

**OBTENCION DE UN ANTICUERPO MONOCLONAL CON
ACTIVIDAD ANTI-DINITROFENOL**

CECILIA MARTINEZ CASTILLO

1982



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

TESIS CON FALLA DE ORIGEN

CONTENIDO

	Pag.
Agradecimientos	i
Resumen	ii
Lista de tablas	iii
Lista de figuras	iv
Abbreviaturas empleadas	v
CAPITULO I	INTRODUCCION
1.1 Inducción de plasmacitomas	1
1.2 Fusión celular	7
1.3 Utilización de los hibridomas	22
CAPITULO II	MATERIAL Y METODOS
2.1 Animales	27
2.2 Preparación del inmunógeno 2,4-dinitrofenol	27
2.3 Inmunización de los ratones con DNP-KLH	27
2.4 Células tumorales	28
2.5 Obtención de linfocitos de ratón para la formación del híbrido	29
2.6 Fusión	29
2.7 Clonación	30
2.8 Expansión	32
2.9 Purificación de los anticuerpos ...	33
2.10 Caracterización de los anticuerpos.	35
CAPITULO III	RESULTADOS
3.1 Cinética de respuesta a DNP de los ratones inmunizados con DNP-KLH ...	36
3.2 Fusión	36
3.3 Clonación	40
3.4 Expansión	42

	3.5 Purificación de los anticuerpos	44
	3.6 Caracterización de los anticuerpos.....	50
	3.7 Cuantificación de los anticuerpos	62
CAPITULO IV	DISCUSION	65
	CONCLUSIONES	72
	APENDICE A	
	Medios de cultivo	73
	APENDICE B	
	Soluciones amortiguadoras	75
	APENDICE C	
	Resinas	79
	APENDICE D	
	Técnicas de detección de anticuerpos	81
	BIBLIOGRAFIA	86

RESUMEN

La obtención de anticuerpos homogéneos con actividad dirigida contra un solo determinante antigénico, involucra la fusión de células somáticas que puede efectuarse bajo ciertas condiciones mediante la técnica de hibridación celular, la cual esencialmente in mortaliza células formadoras de anticuerpos y permite la producción ilimitada de anticuerpos específicos contra casi cualquier antígeno.

En este trabajo se fusionaron células plasmáticas de ratones previamente inmunizados contra DNP con células de mieloma no secretoras de inmunoglobulinas, usando el PEG como fusógeno. Se mantuvieron en medio selectivo que permitió el crecimiento del híbrido con la concomitante eliminación de los tipos celulares progenitores no fusionados. Posteriormente el híbrido se clonó por las técnicas de dilución limitante y por agar blando. De este modo se originó una clona que secretó una inmunoglobulina de la clase IgG con actividad anti-DNP, la cual se expandió tanto in vitro como in vivo. Finalmente se purificaron los anticuerpos del líquido de ascitis, durante la purificación y caracterización de los mismos se encontró que se trata de una inmunoglobulina de la subclase IgG₃ con actividad anti-DNP y con un solo punto isoeléctrico, lo cual sugiere que el anticuerpo obtenido es homogéneo y con actividad monoespecífica.

LISTA DE TABLAS

TABLA

- I Tumores productores de inmunoglobulinas en ratones
- II Frecuencia de las clases de inmunoglobulinas producidas por plasmocitomas de ratones de la cepa BALB/c
- III Cronología de eventos en la historia de la hibridación de células somáticas.
- IV Cinética de respuesta a DNP de los ratones inmunizados
- V Cultivos positivos en su respuesta a DNP los cuales se clonaron por las técnicas de agar-blando y dilución limitante.
- VI Hemaglutinación pasiva de sobrenadantes de cultivo y de líquido de ascitis antes de precipitar con SSSA
- VII Hemaglutinación pasiva de sobrenadantes de cultivo y líquido de ascitis precipitados con SSSA
- VIII Hemaglutinación pasiva de las inmunoglobulinas separadas por cromatografía con DEAE-celulosa de los sobrenadantes de cultivo y de líquido de ascitis.
- IX Inhibición de la hemaglutinación con DNP-ficolli del anticuerpo purificado de líquido de ascitis.
- X Hemaglutinación pasiva del anticuerpo purificado de líquido de ascitis en varias columna de DOWEX.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA

