDS)	2.5 ml
SDS 0.35 M	4.0 ml
Glicerol	2.0 ml
Azul de bromofenol 0.0058M	400 µl
β-mercaptoetanol	1.0 ml

1. Se colocó cada muestra en un tubo eppendorf de 600 µl, y se calentaron en agua hirviendo por 5 minutos.
2. Se procedió a cargar las muestras en los pocillos del gel.

Separación de las muestras por electroforesis

1. Una vez cargadas las muestras en los geles, se llenaron los pocillos vacíos con un poco de solución de muestra y finalmente se agregó con cuidado solución de corrida (Es una solución de 0.025M Trizma® base, 0.25M Glicina, 3.5mM SDS, pH 8.3 (Gallagher, 1995)) a cada uno de los pocillos hasta cubrir el cristal delgado.
2. Se llenó la cámara electroforética con solución de corrida.
3. Se conectó los electrodos correctamente (positivo/positivo, negativo/negativo) y se encendió la fuente de poder a 80 V, por aproximadamente 2 hs.

Las condiciones de corrida para la determinación de la pureza de los anticuerpos fueron:

- El gel de poliacrilamida 10% (p/v)
- Electroforesis fue continua y se realizó en un equipo “Bio-Rad Mini Protean 3”.
- Se corrió la electroforesis a 80 volts por 1.5 h.

La tinción de los geles se realizó por dos técnicas, una basada en la utilización de nitrato de plata, y otra utilizando el colorante azul de Coomassie.

Tinción con plata

1. El gel se fijó durante una hora, o bien, toda la noche con en solución de metanol-ácido acético-agua (45:20:45), en agitación.
2. Posteriormente el gel se colocó en una solución de etanol 10% - ácido acético 5%, en agitación durante 30 minutos.
3. Se lavó con agua destilada 30 minutos en agitación.
4. Se agregó ditiotreitól al 0.0002% (DTT) al gel, y se dejó en agitación por 30 minutos.

5. Se enjuagó el gel suavemente con agua destilada.
6. Se tiñó el gel con una solución de nitrato de plata recién preparada al 0.2% en agua desionizada y se dejó 30 minutos en agitación.
7. Se lavó el gel suavemente con agua desionizada.
8. Se lavó el gel suavemente con una solución de carbonato de sodio al 3% en formaldehído (0.5 ml/L), utilizando un poco de esta solución y sustituyéndola por fresca durante 5-10 minutos.
9. El revelado se detuvo con ácido acético al 1%.

Tinción con Bio-Safe™ Coomassie g-250 Stain (Bio-Rad, USA)

1. Se lavó el gel tres veces por 5 minutos con agua destilada en agitación.
2. Se remueve el agua, y se añadieron 50 ml del reactivo de tinción por gel, y se dejó en agitación suave por 1 hora.
3. Se lavó el gel en agua por 30 minutos.

Una vez revelado el gel, se procedió a determinar el peso molecular de las proteínas mayoritarias, calculando el coeficiente de migración (Rf).

Determinación del peso molecular de las bandas.

Se empleó la metodología del coeficiente de migración o relación al frente (Rf's), en la cual, se toma en cuenta la distancia total recorrida por las muestras y la distancia recorrida por cada una de las bandas de los marcadores de peso molecular reveladas tras la tinción:

1. Una vez teñido el gel, se midió la distancia recorrida por las muestras, desde la parte superior del gel (lugar donde se removió el gel concentrador), hasta el frente de corrida (línea en la parte inferior del gel formada por residuos de colorante y muestra) siendo esta medida la distancia total de corrida (Dt).
2. En igual forma se procedió a medir desde la parte superior del gel la distancia recorrida por cada una de las bandas en el carril del marcador de peso molecular así como de las muestras ($Dm_{(n)}$), estas distancias, se dividen entre el Dt, para obtener así el Rf's.
3. Se obtuvo el Logaritmo (\log_{10}) de los pesos moleculares (Log_{PM}) y con ellos se construyó una gráfica de Rf's contra Log_{PM} .
4. Se determinaron los Rf's de las bandas de interés en los carriles, de la misma manera en que se determinó el de los marcadores, a partir de la gráfica construida, se obtuvieron los pesos moleculares de las bandas proteicas de interés.
5. En la ecuación de la recta se sustituye el valor de X por el Rf de la banda problema, el resultado corresponde al peso molecular de la misma.

5.2.3 Verificación de la reactividad de los anticuerpos anti-STR

Para demostrar la reactividad de los anticuerpos frente a la STR, se realizó prueba de Dot Blot de la STR, utilizando como anticuerpo primario el antisuero (pre-inmune como inmune) obtenido de los conejos. Para desarrollar la técnica se emplearon membranas de nitrocelulosa.

- Se cortaron la membrana en partes individuales de 1cm x 1cm aproximadamente, y colocar la muestra a probar al centro de la membrana.
- Se dejaron secar completamente a temperatura y protegidas de la luz.
- Se colocaron las membranas en una solución de leche al 5% en T-TBS (Solución tampón Tris-salino (20mM Tris-HCl, 150mM NaCl, pH 7.5) con 0.05% Tween), con la finalidad de bloquear los sitios de unión no específicos en la membrana. Se incubó por 1 hora en agitación a temperatura ambiente.
- Se colocó la solución de primer anticuerpo o suero policlonal anti-STR (La cual se preparó en dilución 1:100 en leche en polvo al 5% en T-TBS), en agitación por una hora a temperatura ambiente.
- Se lavó tres veces con T-TBS (0.05%) por 5 minutos
- Se colocó la solución de segundo anticuerpo, la cual era una dilución 1:5,000 para ambos anticuerpos secundarios: anti-IgG de conejo (molécula completa) unido a fosfatasa alcalina (sigma Aldrich) o anti-IgG de conejo unido a peroxidada de rábano picante (HRP) en una solución de leche en polvo al 5% en T-TBS, se dejó en incubación con agitación a temperatura ambiente por 1 hora.
- Se lavó con T-TBS una vez por 15 minutos
- Se lavó con T-TBS 2 veces por 5 minutos cada lavado
- Se lavó una vez con TBS por 5 minutos.

El revelado de las membranas se realizó de dos formas:

Cuando se utilizó un anticuerpo secundario unido a fosfatasa alcalina:

Se realizó con un sustrato de la fosfatasa alcalina, 5-bromo-4-cloro-3-indol fosfato/nitro azul tetrazolio (BCIP/NBT) (Sigma- Aldrich, Steinheim, Alemania), tomando una pastilla (atemperada previamente) y disolviéndola en 10 ml de agua destilada (cubrir de la luz), en esta solución se colocaron las membranas.

- Se detuvo la reacción con agua destilada, cuando se observó una coloración morada en el lugar donde se colocó la muestra.
- Las membranas reveladas se dejaron secar entre dos hojas de papel filtro.

Cuando se utilizó un anticuerpo secundario unido a HRP se reveló por quimioluminiscencia aumentada (ECL)

Se colocaron las membranas a revelar entre dos acetatos transparentes. A estas se les agregó un agente quimioluminisciente (Luminata Forte millipore) en una relación de 0.02ml por cm² de membrana y se dejó incubar por 5 min.

- Se apagó la luz en cuarto oscuro, dejando encendida la luz de seguridad (roja). Se colocó el acetato, que contenía las membranas a revelar, en el casset de revelado, y se cortó la película radiográfica del tamaño del área que ocupen las membranas a revelar en el acetato. Se colocó la película en el casset sobre el acetato y se cerró el casset
- Se expuso la película el tiempo necesario (de 5 a 10 minutos aproximadamente).
- Se retiró la película del casset y se pasó a la solución de revelado, agitando suavemente por 1min.

- Se lavó con agua por 1min.
- Se colocó en la solución fijadora con agitación suave por 1min, se dejó secar la película evitando el contacto con otros materiales.

Reactividad de los anticuerpos anti-STR en agua residual.

Para esta prueba se utilizó como muestra, agua residual obtenida tanto del influente como del efluente de la planta tratadora de aguas residuales ubicada en la Universidad Autónoma de Aguascalientes.

Las condiciones empleadas para la prueba, fueron las mismas descritas anteriormente para el protocolo de Dot Blot (apartado 5.2.3). La cantidad de muestra aplicada fue de 2 gotas de 1 µL por membrana. Así mismo, se analizaron muestras enriquecidas y sin enriquecimiento de STR.

Para el enriquecimiento de la muestra de agua residual con STR, se adicionó una concentración de 500µg/µl.

5.2.4 Verificación de la especificidad de los anticuerpos anti-STR

Para esta prueba se realizó igualmente Dot Blot de los anticuerpos purificados anti-STR, siguiendo el protocolo descrito con anterioridad. Se probaron dos condiciones diferentes para determinar la especificidad de los anticuerpos, enfrentándolo contra antibióticos de la misma familia de los aminoglucósidos, a la cual pertenece la STR, y la otra fue utilizando antibióticos pertenecientes a diversas familias de antibióticos.

Para ambas pruebas, se utilizó siempre un control negativo, el cual consistió en una muestra de agua destilada.

a) Diferentes antibióticos aminoglucósidos

Para esta prueba se emplearon los antibióticos kanamicina, neomicina y paromomicina,. Todas las muestras se prepararon al instante. Así mismo la concentración de antibiótico a utilizar fue la misma para todas las muestras a probar. Se colocaron dos gotas de 1µl cada una, con una concentración de antibiótico correspondiente a 600µg/µl.

b) Diferentes fármacos, entre ellos antibióticos no aminoglucosidos

Para esta prueba se emplearon fármacos de formulación comercial:

Tabla 6. Diferentes fármacos empleados en pruebas de especificidad de anticuerpos anti-STR, pertenecientes algunos a grupos de antibióticos.

Antibiótico	Familia	Presentación comercial
Ciprofloxacino	Fluotoquinonas	Comprimido
Clarithromicina	Macrolidos	Comprimido
Clindamicina/ Ketoconazol	Semisintético derivado de lincomicina (grupo de las lincosamidas)/ antimicótico tiazólico	Cápsula
Metilsoprinol	Antiviral	Cápsula

6. RESULTADOS

6.1. Producción de anticuerpos policlonales específicos contra STR

6.1.1 Inducción de la producción de anticuerpos policlonales anti-STR.

Mediante el análisis por Dot Blot de muestras de STR, empleando los antisueros obtenidos a los 15 días de cada una de las diferentes inmunizaciones, se confirmó la producción de anticuerpos contra este antibiótico. Es importante señalar que el revelado de las muestras se realizó por dos metodologías (fosfatasa alcalina/BCIP/NBT y HRP/ECL) con la finalidad de seleccionar en el que se obtuvieran mejores resultados, figura 7 y 8.