- 1 Cinética de respuesta a DNP determinada mediante la técnica de hemólisis localizada en gel.
- 2 Perfil cromatográfico en columna con DEAE-celulosa de las inmunoglobulinas precipitadas con solución saturada de sulfato de amonio.
- 3 Inmunolectroforesis de las inmunoglobulinas obtenidas de líquido de ascitis de ratón y de sobrenadantes de cultivo.
- 4 Perfil cromatográfico en columna con DOWEX-I del conjugado DNP-anticuerpo obtenido de líquido de ascitis.
- 5 Dobleinmunodifusión del anticuerpo purificado de líquido de ascitis de ratón frente a varias diluciones de diferentes acarreadores acoplados a DNP.
- 6 Dobleinmunodifusión del anticuerpo purificado de líquido de ascitis de ratón frente a varias diluciones de DNP-KLH.
- 7 Electroforesis reductora en gel de poliacrilamida con 2-mercaptoetanol y BSS al 10 %.
- 8 Dobleinmunodifusión del anticuerpo purificado de líquido de ascitis de ratón frente a antisueros de ratón producidos contra las diferentes clases de inmunoglobulinas del mismo.
- 9 Isoelectroenfoque del anticuerpo purificado de líquido de ascitis de ratón, en condiciones reductoras.

ABREVIATURAS EMPLEADAS

AcM	anticuerpo(s) monoclonal(es)
AB	amortiguador de boratos
ABM	amortiguador barbitol modificado
AF	amortiguador de fosfatos
ASF	amortiguador salino de fosfatos
CFA	células formadoras de anticuerpos
cm	centímetro
DEAE	diethylaminoetil-celulosa
DO	densidad óptica
DNP	dinitrofenol
DSS	duodecilsulfato de sodio
FC	fusión celular
GRC	glóbulos rojos de carnero
HAT	hipoxantina, aminopterina y timidina
HGPRT	hipoxantina guanina fosforribosil transferasa
HP	hemaglutinación pasiva
HT	hipoxantina timidina
h	horas
i.p.	intraperitoneal
i.v.	intravenosa
KLH	hemocianina
M	molar
MCC	medio de cultivo completo
MCI	medio de cultivo incompleto
MEMD	medio Eagle modificado por Dulbecco
mg	miligramos
min	minutos
µg	microgramos
µl	microlitros
µm	micrometros
N	normal
nm	nanometros
PEG	polietilenglicol
PIM	partículas intramembrana
SFB	suero fetal bovino
SSB	solución salina balanceada
SSI	solución salina isotónica
SSSA	solución saturada de sulfato de amonio
TEMED	tetrametiletilendiamina
TK	timidina kinasa
TNP	trinitrofenol
TRIS	hidroxilaminometano
v/v	volumen a volumen
lg	gravedades
8-aza	8-azaguanina

CAPITULO I INTRODUCCION

1.1 Inducción de plasmacitomas. Los tumores asociados con la producción de inmunoglobulinas son los linfomas y los plasmacitomas o mielomas. Ambos tumores representan derivados neoplásicos de varios tipos celulares dentro de las células del sistema inmunocompetente; la inmunoglobulina producida puede ser secretada o estar unida a la superficie celular o ambas (Tabla I).

Los tumores productores de inmunoglobulinas más ampliamente estudiados en ratón son los plasmacitomas, ya que parecen originarse de células especializadas de tal forma que pueden producir únicamente un solo tipo molecular de inmunoglobulina.