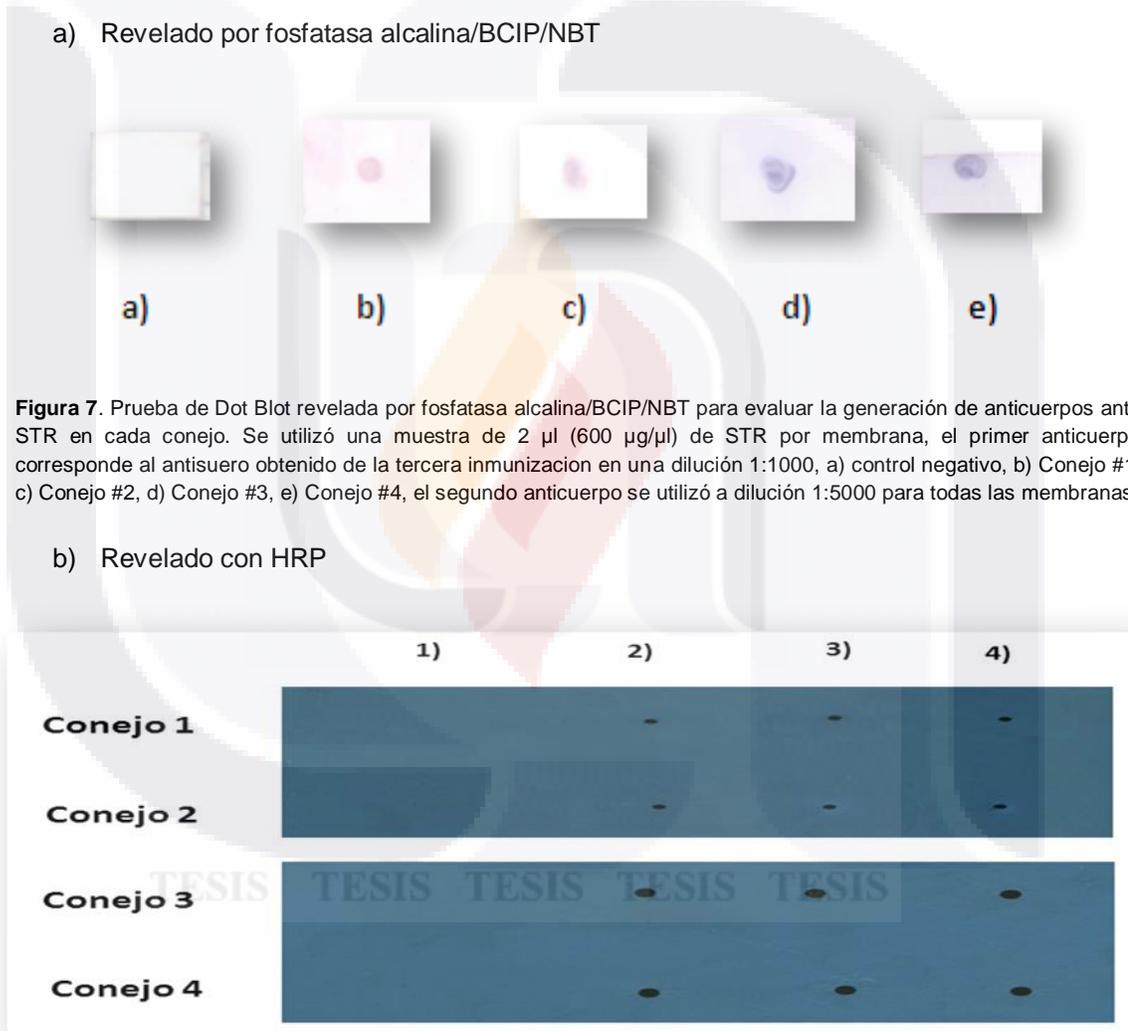


Figura 7. Prueba de Dot Blot revelada por fosfatasa alcalina/BCIP/NBT para evaluar la generación de anticuerpos anti-STR en cada conejo. Se utilizó una muestra de 2 μ l (600 μ g/ μ l) de STR por membrana, el primer anticuerpo corresponde al antisuero obtenido de la tercera inmunización en una dilución 1:1000, a) control negativo, b) Conejo #1, c) Conejo #2, d) Conejo #3, e) Conejo #4, el segundo anticuerpo se utilizó a dilución 1:5000 para todas las membranas.

Figura 8. Dot Blot con revelado por ECL para evaluar la generación de anticuerpos anti-STR en cada etapa de la inmunización de los conejos. Los anti-sueros fueron probados con una muestra de 2 μ l (600 μ g/ μ l) de STR, la dilución empleada del primer anticuerpo (antisueros) fue de 1:1000 y de segundo anticuerpo 1:5000, como control negativo se emplearon 2 μ l de agua destilada en lugar de STR. 1) Suero pre-inmune, 2) antisuero primera inmunización, 3) antisuero segunda inmunización, 4) antisuero tercera inmunización.

Se obtuvo una reacción positiva para todos los antisueros provenientes de diferentes inmunizaciones en los diferentes conejos, por lo cual quedó demostrada la producción de anticuerpos contra la STR. Así mismo, se observó que para el caso de los sueros pre-inmunes, la reacción fue negativa (figura 8, inciso 1), lo que demuestra que los animales con los que se trabajó, no habían generado una respuesta inmune previa al antibiótico, y que la producción de anticuerpos se debió a las inmunizaciones realizadas.

En el caso del control negativo, para el cual únicamente se utilizaron 2µL de agua destilada (solvente utilizado para preparar las diluciones de STR) como muestra, no se observó reacción de los anticuerpos contra el agua, por lo cual se continuo utilizando agua destilada para diluir la STR.

Pudo observarse que después de la primera pauta de inmunización, figura 7 y 8, la producción de anticuerpos anti-STR se mantuvo y fue aumentando en los cuatro conejos, lo que se aprecia por el aumento en la intensidad del Dot obtenido en cada membrana (entendiéndose por Dot, la reacción positiva obtenida en esta metodología). Este aumento en la concentración de anticuerpos fue posible observarlo de una manera más fácil en las muestras reveladas con fosfatasa alcalina/BCIP/NBT. Por esto mismo, y debido a que esta técnica de revelado es más simple, se determinó utilizarla en las pruebas posteriores de los anticuerpos anti-STR contra el antígeno STR.

6.2 Purificación de anticuerpos policlonales contra STR

Como se mencionó con anterioridad, la pureza de los anticuerpos obtenidos se determinó mediante electroforesis, en la que se observó que tras cada uno de los métodos de purificación la concentración de proteínas en las muestras disminuía, así como la presencia de algunas bandas proteicas en el gel desaparecía, lo cual demuestra que las metodologías de purificación aplicadas fueron funcionales para la purificación de la muestra de interés, figuras 9 y 10.

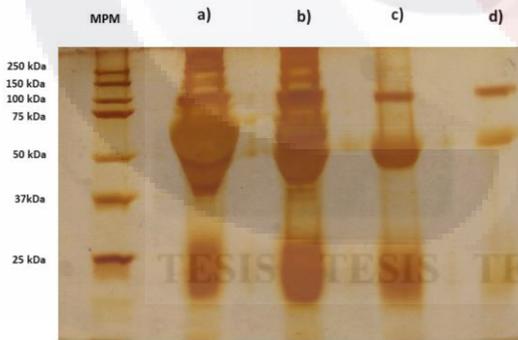


Figura 9. Gel electroforético teñido con plata, se observan las muestra: a) sueros de conejos sin purificar, b) tratamiento por saturación con sulfato de amonio, c) tratamiento por saturación con sulfato de amonio y precipitación con ácido caprílico, d) Anticuerpos purificados mediante columna de inmutofinidad comercial de inmutofinidad Hi-Trap NSH activada. Siendo el carril MPM, el correspondiente al marcador de peso molecular.

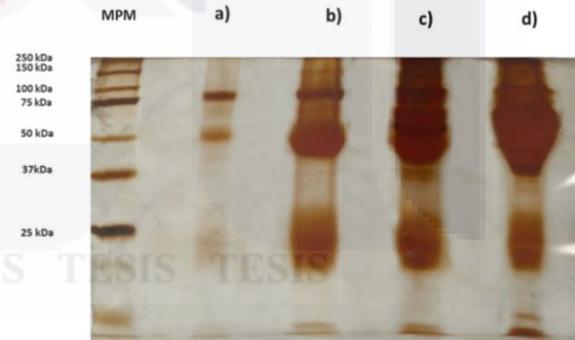


Figura 10. Gel electroforético teñido con plata, se observan las muestra: a) sueros de conejos sin purificar, b) tratamiento por saturación con sulfato de amonio, c) tratamiento por saturación con sulfato de amonio y precipitación con ácido caprílico, d) Anticuerpos purificados mediante columna de inmutofinidad de sefarosa 4B activada con cianógeno. Siendo el carril MPM, el correspondiente al marcador de peso molecular.

En la electroforesis de la muestra correspondiente al antisuero sin purificar, se observó la presencia de bandas proteicas en elevada concentración. Debido a la presencia de un gran número de proteínas en el suero, no fue posible determinar de manera exacta el número de estas en la muestra, lo cual se corroboró con la elevada concentración proteica determinada por el método de Bradford (tabla 8). Fracciones proteicas que se encontraban en gran concentración (figura10, inciso a), disminuyeron su concentración (intensidad de las bandas) tras la precipitación con sulfato de amonio (inciso b). Así mismo, después del tratamiento posterior de la muestra con ácido caprílico (inciso c), se observó la presencia de únicamente 3 bandas proteicas de interés, con pesos moleculares aproximados de 100 kDa, 54 kDa y 25 kDa.

Después de la purificación parcial de los anticuerpos, con los tratamientos por sulfato de amonio, así como con ácido caprílico, se llevó a cabo la purificación por inmunoafinidad. Para esto se emplearon dos metodologías, la primera utilizando una columna comercial obtenida de la casa comercial GE Hi-Trap NHS-activada HP, y con una columna empacada en el laboratorio, utilizando Sefarosa 4B activada con cianógeno.

El que se emplearan dos métodos de purificación por inmunoafinidad, fue con la finalidad de comparar y determinar cuál de ellos ofrecía mayores ventajas en la obtención de anticuerpos anti-STR puros, motivo por el cual, tras la purificación y prueba de reactividad de los anticuerpos obtenidos por cada métodos, se optó continuar trabajando únicamente con una de las dos metodologías anteriormente planteadas.

Como se mencionó anteriormente, uno de los métodos empleados fue estandarizado en el laboratorio (sefarosa 4B activada con cianógeno), para lo cual se realizaron pruebas para la determinación de las mejores condiciones de elución de los anticuerpos. Al tratarse de un método no estandarizado, fue necesaria la realización de pruebas para corroborar el correcto acoplamiento de la STR a la Sefarosa activada con cianógeno.

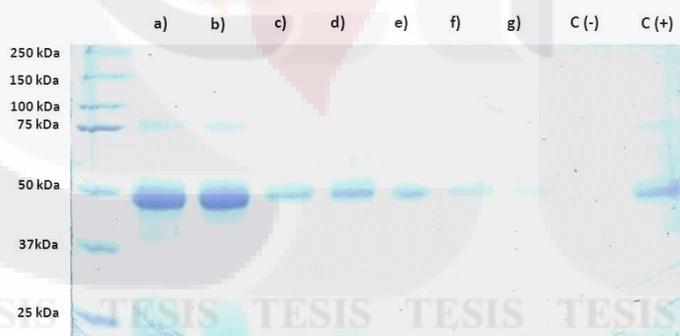


Figura 11. Gel electroforético teñido con azul de Coomassie. Prueba de acoplamiento utilizando una concentración fija de Sefarosa activada con STR (50 μ L de esferas) en incubación con diferentes concentraciones de suero parcialmente purificado de conejo (a) 100 μ L, b) 75 μ L, c) 50 μ L, d) 25 μ L, e) 12.5 μ L, f) 6.5 μ L, g) 3.5 μ L), así mismo se montaron controles negativo C (-), únicamente muestra de Sefarosa, y el control positivo C (+), para el cual únicamente se utilizó suero de conejo parcialmente purificado (12.5 μ L), sin Sefarosa.

Tras la tinción del gel, se observan bandas proteicas con un peso molecular aproximado a los 54 kDa y 25 kDa, así mismo, los controles negativos y positivos mostraron el comportamiento esperado. La disminución en la intensidad de la banda proteica, también concuerda con el

decremento en la cantidad de la muestra agregada a la Sefarosa. Pese a que se utilizaron diferentes volúmenes de muestra, al momento de prepararlas para electroforesis se aforaron todas al mismo volumen, para con esto evitar que la disminución en la intensidad de la banda proteica se debiera a una dilución de la muestra, y no al decremento de la concentración acoplada.

Se realizó un perfil de elución de las muestras para determinar cuáles eran las fracciones que se debían conservar (debido a su concentración de anticuerpos). Así mismo, se compararon los diversos perfiles de elución obtenidos tras cada elución, con la finalidad de determinar cuáles eran las condiciones que favorecían más a la purificación de concentraciones mayores de anticuerpos. Como se observa en la figura 12, el cambio en las condiciones de elución, mostro variaciones importantes al respecto de la concentración de proteína recuperada (segundo pico en la gráfica del perfil de elución) en las muestras eluidas, siendo que el perfil G) es en el que se observó la recuperación más elevada de proteína.

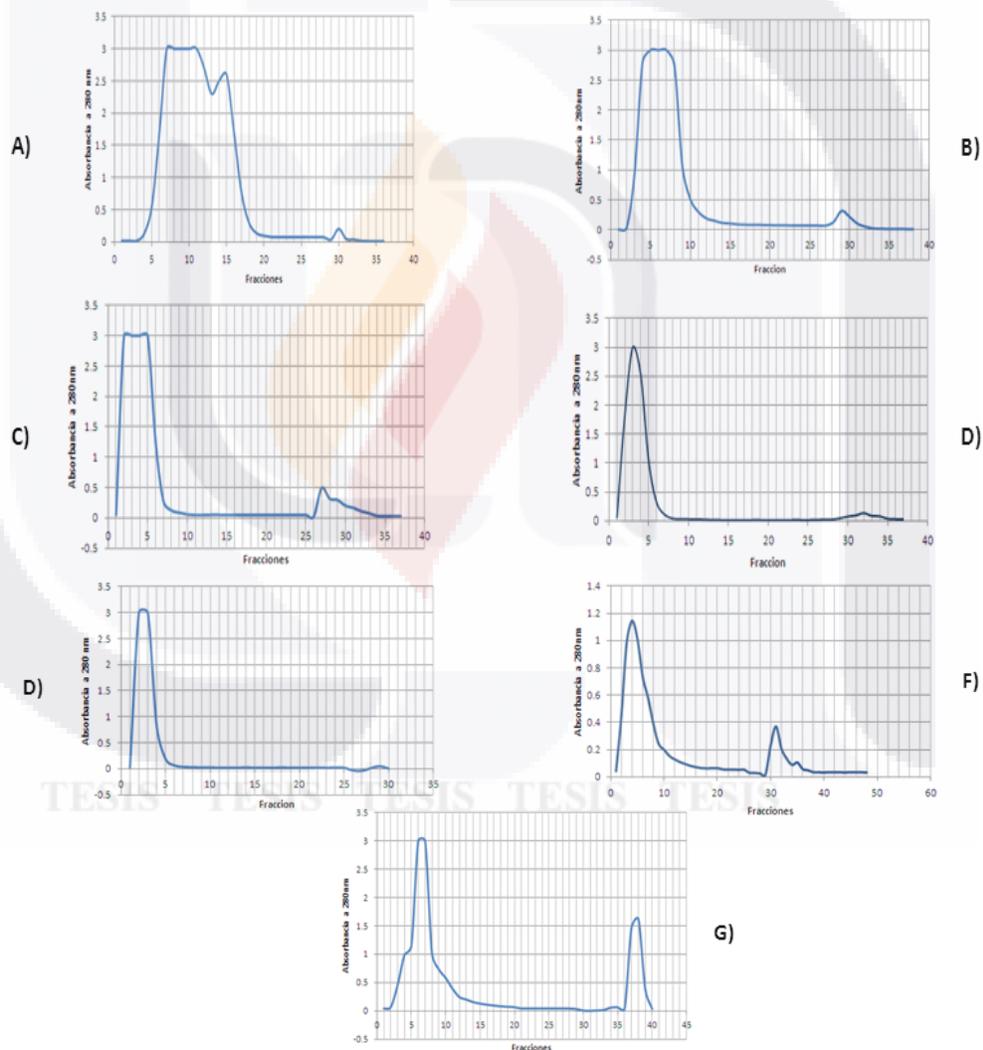


Figura 12. Diferentes perfiles de elución, Sefarosa 4B activada con cianógeno. En cada gráfica, se muestra el perfil de elución obtenido con las diferentes condiciones implementadas, graficándose la densidad óptica obtenida a una absorbancia de 280 nm, contra el número de fracción obtenida. A) Elución con glicina 100 mM pH 2.5; incubación 10 minutos, B) Elución con NaOH 50 mM pH 13.5, flujo continuo, C) Elución con

NaOH 50 mM pH 13.5, incubación 5 min., D) elución con glicina 100 mM pH 10; incubación 10 minutos, E) elución con glicina 100 mM pH 10; incubación 10 minutos F) Elución con Glicina 100 mM pH 10, flujo continuo. G) Elución con glicina 100 mM pH 10 NaOH 50 mM; flujo continuo.

A continuación se muestran las concentraciones finales de proteína obtenidas tras cada método de elución:

Tabla 7. Concentración proteica obtenida con cada perfil de elución

Método de elución	Condiciones de elución	Concentración final de proteína obtenida
A)	Glicina 100 mM pH 2.5, Incubación 10 min	0.0414 mg/mL
B)	NaOH 50 mM pH 13.5 Flujo continuo	0.1168 mg/mL
C)	NaOH 50 mM pH 13.5, Incubación 5 min	0.2372 mg/mL
D)	Glicina 100 mM pH 10, Incubación 10 min	0.0683 mg/mL
E)	Glicina 100 mM pH 10, Flujo continuo	0.0064 mg/mL
F)	Glicina 100 mM pH 10, Flujo continuo	0.1715 mg/mL
G)	Glicina 100 mM pH 10, NaOH 50 mM, Flujo continuo	0.4958 mg/mL

Teniendo en cuenta estos resultados, se optó por continuar con la purificación de la muestra de anticuerpos parcialmente purificados con el método G, el cual mostro los niveles más altos de proteína final recuperada tras la elución (0.4958 mg/mL). Para todos los métodos utilizados, la muestra se neutralizó inmediatamente, debido a las condiciones de pH extremas en las cuales eran obtenidas. Así mismo, la diálisis de las muestras eluidas se efectuaba al término del proceso de elución, con la finalidad de evitar la desnaturalización de los anticuerpos.

Al mismo tiempo se realizó la corroboración de la disminución en la concentración proteica de las muestras de suero de los animales en los diferentes pasos de la purificación, por método de Bradford.

Tabla 8. Concentración proteica en la muestra obtenida tras cada paso de purificación.

Muestra (paso de purificación)	Concentración proteica [µg/µl]
a) Pool sueros de conejo (3ª inmunización)	322.35
b) Purificación por precipitación con Sulfato de Amonio	129.35
c) Purificación por precipitación con Sulfato de Amonio y Ácido Caprílico	89.38
d) Purificación por inmunoafinidad, columna Hi-Trap NSH activada	63.88
e) Purificación por inmunoafinidad, columna sefarosa 4B activada con cianógeno	56.53

La disminución en la concentración de proteína final de los anticuerpos purificados, en comparación con las concentraciones proteicas tanto del pool de sueros de los conejos tras la tercera inmunización, así como después de las purificaciones parciales con sulfato de amonio y

ácido Caprilíco, demuestran que en cada una de las etapas, se fueron removiendo proteínas, las cuales se encuentran normalmente en el suero de los animales (ej. Albumina, transferrina, otros isotopos de Ig), por lo cual es de esperarse que la concentración proteica final sea baja.

Para corroborar que las fracciones proteicas obtenidas tras el proceso de purificación por inmunoafinidad se trataban de inmunoglobulinas de tipo G, se realizó prueba de Inmunoblot, utilizando como segundo anticuerpo un anti-IgG de conejo (Anti-Rabbit IgG (whole molecule)-alkaline phosphatase Sigma aldrich). Se observa en la figura 13, que las tres bandas proteicas que fueron observables en la tinción de los genes electroforéticos, figura 9 y 10, reaccionan de manera positiva al segundo anticuerpo utilizado, por lo cual, forman parte de la inmunoglobulina G,

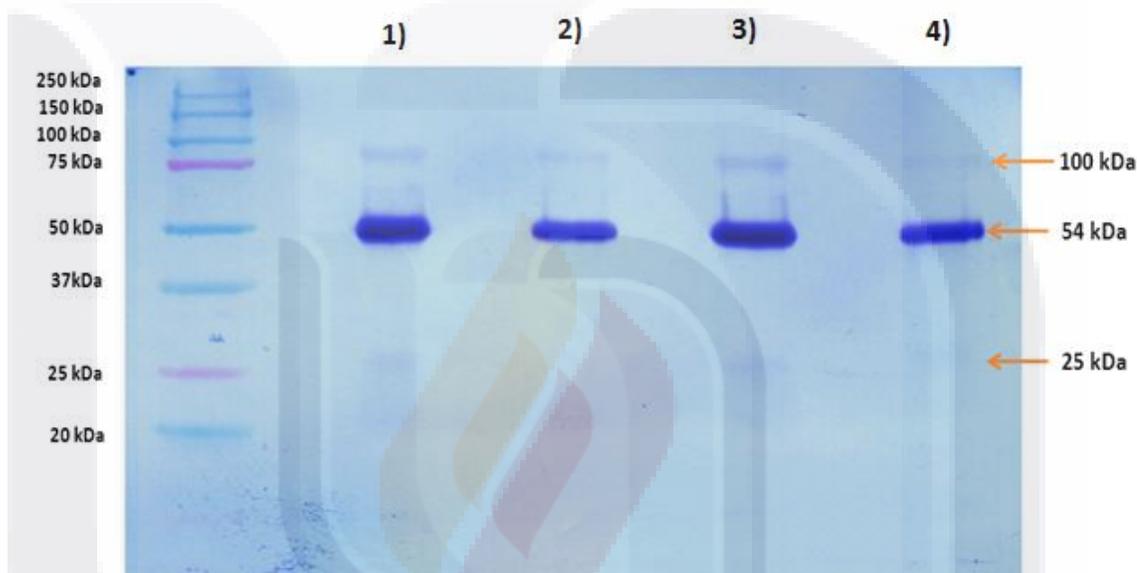


Figura 13. Inmunoblot a las fracciones de anticuerpos por purificación de inmunoafinidad. Se analizaron alícuotas de 20 μ l y 10 μ l, respectivamente, de muestra en cada carril, 1) y 2) corresponden a muestras obtenidas por columna Hi-Trap NSH activada, 3) y 4) corresponden a muestras obtenidas por columna sefárosa 4B activada con cianógeno.

Con esta prueba fue posible evaluar el origen proteico de las bandas obtenidas tras correr los geles de electroforéticos, así como determinar, la pureza en isotipo IgG de los anticuerpos obtenidos al término de los procesos de purificación. En la figura 13, se observan las fracciones proteicas obtenidas tras la desnaturalización de las muestras de anticuerpos, siendo que estas tienen un peso molecular aproximado de 100 kDa, 54 kDa, y 25 kDa.