Los plasmacitomas se consideran de origen monoclonal debido a que la inmunoglobulina que produce cada tumor es homogénea. Por lo que cada célula que origina un plasmacitoma tiene origen independiente y está restringida a producir únicamente una sola clase de inmunoglobulina. No se puede afirmar que cada tumor o célula normal (célula plasmática) producen únicamente una sola clase de inmunoglobulina; sin embargo, existen pocas excepciones (82,96,103,138) pues al menos se producen dos clases diferentes de inmunoglobulinas.

Existen potencialmente tres tipos de tumores que se relacionan con la producción de inmunoglobulinas:

- 1) Plasmacitomas
- 2) Neoplasias linfomatosas que, aunque derivan de precursores de células plasmáticas, la producción de inmunoglobulinas no está asociada consistentemente con estos tumores, por ejemplo, los sarcomas y las leucemias.
- 3) Un tercer tipo potencial de tumor asociado con inmunoglobulina

T A B L A I

TUMORES Y SUS RECEPTORES DE INMUNOGLOBULINAS EN RATONES
Shevach, 1972 (119)

Inmunocitos normales de los cuales se originan los tumores	Producción de inmunoglobulinas		Designación patológica del tumor.
	Superficie celular	Secretora	
Linfocito B	+	-	Neoplasma linfocítico
Linfocito T	+ ^a	-	Neoplasmas (leucemias)
Inmunoblastos	?	+	Leucemia celular plasmática, neoplasma celular-reticular tipo B ^c
Célula plasmática	+ ^b	+	Plasmacitoma (mieloma)
Linfoplasmacito	?	+	Linfoma

a Las inmunoglobulinas de la superficie de los linfocitos T son muy difíciles de demostrar

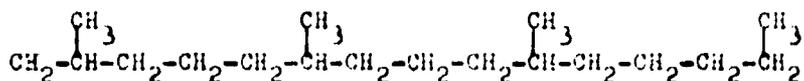
- Los neoplasmas de células T (leucemias en ratón) son los neoplasmas linforreticulares más comunes en ratón. En estos tumores no se ha demostrado la presencia de receptores para inmunoglobulinas

b El neoplasma celular reticular tipo B es un tumor pleomórfico en la clasificación de Dann. Este neoplasma contiene una mezcla de tipos celulares que pueden ser muy dendríticos y que están asociados con fibras reticulares.

c En algunos plasmacitomas se ha demostrado que tienen inmunoglobulinas en su superficie.

linas, son los tumores que presentan inmunoglobulinas como receptores en su superficie y no tienen el potencial para secretarlas (96,119).

Plasmacitomas. En ratones los tumores de células plasmáticas (plasmacitomas) pueden inducirse experimentalmente en ratones de cepas singénicas. Mervin y Algire (77) fueron los primeros en inducir plasmacitomas en ratones de la cepa RALB/c al probar la sobrevida de un tejido alógeno en cámaras millipore implantadas en la cavidad peritoneal. Posteriormente se utilizaron otros agentes inductores como la mezcla de adyuvante-estafilococo (104), aceite mineral (105), pristán (2,6,10,14-hexil octadecano). Este último fue aislado, en 1917 por T. Sujimoto, de hígado de tiburón. Estudios posteriores han mostrado que su origen es probablemente biogénico ya que constituye entre el 1 y 3 % del cuerpo de varias especies marinas de copépodos.



2,6,10,14-hexil octadecano (PRISTAN)

Estos compuestos no están implicados en la formación de tumores, sino que los tumores se originan en el granuloma oleoso peritoneal y parece ser que se requiere de este ambiente para desarrollarse.

Aunque la inducción del tumor es fácil, el proceso por el que evoluciona es muy complejo. Se han descrito varios factores para este proceso:

Genéticos: Existe cierta susceptibilidad de las cepas singénicas de ratones, entre los más frecuentes SBA/2, A/He, A/LN, CBH/He, C56BLK u SWR. Esta restricción de cepas, así como de sus res-pectivos híbridos sugiere que hay genes específicos involucra-

dos en el desarrollo de los tumores.