Concentración óptima de anticuerpos y antígeno detectables.

Al término de las pruebas de reactividad, se determinó la dilución menor de los anticuerpos policlonales anti-STR, capaces de detectar la STR, así como la concentración mínima de STR que es reconocible por los anticuerpos anti-STR. Obteniéndose que la dilución 1:25,000 (correspondiente a 3 ng/ml), así mismo, la mínima concentración de STR detectable fue de 25 μ g.

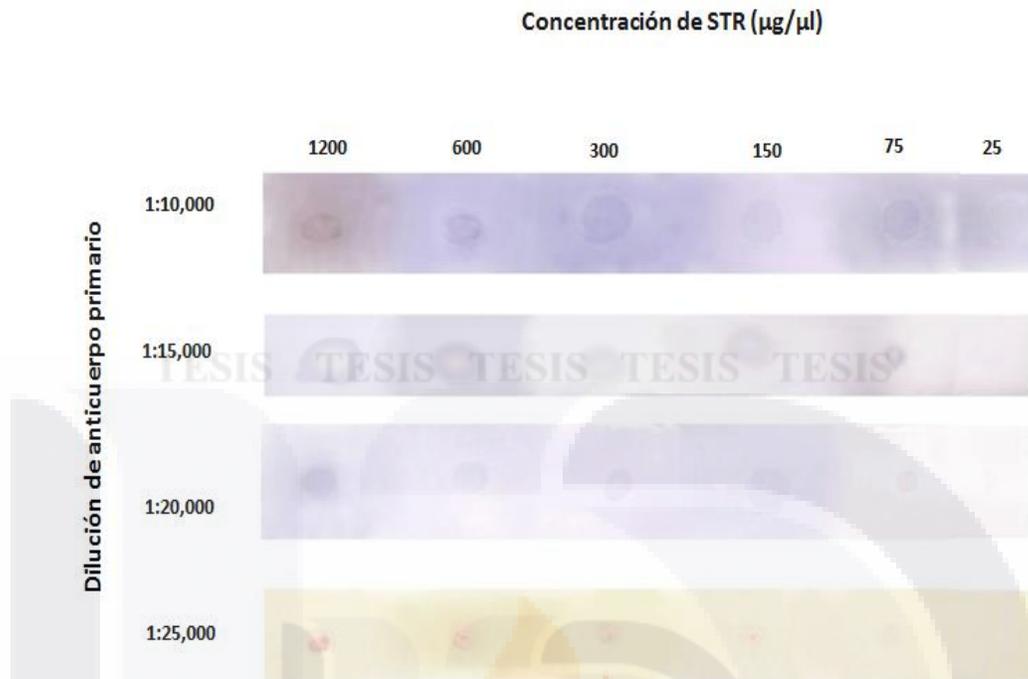


Figura 14. Obtención del título de anticuerpos vs antígeno. Se colocaron muestras de STR en diferentes concentraciones (1200, 600, 300, 150, 75, y 25 μg), los cuales fueron probados con diferentes diluciones del anticuerpo anti-STR obtenido en el laboratorio a diluciones de 1:10,000, 1:15,000, 1:20,000 y 1:25,000. Todas las muestras fueron incubadas con una dilución de 1:5000 de segundo anticuerpo (anti- IgG de conejo producido en cabra) unido a fosfatasa alcalina.

6.3 Verificación de la reactividad y especificidad de los anticuerpos anti-STR

Con la finalidad de verificar la reactividad de los anticuerpos purificados contra la STR, se llevaron a cabo varias pruebas tipo Dot Blot.

a) Reactividad de los anticuerpos policlonales anti-STR

La reactividad de los anticuerpos policlonales anti-STR se probó por Dot Blot. Para ello, el análisis se realizó en cada etapa de purificación, con la finalidad de corroborar si los tratamientos de purificación a los que fue sometida la muestra de anticuerpos, no afectaban la reactividad de los mismos.

Es posible observar, figura 14, que en todos los pasos de la purificación, la reactividad de los anticuerpos ante la STR no se vio afectada, siendo los anticuerpos aun reactivos frente a la STR.



Figura 15. Evaluación de la reactividad de anticuerpos policlonales anti-STR: se colocó una muestra de 2 μ l (600 μ g/ μ l) de STR en cada membrana, misma que fue enfrentada a una concentración de anticuerpo primario de: a) anticuerpos sin purificar (dilución 1:50), b) Anticuerpos tras precipitación con sulfato de amonio, c) Anticuerpos tras purificación con sulfato de amonio y ácido Caprilico, d) Anticuerpos purificados en columna de inmunoafinidad Hi-Trap; todas las muestras fueron incubadas con una dilución 1:1000 del primer anticuerpo y 1:5000 de segundo anticuerpo (anti- IgG de conejo producido en cabra) unido a fosfatasa alcalina.

Muestras de agua residual

Se procedió a montar una prueba rápida para determinar si existe o no residuo de STR en el agua residual proveniente de uso doméstico, obtenida del influente y efluente de la planta tratadora de aguas ubicada en la Universidad Autónoma de Aguascalientes.

Se observó reacción de los anticuerpos anti-STR ante ambas muestras, siendo que la reacción es de mayor intensidad para la muestra del influente (figura 15, inciso a). Si bien, se esperaba que después de que el agua fuera tratada en la planta, se removiera por completo el residuo de antibiótico en ella, es posible observar una leve reacción positiva de los anticuerpos anti-STR (figura 18, inciso b).

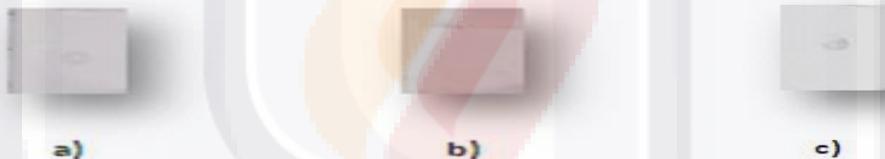


Figura 16. Dot Blot para determinar la presencia de STR en agua residual. a) Muestra de agua del influente, b) Muestra de agua del efluente c) muestra de agua del influente enriquecida con STR (600 μ g/ μ l); todas las muestras fueron incubadas con una dilución 1:1000 del primer anticuerpo y 1:5000 de segundo anticuerpo (anti- IgG de conejo producido en cabra) unido a fosfatasa alcalina.

b) Evaluación de la especificidad de los anticuerpos anti-STR

Diferentes antibióticos aminoglucósido

Para determinar la especificidad de los anticuerpos anti-STR, se hicieron dos pruebas. En la primera, se enfrentaron a los anticuerpos producidos contra diferentes antibióticos de la familia de los aminoglucósidos, misma a la cual pertenece la STR. Se eligieron la kanamicina, neomicina y paromomicina, se utilizaron debido a la importancia médica que tienen, ya que son ampliamente utilizados en medicina veterinaria.

Se puede observar que para el caso de los diferentes antibióticos, pese a que se puede observar una leve reacción positiva al centro de las membranas correspondientes a la neomicina y la kanamicina, la reacción obtenida para el caso de la STR es mayor. Cabe señalar que este tipo de compuestos presentan una similitud entre sus estructuras moleculares.



Figura 17. Prueba por Dot Blot para determinar la especificidad de los anticuerpos anti-STR; para todas las membranas se utilizó la misma concentración del antibiótico correspondiente 2 μ l (600 μ g/ μ l); a) Paromomicina, b) Neomicina, c) Kanamicina y d) STR. Dilución 1:1000 del primer anticuerpo y 1:5000 de segundo anticuerpo (anti- IgG de conejo producido en cabra) unido a fosfatasa alcalina.

Diferentes fármacos no aminoglucósidos

Así mismo, se evaluó la reactividad de los anticuerpos obtenidos contra STR frente a fármacos diferentes, entre ellos algunos antibióticos de diferentes familias. Se eligieron muestras de preparación comercial de ciprofloxacino, fosfato de clindamicina con ketoconazol, claritromicina y metisoprinol.

No se observó reacción alguna para el caso de las muestras pertenecientes a antibióticos no aminoglucósidos o para el fármaco antiviral, para todas las muestras se utilizó la misma dilución de anticuerpo primario y secundario.



Figura 18. Prueba por Dot Blot para determinar la especificidad de los anticuerpos anti-STR; para todas las membranas se utilizó la misma concentración del antibiótico correspondiente 2 μ l (600 μ g/ μ l) a) Ciprofloxacino (comprimido), b) Clindamicina combinada con Ketoconazol (Ovulo), c) Claritromicina (Comprimido) , d) Metisopropinol (Comprimido) y e) STR. Dilución 1:1000 del primer anticuerpo y 1:5000 de segundo anticuerpo (anti- IgG de conejo producido en cabra) unido a fosfatasa alcalina.

7. DISCUSIONES

7.1 Producción de anticuerpos policlonales específicos contra STR

Para la producción de anticuerpos, se realizó un protocolo de inmunización que constó de 4 pautas. En la primera de éstas, se utilizó el antígeno diluido en adyuvante completo de Freud (mezcla oleosa) ya que favorece el depósito del antígeno en el sitio de inoculación y potencia la inmunogenicidad (Arteaga-García y Jara, 2013) debido a la presencia de *M. Tuberculosis* inactiva en el adyuvante. Se inocularon conejos adultos jóvenes, debido a que es en esta especie animal en la que se reporta la mejor producción de anticuerpos del tipo policlonal, son de fácil manejo y mantenimiento, siendo que es posible obtener volúmenes considerables (5-10 mL) de suero en cada sangrado. Así mismo, presentan respuesta inmune frente a una gran variedad de antígenos (Florida State University, 2007).

Para las siguientes tres inmunizaciones, se utilizó el adyuvante incompleto de Freud, tal como se reporta en la bibliografía para las re-inmunizaciones (Rojas-Espinosa, 2006). Se realizaron varias re-inmunizaciones en los conejos debido a que una de las características primordiales de todas las respuestas inmunitarias es su autolimitación. Estas respuestas declinan con el tiempo tras la inmunización, por lo cual la concentración de inmunoglobulinas en el suero se ve disminuida al paso del tiempo en caso de no existir otro contacto con el inmunógeno. La principal razón para esta autolimitación es que toda respuesta inmunitaria elimina al antígeno o al inmunógeno (dependiendo de que tipo de molécula se trate) que ha iniciado la respuesta y así destruye la señal primaria necesaria para la activación linfocitaria (Correa y Mandujano, 2000). Es mencionado frecuentemente que las respuestas inmunitarias son cuantitativa y cualitativamente heterogéneas (Chabalgoity y cols., 2002), por lo cual es recomendable realizar más de una pauta de inmunización, para con ello, generar un cantidad óptima de anticuerpos del isotipo deseado, circulantes en suero.

Como recomendación general basada en estudios anteriores, Harlow y Lane (1988) mencionan la utilización de una dosis de 0.5 – 1.0 mg de antígeno en cada inmunización para conejos, razón por la cual se utilizó esa concentración de KLH-STR (1 mg) en cada pauta de inmunización. Como parte del protocolo, se realizaron sangrías a los conejos entre los días 13-15 después de cada inmunización, con la finalidad de obtener una muestra de suero sanguíneo, y con él, evaluar la producción de anticuerpos por parte de cada animal. La cantidad de días seleccionados para realizar la sangría de los animales, se eligió en función al pico de producción de inmunoglobulinas en la fase efectora (Abbas y cols., 2008)

El sangrado de los animales se hizo antes de comenzar el protocolo de inmunización, y después de cada inmunización, tratando de extraer la mayor cantidad de sangre posible. El sangrado previo es indispensable para contar con un suero testigo (Davies y Chacko, 1993), a este suero se le llamó suero pre-inmune, y fue empleado para corroborar mediante pruebas Dot Blot, en primera instancia, que ninguno de los animales empleados en el protocolo hubiesen sido inmunizados con el inmunógeno de interés (STR), así como para evaluar si la respuesta inmune fue inducida efectivamente en cada uno de ellos.

Para corroborar la producción de anticuerpos después de cada una de las pautas de inmunización, se realizaron pruebas de Dot Blot con los antisueros obtenidos. Se observó que

para el caso de las muestras en las que se empleó el suero pre-inmune, no reaccionó con la STR, con lo cual, se determina que los animales de estudio no fueron sometidos con anterioridad algún tipo de protocolo que indujera en ellos la producción de anticuerpos anti-STR. Al hacer el análisis por Dot Blot de las diversas muestras obtenidas tras cada inmunización hubo reacción positiva entre los antisueros obtenidos y la STR, y como era de esperarse, la reacción obtenida fue mayor, lo que se apreció debido al aumento en la intensidad de la mancha (mancha positiva en el centro de la membrana), esto debido a que tras cada pauta de inmunización, la generación de anticuerpos tipo IgG va aumentando.

Así mismo, se realizaron pruebas de Dot Blot a cada uno de los antisueros de los diferentes conejos en cada una de las etapas de las inmunizaciones. Con esto se corrobora que todos los animales sometidos al protocolo de experimentación fueron capaces de generar una respuesta inmune contra el antígeno, y no se tuviera que descartar alguno debido a la deficiente producción de anticuerpos.

7.2 Purificación de anticuerpos anti-STR

Como se mencionó en la metodología, la purificación de los anticuerpos se llevó a cabo en dos etapas. Una purificación parcial en la que se empleó precipitación por sales, con sulfato de amonio y con ácido octanoíco (ácido caprílico). La segunda etapa de la purificación por inmunoafinidad, utilizándose un método comercial, así como una metodología adaptada y estandarizada en el laboratorio.

En la purificación parcial se hizo el fraccionamiento por salado, en el cual una concentración elevada de una sal muy soluble es agregada a la solución de proteínas. Con esto se disminuye la interacción proteína-agua debido a la remoción de la capa de solvatación de la proteína, predominando así la interacción proteína-proteína, produciéndose con esto la precipitación. La concentración salina a la que se produce la precipitación no es igual para cualquier proteína, lo que permite usar ésta propiedad para la separación y purificación de proteínas particulares a partir de mezclas complejas (Bergmann-Leitner y cols. 2008).

Comúnmente se usa sulfato de amonio $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ para tal fin, a causa de su gran solubilidad. La adición gradual de ésta sal permite el fraccionamiento de una mezcla de proteínas, las cuales son precipitadas pero no desnaturalizadas. Entonces un exceso de agua, por encima del punto de precipitación, permite solubilizar nuevamente las proteínas (Wilson y Walke, 2010). Si este proceso se lleva a cabo a baja temperatura (alrededor de 4°C), las proteínas precipitan sin que se desnaturalicen. Luego, las proteínas precipitadas pueden separarse mediante centrifugación y posteriormente pueden ser re-disueltas en una solución tampón y dializada por varios días para eliminar el sulfato de amonio, o bien, ser sometidas a procesos de ultrafiltración.

El método de precipitación con sulfato de amonio es uno de los más utilizados para preparar fracciones crudas de inmunoglobulinas a partir del suero. Las fracciones crudas contienen todos los isótopos de inmunoglobulinas (IgG, IgM, IgA, IgE, IgD), además de otras proteínas contaminantes, tales como, las β globulinas, ciertas proteínas de alto peso molecular, así como proteínas atrapadas en el precipitado floculento (AMRITA University, 2014).

La concentración de sulfato de amonio a la cual los anticuerpos precipitan varía entre las especies. La mayoría de los anticuerpos de conejo precipitan en un 40% de

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

saturación, mientras que los anticuerpos de ratón necesitan de 45 a 50% de saturación (Kuhlmann, 2008). Precipitaciones con sulfato de amonio al 33.3% de saturación generan preparaciones más puras pero con menor rendimiento (SAFC Biosciences, 2006). Por lo anterior descrito, en nuestro caso se empleó una concentración del 50%, Sin embargo, primero se realizó una precipitación bajo una saturación del 33.3%, para posteriormente completar la saturación del medio a un 50%. Con esto, se consiguió que la precipitación de las proteínas fuera gradual y se removieran proteínas que se encontraban en el suero (ej. Albumina, transferrina, etc.) Las cuales en este protocolo son consideradas como contaminantes.

Las fracciones crudas de Igs, pueden ser utilizadas directamente. En otras situaciones, las fracciones crudas constituyen el primer paso en la producción de preparaciones altamente purificadas de Igs. Una vez precipitadas las Igs, se separaron la muestra por centrifugación con la finalidad de recuperar el precipitado en el cual se encontraban las Igs de interés. Seguido de ello, se procedió a concentrar la muestra y hacer un cambio de solución tampón para eliminar el sulfato de amonio disuelto (Moore y Krey, 2009).

El motivo de que se optara por la purificación de los anticuerpos con ácido caprílico, fue debido a que esta metodología ha sido evaluada como una posible alternativa previa a la cromatografía por inmutofinidad. Este método implica la precipitación selectiva de las Igs manteniendo en solución las proteínas de interés, las IgGs. Fabricantes de productos de plasma han purificado eficazmente proteínas como inmunoglobulinas del tipo IgG de suero, plasma (Brodsky y cols., 2012), y fluido de ascitis mediante el uso de ácido caprílico. Esta metodología se puede implementar en un biorreactor, o bien, antes de purificación en columna. En ambos casos, el objetivo es eliminar una etapa de cromatografía de pulido y/o para incrementar la eficiencia del proceso global. (McKinney y Parkinson, 1987; Parkkinen y cols., 2006; Russo y cols., 1983; Steinbuch y Audran, 1969).

Una vez terminada la purificación parcial, se procedió a congelar a -60°C hasta la purificación por inmutofinidad; para ello, se decidió separar dos muestras representativas de anticuerpos, una sería tratada con una columna comercial de la casa GE healthcare que contenía Sefarosa activada con N-Hidroxisuccilamina, mientras que la otra sería tratada con una columna preparada en el laboratorio de Sefarosa 4B activada con cianógeno, para así determinar que método de purificación por inmutofinidad presentaba mayores ventajas en cuanto a tiempo de realización, cantidad de reactivos a utilizar y eficiencia en la recuperación de anticuerpos.

7.2.1 Purificación de anticuerpos por cromatografía de inmutofinidad.

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

La elección del tipo de columna comercial que se utilizó en este trabajo, se debió a que si se encuentra activada con N-hidroxisuccilamina (NHS), las interacciones que se producen entre este ligando y los grupos amino primarios de la molécula de interés, son fuertes y estables a pH fisiológicos (Hermanson, 2013). Debido a que la molécula de la STR cuenta con grupos aminos primarios, y tomando en cuenta que este tipo de columnas son ampliamente utilizadas para la purificación por inmutofinidad de anticuerpos, se optó por utilizarla. Cabe señalar que, este tipo de uniones se utilizan más comúnmente cuando la molécula a inmutofinizar es una proteína, debido a que la cantidad de aminos primarios en la estructura es mayor, pese a ello, tras el acoplamiento de la STR a la columna, se observó que la unión era estable, y que se lograba la recuperación de anticuerpos dirigidos contra esta molécula.

Debido a que el método de purificación empleando sefarosa 4B activada con cianógeno, no había sido probado con anterioridad en el laboratorio, se requirió la estandarización del protocolo para poderlo adaptar a la purificación de anticuerpos anti-STR. Si bien la sefarosa ha sido utilizada con anterioridad para la purificación de anticuerpos contra STR, como en el trabajo realizado por Bachler y cols.(2000) y Windbichler y Schroeder en el 2006, en el cual utilizaron sefarosa 6B activada con un grupo epóxido. Aunque la matriz solida es la misma para ambos métodos, el cambiar la forma en la que se activa la misma, puede afectar la forma en la que interactúa el ligando, en este caso la STR, a la sefarosa activada.

Así mismo, es importante señalar que los reportes encontrados de STR acoplada a una columna de inmuoafinidad, se utilizaban en su mayoría para purificación de proteínas de unión a RNA que interactúan con este antibiótico, conocidas como "Strepto Tags", término acuñado por Bachler y cols. en el 2000, mas no para la purificación de compuestos proteicos como son los anticuerpos. En dicho trabajo, la elución de los compuestos proteicos de interés, se realizó utilizando una solución tampón, a la cual se adicione STR 10µM.

7.2.1.1 Acoplamiento de la STR a la Sefarosa 4B

Para realmente corroborar que el ligando se había acoplado a la Sefarosa, se realizó la prueba en la que se enfrentaron los anticuerpos purificados parcialmente por precipitación con sulfato de amonio y ácido caprílico, con concentraciones variables de sefarosa acoplada al ligando (Figura 12, apartado 6.2). Se observó que existía una interacción entre la matriz solida activada y algunos compuestos proteicos que se encontraban en la muestra. Al obtener bandas proteicas en el gel electroforético, con pesos moleculares similares a los reportados para las inmunoglobulinas, se asumió, que la STR se había acoplado correctamente a la sefarosa, debido a que se logró la recuperación de anticuerpos después de la realización de la prueba.

7.2.1.2 Estandarización del método de purificación por cromatografía de inmuoafinidad utilizando columna de sefarosa 4B activada con cianógeno.

Se realizaron diferentes perfiles de elución con la finalidad de determinar bajo qué condiciones se obtenía la mayor concentración proteica. Así mismo, se estandarizó el volumen de solución de lavado y elución necesarios para la recuperación de los anticuerpos. En estos perfiles (figura 13, apartado 6.2), fue posible observar la presencia de dos picos, en los cuales, el primero corresponde a las Igs no específicas que son incapaces de reconocer a la STR y con ello acoplarse a la columna, siendo que son removidos tras los lavados realizados a la columna, y un segundo pico correspondiente a las Igs que fueron capaces de reconocer a la STR y son recuperadas tras la elución con soluciones de pH extremos (Thermo Fisher Scientific, 2010).

Era de esperarse que la concentración proteica de los anticuerpos inespecíficos fuese mayor al de las Igs anti-STR, debido a que después de la purificación parcial de los anticuerpos, se recuperan Igs de tipo IgG, las cuales no únicamente están dirigidas contra la STR, sino contra todos los antígenos con los que tuvieron contacto previo los conejos.

Los perfiles de elución son de gran utilidad ya que ayudan a saber cuáles son las fracciones de importancia que se deben de recuperar. Una vez establecida la cantidad de mililitros necesarios para equilibrar la columna, así como para lavar los anticuerpos inespecíficos de la

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

misma, la recuperación de las fracciones de anticuerpos específicos contra STR se pudo realizar de una manera mecánica.

Una vez purificadas las dos muestras iniciales de anticuerpos por ambos métodos de inmunoafinidad, se decidió continuar la purificación por el método comercial (Hi-Trap NHS-activada HP), debido a las ventajas que presentaba en cuanto al tiempo de procedimiento, y el volumen de reactivos requeridos. Así mismo, la concentración de los anticuerpos obtenidos por este método fue mayor (63.88 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ de proteína obtenidos por el método comercial, contra 56.53 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ de proteína obtenidos por el método estandarizado). En comparación con los resultados obtenidos en el 2005 por Peña y colaboradores, en el cual utilizando una columna de inmunoafinidad comercial para purificar IgG's de conejo, y obtuvieron una concentración máxima de proteína de 43.6 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$. Sin embargo, es importante destacar que el método estandarizado en el laboratorio también es de gran aplicabilidad en caso de no contar con los recursos necesarios para optar por un método comercial.

7.3 Determinación de la pureza, reactividad y especificidad de los anticuerpos policlonales anti-STR

7.3.1 Determinación de la pureza de los anticuerpos policlonales anti-STR

Para la determinación de la pureza de las muestras de anticuerpos purificados, así como la efectividad de los procedimientos de purificación previa, se realizó el análisis electroforético de las muestras obtenidas. Este procedimiento se realizó en condiciones desnaturizantes (utilizando SDS) con la finalidad romper los enlaces disulfuro que unen a los principales componentes de las moléculas que se encontraban en la muestra de anticuerpos purificados (cadenas pesadas y ligeras). Se esperaba que después de cada uno de los tratamientos de purificación a los que fuera sometida la muestra, la cantidad y concentración de bandas proteicas en el gel electroforético fuera disminuyendo. Fue posible observar como en la muestra correspondiente del antisuero sin purificar, se aprecia la presencia de fracciones proteicas de gran peso molecular, así como de elevada concentración, las que posiblemente correspondían a proteínas que se encuentran en el suero de los conejos (ej. Albumina, transferrina, etc.), las cuales tras someter la muestra al primer paso de la purificación parcial (precipitación con sulfato de amonio) ya no se presentan en la muestra, esto debido a que la saturación por sales en la muestra, disminuye la interacción agua-proteína, generando la precipitación de aquellas proteínas de gran peso molecular. Si bien, aún es posible observar un gran número de bandas en la muestra obtenida tras la purificación con $(\text{NH}_2)\text{SO}_4$ (Javois, 1999) una vez que esta fue sometida a la precipitación con ácido caprílico, desaparecen para solo dar paso a la presencia de tres bandas proteicas. En este paso, lo que se purificaron fueron las Igs de tipo G, todas las que se encontraban presentes en la muestra, cabe señalar que este tipo de Igs se generan de manera regular contra una gran cantidad de antígenos, por lo cual, las Igs "crudas", obtenidas en este paso, si bien ya son algunas específicas contra nuestro antígeno de interés, aún se encuentran "contaminadas" con IgG's no específicas (Brodsky y cols., 2012). Es por ello que se utilizó una última etapa de purificación basada en inmunoafinidad, para así, tener la certeza de que las IgG's que se obtendrían fueran específicas contra el ligando de interés. Al comparar la muestra procedente de la purificación con ácido caprílico y la de inmunoafinidad, se obtuvieron tres bandas proteicas, de pesos moleculares aproximados a los 100 kDa, 54 kDa y 25 kDa. Estas fracciones proteicas, se consideró pertenecían a las cadenas tanto pesadas como ligeras de las IgG's, ya que según Wang y col. (2007), la estructura de la inmunoglobulina G, consiste en dos cadenas pesadas de 50 kDa y dos

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

cadenas ligeras de 25 kDa. Sin embargo, la concentración proteica se ve disminuida entre las muestras, siendo que tras la purificación por inmunoafinidad, la concentración es menor, lo que era de esperarse debido a la remoción de las IgG's no específicas (Bergmann-Leitner y cols., 2008).

Según lo reportado por Garcia-Cozar y cols. (2014) el peso molecular de las cadenas pesadas y ligeras de las Igs es correspondiente a 54 kDa y 25 kDa respectivamente. En cuanto a la banda de aproximadamente 100 kDa, según pruebas realizadas por Lesmes en el 2011 utilizando anticuerpos policlonales de conejo del tipo IgG purificados por precipitación previa con sulfato de amonio, en las cuales se obtuvieron patrones de bandeos similares, y tomando en cuenta que se dio una reacción positiva entre el componente proteico y el anticuerpo anti-IgG, se determina que es parte de la molécula de IgG de conejo obtenida tras las purificaciones. Al reaccionar las bandas de manera positiva con el anticuerpo anti-IgG de conejo, se puede determinar que todas las bandas presentes son parte de la inmunoglobulina G de conejo.

7.3.2 Determinación de la reactividad de los anticuerpos policlonales anti-STR

Se realizaron análisis de Dot Blot para determinar la reactividad de los anticuerpos que se encontraban tanto en el antisuero sin purificar, así como en las muestras parcialmente purificadas y la muestra tratada por inmunoafinidad de anticuerpos anti-STR. Como anticuerpo secundario se utilizó un el mismo anticuerpo anti-IgG de conejo empleado en los Inmunoblot. Después del revelado de las membranas, fue posible observar la presencia de una marca positiva al centro de cada membrana en la que se colocó STR. En todas las pruebas se utilizó un blanco negativo, los cuales consistieron en una membrana de nitrocelulosa en la cual únicamente se colocaba agua destilada (solvente utilizado para preparar la muestra) sin STR.

Se obtuvieron reacciones positivas entre la STR y los anticuerpos obtenidos en cada etapa de purificación en el laboratorio. Posteriormente se procedió a determinar la concentración mínima necesaria a utilizar de anticuerpos que fueran capaces de reconocer a la STR (título de anticuerpos), así como a la determinación de la concentración mínima de STR detectable por los mismos, teniendo como referencia la concentración de anticuerpos recuperados tras la purificación. Se manejaron diferentes diluciones de los mismos, siendo que la mayor dilución de anticuerpos anti-STR en la que fue posible observar reacción positiva fue de 1:25,000. Así mismo, la mínima concentración de STR detectable fue de 25 µg. En un trabajo realizado por Moreno y cols en el 2006, en el cual purificaron anticuerpos contra el receptor de progesterona humano utilizando la misma columna comercial Hitrap NHS, ellos obtuvieron un título de anticuerpos de 1:200. Así mismo en el trabajo realizado por Peña y cols. en el 2005, en el cual obtuvieron anticuerpos policlonales contra la proteína idronato-2-sulfato sulfatasa, obtuvieron un título de anticuerpos de 1:2,000 con un buen reconocimiento del antígeno en diversas concentraciones (concentración mínima de 0.6 µg/ml)

Los anticuerpos obtenidos, se pueden utilizar en futuros protocolos para la determinación de STR en agua residual ya que como se planteó al inicio de este trabajo es considerada un contaminante emergente. Al no saberse si las diferentes condiciones que presenta el agua (pH variable, temperatura no constante, presencia de materia orgánica, carga de contaminantes químicos diversos, etc.) afecta la reactividad de los anticuerpos anti-STR con esta molécula, se decidió realizar una determinación de STR en agua residual.

Estas determinaciones se realizaron en muestras obtenidas tanto del influente como del efluente de la planta tratadora de agua ubicada en las inmediaciones de la Universidad Autónoma de Aguascalientes. La prueba resultó positiva, para ambas muestras procesadas. Si bien, la concentración en la que se encuentra el residuo del antibiótico en la muestra del influente es mayor, es importante señalar que aun después del tratamiento en la planta, se detectan bajas concentraciones de antibiótico en la muestra del efluente. Se optó por utilizar muestras obtenidas de esta planta tratadora, que las aguas vertidas en ella no son de origen hospitalario sino doméstico, por lo cual, la presencia o ausencia de fármacos es menor o inexistente. Así mismo, se quería verificar, si con un tratamiento secundario (como es el que se da en esta planta), se lograba la remoción o no de compuestos de origen farmacéutico, o su presencia persistía, con lo cual, se justifica la importancia de contar con metodologías que permitan la detección de este tipo de contaminantes emergentes, debido a las implicaciones en la salud de los organismos que estén en contacto con estas medios acuosos.

Con los anticuerpos obtenidos, se logró la detección de STR en agua residual adulterada en el laboratorio. Con esto, se demostró, que las condiciones físicas y químicas no controladas en las que se encuentra el agua, no afectan la reactividad de los anticuerpos ante la STR.

7.3.3 Determinación de la especificidad de los anticuerpos policlonales anti-STR

Se realizaron dos pruebas principales. En la primera, se enfrentó a los anticuerpos contra diferentes antibióticos aminoglucósidos y de uso cotidiano, siendo estos la kanamicina, neomicina y paromomicina, en la segunda prueba, se utilizaron antibióticos no aminoglucósidos como el ciprofloxacino, fosfato de clindamicina con ketoconazol, claritromicina y un fármaco antiviral, el metisoprinol.

Se observa una leve reacción positiva con los antibióticos aminoglucósidos. Esto se debe a que se trata de moléculas similares entre sí, debido a que su estructura consiste en un anillo aminociclitol al cual se unen dos o más azúcares, con o sin grupo amino, por medio de enlaces glucosídicos u oxídicos. Los distintos aminoazúcares proporcionan las diferencias en actividad, farmacocinéticas y tóxicas de los aminoglucósidos. Aunque la STR estructuralmente es un aminoglucósido, pues tiene un anillo aminociclitol, el hecho de no contener ninguna molécula de azúcar ni enlaces glucosídicos le confiere diferentes propiedades (Lorholary y cols., 1995). Al estar trabajando con anticuerpos policlonales, deben de existir anticuerpos que se generaron contra regiones de las moléculas que son similares en todos los antibióticos probados. Pese a ello, la reacción que se observa para el caso de la STR, es mucho más intensa que para los demás antibióticos, al ser estructuralmente diferente a los demás antibióticos de esta familia. Es de esperarse que los anticuerpos que se generaron contra ella sean poco reactivos a los demás antibióticos de la familia.

El que los anticuerpos anti-STR reconocieran otros antibióticos aminoglucósido, lejos de presentar un problema, acarrea la ventaja de un número mayor de molecular detectables en aguas residuales. Cabe señalar que la mayoría de los antibióticos aminoglucósido se utilizan en combinación, por lo cual, el que solo exista la presencia de uno solo en el agua residual no es viable (Bliziotis y cols., 2005). Al ser los anticuerpos capaces de reconocer otros antibióticos de la misma familia la utilización de los mismos en pruebas de detección se amplía a un rango que abarca más moléculas de interés.

Al probar los anticuerpos con antibióticos no aminoglucósidos, no se observó reacción alguna. Al tratarse de anticuerpos que se pueden emplear para futuros protocolos de detección de antibióticos en matrices ambientales, es importante destacar la no reactividad que presentar frente a otro tipo de fármacos empleados para el control de m.o., debido a que esto permitirá un determinación más específica del tipo de contaminante que se encuentra en la matriz estudiada. Como se ha descrito en diversos trabajo, en las muestras de aguas residuales se pueden encontrar fármacos desde drogas de abuso (Chicharro y cols, 2014), β -lactámicos (Jiménez, 2012), disruptores endocrinos (Estrada-Arriaga y cols. 2013), etc.

Según Correa y Mandujano (2000) la aplicación práctica de los antisueros es muy diversa, pues se puede utilizar con fines terapéuticos (inmunización pasiva), en diversos estados infecciosos o tóxicos (neumonía lobar, tétanos, etc.). Además son útiles en la identificación de microorganismos aislados de procesos infecciosos y en la clasificación taxonómica de diversas especies. También han servido como herramienta de trabajo para dilucidar mecanismos inmunológicos básicos (especificidad inmunológica, activación del complemento, fagocitosis, citotoxicidad, etc.) y en la determinación rápida y específica de la naturaleza de diversas sustancias químicas (proteínas, carbohidratos, haptenos, etc.)

Como se ha mencionado a lo largo de este trabajo, se generaron anticuerpos policlonales, y no monoclonales. Si bien los segundos son más específicos, ya que todas las clonas producidas son dirigidas hacia la misma región del antígeno, los anticuerpos policlonales presentan la ventaja de que son capaces de detectar diferentes regiones funcionales de un antígeno o molécula (Berkeley, 2014), por lo cual si esta ha sufrido alguna modificación estructural, aún es posible que sea detectada alguna región de la misma que no se haya alterado (Ritter, 2000). Así mismo, su producción y purificación es más simple, presenta menor coste y el tiempo requerido es menor (Tomas y cols., 2002).

CONCLUSIONES

Al término de este trabajo, se logró la obtención y purificación de anticuerpos policlonales anti-STR, los cuales mostraron una especificidad contra los antibióticos del tipo aminoglucósidos, mayoritariamente la STR.

Se obtuvo una concentración final de anticuerpos de 63.88 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ de proteína con el método de purificación de columna Hi-Trap NHS-activada HP (Ge healthcare Bio-sciencies corporation, USA), conocido como el método comercial, y 56.53 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ de proteína obtenidos por el método de columna empacada con Sefarosa 4B activada con cianógeno (Sigma-aldrich, St Louis, USA).

La dilución mínima de anticuerpos con la cual se pudo detectar la STR en pruebas Dot Blot fue de 1:25,000. Así mismo, la concentración mínima de STR detectable por los anticuerpos anti-STR fue de 25 μg .

Fue posible detectar rastros de antibióticos del tipo aminoglucósidos en el influente y efluente de la planta tratadora de aguas residuales ubicada en la Universidad Autónoma de Aguascalientes, utilizando los anticuerpos anti-STR producidos en el laboratorio.

En base a la practicidad presentada por el método comercial para la purificación de los anticuerpos (mayor concentración proteica recuperada, menor tiempo de operación, menor volumen de reactivos empleados) se optó utilizarlo como método de purificación final.

BIBLIOGRAFÍA

- Alvariño Caridad Ramos. 2008. "Aguas residuales generadas en hospitales". Ingeniería hidráulica y ambiental. 29(1) Pp. 56-60
- Amarsham Pharmacia Biotech, Antibody Purification Handbook No. 18-1037-46, Amersham Pharmacia Biotech, Uppersala, 2000.
- Anca Aliman Florentina. y Gavrilescu María. 2009. "Pharmaceuticals, personal care products and endocrine disrupting agents in the environment-A Review. Clean. 37(4-5) pp. 277-303.
- Antibodies. A laboratory Manual por E. Harlow y D. Lane. Cold Spring Harbor Laboratory. 1988. pp 283
- Arce Hernández A. y Villaescusa Blanco R. 2003. "Inmunoglobulina D: Propiedades y relevancia clínica". Rev Cubana Hematol Inmunol Hemoter. 19(2-3).
- Arteaga-García M y Jara C. 2013. "Antígenos del líquido pseudocelómico de *Ascaris suum* detectados por Western Blot utilizando IgY producidos en *Gallus Gallus* var. Hisex Brown". Revista científica de Estudiantes. 1(2):e58.
- Bachler M., Schroeder R. y Ahsen U von. 1999. "StreptoTag: a novel method for the isolation of RNA-binding proteins". RNA Society. 5: 1509-1516
- Badiola N. 2008. "Estudio de los mecanismos moleculares implicados en la muerte apoptótica en un modelo de isquemia cerebral in vitro". Tesis Doctoral. Universidad Autónoma de Barcelona
- Bailón Pérez María Isabel. 2009. " uso de técnicas separativas miniaturizadas como alternativa a la determinación de antibióticos beta-lactámicos en fármacos, aguas y alimentos. Universidad de Granada. Tesis de doctorado. Pp. 20.
- Bang-Ce Ye, Songyang Li, Peng Zuo y Xiao-Hong Li. 2008. " Simultaneous detection of sulfamethazine, streptomycin, an tylosin in milk by microplate-array based SMM-FIA". Food Chemistry. 106: pp. 797-803.
- Barceló Damia y López de Anda María José. 2007. "Contaminación y calidad química del agua: el problema de los contaminantes emergentes". Panel científico-técnico de seguimiento de las políticas de aguas. Pp. 24
- Basfar A., Mohamed K., Al-Abduly A. y Al-Sharhani A. 2009. "Radiolytic degradation of atrazine aqueous solution containing humic substances". Ecotoxicology and Environmental Safety. 72pp. 948
- Becerril José. 2009. "Contaminantes emergentes en el agua". Revista digital universitaria. 10(8) pp. 1-7
- Bergmann-Leitner Elke, Mease Ryan, Duncan Elizabeth, Khan Farhat, Waitumbi John y Angov Evelina. 2008. Evaluation of inmunoglobulin purification methods an their impact on quality and yeild of antigenic-specific antibodies. Malaria Journal. 7:129.
- Bliziotis I., Samonis G., Vardakas K., Chrysanthopoulou S y Falagas M. 2005. "Combination therapy versus β -lactam monotherapy on the emergence of antimicrobial resistance: a meta-analysis of randomized, controlled trials". Clinical Infectious Diseases. 41(2): 149-158.
- Brodsky Yan, Zhang Cheng, Yigzaw Yinges y Vedantham Ganesh. 2012. "Caprylic acid precipitation method for impurity reduction: an alternative to conventional chromatography for monoclonal antibody purification". Biotechnology and Bioengineering, 109(10) pp.2589-2598

- Calderón R. 2007. "Curso de Métodos Físicoquímicos en Biotecnología". Universidad Nacional Autónoma de México. Instituto de Biotecnología.
- Chambers FH. 2001. "The aminoglycosides". En: Hardman JG, LimbridE Lee editors. Goodman & Gilman's The pharmacology basis of therapeutics. 10 th ed, McGraw-Hill. USA. Pp 1219-1238.
- Chávez Vela Norma Angelica. 2008. "Detección de adulteración de leche con suero de quesería por medio de un sistema tipo ELISA". Universidad Autónoma de Aguascalientes. Tesis de Doctorado. Pp. 18.
- Chicharro A., González-Alonso S., Montero J. y Valcárcel Y. 2014. "Estimacion del consumo de drogas de abuso y sus metabolitos a partir de su presencia en el agua residual de Talavera de la Reina y el rijo Tajo". Rev Esp Salud Publica. 88(2): Pp. 289-299.
- Christa McArdell, Molnar Eva, Suter Marc y Giger Walter, 2003, "Occurrence and Fate of Macrolide Antibiotics in Wastewater Treatment Plants and in the Glatt Valley Watershed, Switzerland", Environ. Sci. Technol., 37 (24), pp 5479–5486
- Correa, D. y Mandujano A., 2000, "Manual de técnicas modernas en Inmunología". Teoría y práctica. 1ª. Edición. INDRE-SSA. México.
- Cortacans J., Hernández A., Del Castillo I., Montes E. y Hernandez A. 2014. "Presencia de fármacos en aguas residuales y eficacia de los procesos convencionales en su eliminación". Catedra de Ingeniería Sanitaria y Ambiental. Universidad Politécnica de Madrid.
- Cultek. 2014. "Soluciones Wester Blot". <http://www.cultek.com/inf/otros/soluciones/cultek-tecnicawb.pdf>.
- Cunha BA.1990. "Aminoglycosides in urology". Urology. 36(1):1-14.
- Diaz-Cruz M. Silvia y Barcelò Damia. 2006. "Determination of antimicrobial residues and metabolites in the aquatic environment by liquid chromatography tandem mass spectrometry". Anal Biomal Chem. 386. Pp. 973-985.
- Estrada-Arriaga E., Mijaylova-Nacheva P., Moeller-Chavez G., Mantilla-Morales G., Ramírez-Salinas N. y Sánchez-Zarza M. 2013. " Presencia y tratamiento de compuestos disruptores endocrinos en aguas residuales de la Ciudad de México empleando un biorreactor con membranas sumergidas". Ing. invest y tecnol. 14(2): 276-284.
- European Food Safety Authority (EFSA). 2008. "Perfluorooctane sulfonate (PFOS), perfluorooctanoic acid (PFOA) and their salts". Tje EFSA journal. 653(1): Pp. 131
- Fang-Shi L. Xian-jin S y Heng-hua C. 2007. "Development of anti-iboproturon polyclonal antibody". Agricultural Science in Chine. 6(8) Pp. 694-969
- FAO. 2013. "Reutilización del agua: la agricultura y la gestion del agua urbana en una sociedad del reciclado". FAOLAND&WATER. Pp. 2
- Florentino S. 1994. " La inmunología en el diagnostico clínico". Ceja. Colombia. Pp. 86-87
- Galaktionov VG. 2004. "Evolutionary development of the immunoglobulins super family". Izv Akad Nauk Ser Biol,, (2): 133-45.
- García Tamayo F. 1997. "Fundamentos de Inmunobiología". Universidad Autónoma de México. Pp. 551.
- García-Cozar F. Aguado E. y Peña J. 2014. "Inmunoglobulinas". Tomado de: <http://www.uco.es/grupos/inmunologia-molecular/inmunologia/tema03/etexto03.htm>
- García-Gómez C, Gortares-Moroyoqui P. y Drogui P. 2011. " Contaminantes emergentes: efectos y tratamientos de remocion". Quimica Viva. 2(10) Pp. 96-105
- Gbiosciences.2014. "Dot Blot Analysis-Teacher's Guidebook". Tomado de : http://www.gbiosciences.com/PDF/Protocol/502_Dot_Blot_Analysis_TEACHER.pdf

- Giamarellou H. y Antoniadou A. 2001. "Antibiotic therapy. Antipseudomonal antibiotics". *Medical clinics of North America*. 85(1).
- Gilbert DN. 2000. "Aminoglycosides". In: Mandel, Douglas and Benett's Principles of Infectious diseases. 5th ed. Churchill Livingstone. USA. Pp 307-336.
- Granados O. y Meza G. 2007. "A direct HPLC method to estimate streptomycin and its putative ototoxic derivative, streptidine, in blood serum: Application to streptomycin-treated humans". *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*. 43 Pp. 625-630
- Gupta RK, Relyveld EH, Lindblad EB, Bizzini B, Ben-Efraim S. y Gupta CK. 1993. "Adjuvants-a balance between toxicity and adjuvanticity". *Vaccine* (11):293-306
- Guzmán-Vázquez E. 2004. "Las pruebas Elisa". *Gac Med Mex*. 140(3) Pp. 48-49.
- Halden R. 2010. "Introduction to contaminants of emergin concern in the environment: ecological and human health considerations". American Chemical Society. Cap 1. pp. 1-6
- Handbook of experimental Immunology. Vol. 1. Immunochemistry. Tercera edición. Editado por D.M. Weir. Blackwell Scientific Publications. 1979. pp 7.1
- Haruhiko N., Kannan K., Jones P. y Giesy J. 2005. "Determination of fluoroquinolone antibiotics in wastewater effluents by liquid chromatography-mass spectrometry and fluorescence detection". *Chemosphere*, 58(6) pp. 759-766
- Henríquez D. 2012. "Presencia de contaminantes emergentes en aguas y su impacto en el ecosistema; estudio de caso: productos farmacéuticos en la cuenca del río Biobío, región del Biobío, Chile". Tesis para optar por el grado de Magister en ciencias de la ingeniería, mencion recursos y medio ambiente hídrico. Universidad Chile. Pp. 223
- Hermanson T. Greg. 2013. *Bioconjugate Techniques*. 3d edition. Thermo Fisher Scientific. USA. 1186 pp.
- Hernando MD., Heath E., Petrovic M. y Barceló D. 2006. "Trace-level determination of pharmaceutical residues by LC-MS/MS in natural and treated waters, a pilot-survey study". *Anal Bioanal Chem*. 385(6):Pp. 985-991.
[http://mcb.berkeley.edu/courses/mcb150/lecture4/Lecture4\(6\).pdf](http://mcb.berkeley.edu/courses/mcb150/lecture4/Lecture4(6).pdf)
<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/jps.20727/full>
<http://pmep.cce.cornell.edu/profiles/extoxnet/>
- láñez Pareja E. 2014. "Curso de inmunología general: 4. Antígenos". Universidad de Granda. Departamento de microbiología. Tomado de :http://www.ugr.es/~eianez/inmuno/cap_04.htm
- láñez Pareja E. 2014. "Curso de inmunología general: 5. Inmunoglobulinas y otras moléculas de células B". Universidad de Granda. Departamento de microbiología. Tomado de :http://www.ugr.es/~eianez/inmuno/cap_05.htm
- Javois C. Lorette. 1999. *Inmunocytochemical methods and protocols*. 2do edition. Human press. USA. 465pp.
- Jiménez C. 2011. "Contaminantes orgánicos emergentes en el ambiente: productos farmacéuticos". *Revista lasallista de investigación*. 8(2): Pp. 143-153.
- Jiménez R. 2011. "Iniciativa con proyecto de decreto por la cual se transforma el artículo 16 de la ley de aguas del Distrito Federal". *Gaceta parlamentaria de la ALDF*. 126-A (2) pp. 296-303
- Jin Y., Jang JW., Lee MH. Y Han CH. 2006. "Development of ELISA and immunochromatographic assay for the detection of neomycin". *Clinical Chimica Acta*. 368 Pp. 260-266.
- K.G. Karthikeyan y Michael T. Meyer, 2005, "Occurrence of antibiotics in wastewater treatment facilities in Wisconsin, USA", *Science of The Total Environment*, 36 (1-3) pp. 196-207
- Kolaskar S. y Tongaonkar PC. 1990. "A semi-empirical method for prediction of antigenic determinants on protein antigens". *FEBS Lett*. 10;276(1-2):172-4.

- Lesmes L. 2011. "Evaluación de la respuesta funcional de anticuerpos inducidos por pseudopeptidos y su impacto en el desarrollo de potenciales nuevos medicamentos para la malaria. Universidad Nacional de Colombia. Tesis de maestría. Pp. 69-80.
- L'Hommedieu Ch. Huber PA. Y Rasch DK. 1983. " Potentiation of magnesium-induced neuromuscular weakness by gentamicin". *Crit Care Med.* 11(1):55-56.
- Loredo Silva MT., Avilés SJ., Alcaraz Spinola O. y Barrón Navaez C. 1980. "Determinación en suero de las tres principales inmunoglobulinas (IgG, IgM, IgA) en la población de la Universidad Nacional Autónoma de México". 89(2): 139-147.
- Lorholary O., Tod M., Cohen Y. y Petitjean O. 1995. "Aminoglucósido". *Clin Med NA. Tratamiento antimicrobiano. Parte II.4:* 745-770.
- Lösch L., Merino L. y Alonso J. 2005. "Resistencia antimicrobiana de cepas de *Pseudomonas aeruginosa* aislada de fuentes de agua en la provincia del Chaco (Argentina)". Universidad Nacional del Nordeste. *Comunicaciones científicas y tecnológicas 2005.* Pp. 4
- Magi B. y Liberatori S. 2005. "Inmunoblotting Techniques". *Methods Mol Biol.* 295(1) Pp. 227-254.
- Manual de laboratorio de Inmunología. 1998. Departamento de Inmunología. Escuela Nacional de Ciencias Biológicas. ENCB-IPN. México
- Mattie H., Craig WA. Y Pechére JC. 1989. "Determinants of efficacy and toxicity of aminoglycosides". *J Antimicrob Chemother.* 24:281-293.
- McGlinchey T., Rafter P., Regan F. y McMahon G. 2008. " A review of analytical methods for the determination of aminoglycoside and macrolide residues in food matrices". *Analytical Chimica Acta* 624 (1) pp. 1-15
- Melchers F. 2005. "The pre-B-cell receptor: selector of fitting immunoglobulin heavy chains for the B-cell repertoire". *Nat Rev Immunol.*, 5: 578-84.
- Meza G. y Aguilar-Maldonado B. 2007. " Streptomycin action to the mammalian inner ear vestibular organs: Comparison between quinea pigs and rats". *Comparative biochemistry and physiology.* 146(1) Pp. 203-206
- Mingeot-Leclercq M-P. y Tulkens PM. 1999. " Aminoglycosides: nephrotoxicity". *Antimicrob Agnt Chemother.* 43(5): 1003-1012
- Moore PA. Y Kery V. 2009. "High-throughput protein concentration and buffer exchange comparison of ultrafiltration and ammonium sulfate precipitation. *Methods Mol Biol.* 498:309-314.
- Moreno GS., Ramos JG., Rodríguez HA., Varayoud JG., Muñoz del Toro MM. Luque EH. 2006. " Obtencion y purificación de anticuerpos contra receptor de progesterona humano para ser aplicado en el diagnóstico inmunohistoquímico de biopsias oncológicas". *Décimo Encuentro de Jóvenes Investigadores de la Universidad Nacional del Litoral y Primer Encuentro de Jóvenes Investigadores de Universidades de Santa Fe.*
- Nordström L., Ringberg H., Cronberg S., Tjernström O. y Walder M. 1990. "Does administration of a single daily dose affects its efficacy and toxicity?". *J Antimicrob Chermother.* 25: 159-173.
- Núñez L., Carina T., Puentes N. y Moreton J. 2011. " Bacterias resistentes a antibióticos en aguas grises como agentes de riesgo sanitario". *Ambiente & Água - An Interdisciplinary Journal of Applied Science.* 7(1). Pp. 1-9
- Palomino J. y Pachón J. 2003. "Aminoglucósido". *Enfermedades infecciosas Microbiología Clínica.* 21(2): Pp. 105-115.
- Peña O., Sosa A., Echeverri O., Saenz H. y Barrera L. 2005. "Producción de anticuerpos policlonales IgG contra la proteína iduronato-2-sulfato sulfatasa y desarrollo de un sistema de detección para IDS humana recombinante". *Biomedica.* 25:181-188.
- Pérez M., Soto E. y Vega R. 1991. "Streptomycin blocks the postsynaptic effects of excitatory amino acids on the vestibular system primary afferents". *Brain research.* 563(1) Pp. 221-226

- Petrovic M., González S. y Barcelo D. 2003. "Analysis and removal of emerging contaminants in wastewater and drinking water", *Trends Anal. Chem.*, 22 (10): 685-696.
- Postigo C., López de Alda M. y Barceló D. 2011. "Evaluation of drugs of abuse and trends in a prison through wastewater analysis". *Environment International*, 37.Pp. 49-55
- Postigo C., López M. y Barceló D, 2010. "Drugs of abuse and their metabolites in the Ebro River basin: Occurrence in sewage and surface water, sewage treatment plants removal efficiency, and collective drug usage estimation". *Environmental International*. 3. Pp. 75-84
- Prados G. 2010. *Tratamientos de aguas para la eliminación de antibióticos - Nitroimidazoles - mediante adsorción sobre carbono activado y tecnologías avanzadas de oxidación*". Tesis Doctoral. Universidad de Granada.
- Ramos C. 2009. "Medicamentos de consumo humano en el agua, propiedades físico-químicas". *Revista cubana de higiene y epidemiología*. 47(2).
- Ritter M. 2000. "Polyclonal and monoclonal antibodies". *Methods in molecular medicine* 40(2) 23-33.
- Rizzo L., Manaia C., Merlin C., Schwartz T., Dagot C., Ploy MC. y Fatta-Kassinos D. 2013. "Urban wastewater treatment plants as hotspots for antibiotic resistant bacteria and genes spread into the environment: A review". *Science of the total environment*. 447(1) pp. 345-360.
- Roberts PH y Thomas KV. 2006." The occurrence of selected pharmaceuticals in wastewater effluent and surface waters of the lower Tyne catchment". *Science of the Total Environment*, 356:143–153
- Rodriguez-Alvarez M. 2002. "Aminoglucósido". *Enfermedades infecciosas y microbiología*. 22 (1): 20-30.
- Rojas-Espinosa Oscar. 2006. "Inmunología (de memoria)". Editorial medica Panamericana. 3ra edición. Mexico. Pp. 525.
- Scarpa F., Diriba-Megersa D., Karim S. y Bitow-Meles D. 2011. "Reuse of Water; Methods to diminish non-biodegradable organic compounds". *WWT Project Work*. 1 (1) pp. 24.
- Shakil S., Khan R., Zarrilli R. y Khan AU. 2008. "Aminoglycosides versus bacteria, a description of the action, resistance mechanism, and nosocomial battleground". *J Biomed Sci*. 15(1): Pp. 5-14.
- Stec J., Bicka L. y Kuzman K. 2004. " Isolation and purification of polyclonal IgG antibodies from bovine serum by high performance liquid chromatography". *Bull vel inst Pulway*. 48:1 321-327 pp.
- Straterov S. Vasilenko O. Gabalov K. Pristensky D. Yermilov D. Aksinenko N. Shchyogolev S. y Dykman L. 2008. " Preparation of polyclonal antibodies to diminazene and its detection in animal blood samples". *International immunopharmacology*. 8(10):Pp. 1418-1422.
- Toledo A. 2002. "El agua en Mexico y el mundo". *Gaceta Ecologica*. 64 pp. 9-18
- Tomas TM., Shave EE., Bate IM., Gee SC., Franklin S. y Rylatt DB. 2002. "Preparative electrophoresis: a general method for the purification of polyclonal antibody". *Journal of chromatography A*. 944(1) 161-163
- Wang S., Bian Q., Liu Z., Feng Y., Lian N., Chen H., Hu C., Dong Y. y Cai Z. 1999. " Capability of serum to convert streptomycin to cytotoxin in patients with aminoglycoside-induced hearing loss". *Hearing research*. 137 Pp. 1-7
- Wang W., Singh S., Zeng DL., King K. y Nema S. 2007. "Antibodystructure, instability and formulation", *Journal of pharmaceutical sciences*.
- Wilson K. y Walker J., 2010, "principles and techniques of biochemistry and molecular biology". 7th edition. Cambridge University Press. UK.
- Windbichler N. y Schroeder R. 2006. " Isolation of specific RNA-binding proteins using streptomycin-binding RNA aptamer". *Nature protocols*. 1 pp. 637-640

Winpenny J., Heinz I. y Koo-Oshima S. 2013. "Reutilizacion del agua en la agricultura: ¿Beneficios para todos?". Informe sobre temas hidricos FAO. 35 pp.124

Yu X. Zuo J., Li R., Gan L., Li Z. y Zhang F. 2014. "A combined evaluation of the characteristics and acute toxicity of antibiotics in wastewater". Ecotoxicology an enviromental safety. 106 (1) pp. 40-45

Zuccato E., Castiglioni S., Bagnati R., Melis M. y Fanelli R. 2010. "Source, occurrence and fate of antibiotics in the Italian aquatic environment". Journal of Hazardous Materials. 179(1-3) pp. 1042-1048