Hormonales: Se observa mayor incidencia en machos que en hembras, por lo que la testosterona juega un papel importante en el desarrollo del tumor, siendo esto confirmado por Takakura y col. (127) ya que propicia su crecimiento, mientras que la progesterona y el estradiol lo inhiben. Así mismo el cortisol tiene un efecto inhibitorio tanto en machos como en hembras, pues inhibe la respuesta inflamatoria en el tejido conectivo de la cavidad peritoneal. Por otra parte, existen otras hormonas como la adrenocorticotrópica, la tiroestimulante, la estimulante de los folículos y la luteinizante que tienen un efecto casi nulo en la incidencia de tumores, no así las hormonas prolactina y del crecimiento que tienen un efecto comparable con el del aceite mineral.

Inmunosupresores: Mandel y de Cosse (72) probaron el efecto del suero anti-linfocítico, de la timectomía y la irradiación, así como de la ciclofosfamida y la azatrioprina; siendo el primero el único que aumenta la incidencia de tumores y los dos últimos los que la reducen drásticamente.

Ambiente antigénico: McIntere y Prinler (75) trabajando con animales tanto libres de gérmenes como con los que tienen flora bacteriana normal, encontraron que probablemente la flora gastrointestinal y del tracto respiratorio provee una fuente continua de antígenos naturales que estimulan la producción de células plasmáticas, dando por resultado, en animales libres de gérmenes, una baja incidencia de tumores.

Además de estos factores se postula que los virus juegan un papel importante en la formación de este tipo de tumores, ya que se han encontrado partículas tipo A intracitoplasmáticas en casi todas las células de los plasmocitos examinados por microscopía electrónica.

Por lo general, el tipo de cadena pesada que se produce en las células plasmáticas es la de la IgA. Esta preponderancia de clase

sugiere que las células diferenciadas a producir IgA son más susceptibles de tener una transformación neoplásica que otro tipo de células plasmáticas lo cual puede deberse a:

- 1) Susceptibilidad de las células para diferenciarse a producir IgA
- 2) Cierta predilección de las células productoras de IgA a migrar al tejido peritoneal, que es el sitio donde se induce el desarrollo neoplásico.

La distribución de plasmacitomas productores de las diversas clases de inmunoglobulinas difieren marcadamente de la concentración de las clases de inmunoglobulinas encontrada en el suero normal e indica que el evento de la transformación parece mostrar cierta predilección por algunas células plasmáticas (Tabla II).

Antes de 1964 se había tenido mucha dificultad en establecer líneas de plasmacitomas de ratón en cultivo. No fue sino hasta 1966 que Pettingill y Sorenson pudieron establecer la línea X5563 después de un cuidadoso periodo de adaptación. Esta línea había sido transplantada en ratón en 1956 y hasta la fecha produce la misma inmunoglobulina. Por el mismo tiempo L. Sachs y col. adaptaron la línea MOPC-21 (P3) a cultivo, la cual producía grandes cantidades de IgG₁. Esta línea no se recuperó después de haber sido congelada. Posteriormente otra línea P3K fue establecida por Horibata y Harris y al ser recuperada después de haber sido congelada se distribuyó a otros laboratorios. Por otro lado Scharff y col. establecieron la línea MPC-11.

Las líneas celulares P3 y MPC-11 fueron utilizadas para estudios de síntesis de inmunoglobulinas in vitro, así como en estudios de clonación y mutagénesis, lo que dio por resultado la existencia de mutantes no secretoras. Por otro lado Milstein derivó

T A B L A II

FRECUENCIA DE LAS CLASES DE INMUNOGLOBULINAS PRODUCIDAS
 POR PLASMACITOMAS DE RATONES DE LA CEPA BALB/c . Morse
 y col., 1978 (30)

Clase de inmunoglobulina	Porcentaje de plasmacitomas
IgM	1.1
IgG ₁	6.4
IgG _{2a}	4.5
IgG _{2b}	8.1
IgG ₃	0.7
IgA	45.5
Clases múltiples	6.6
Cadenas ligeras	2.2
Clases no determinadas	0.0
Clases no detectadas	24.9

una sublínea de P3 resistente a 8 azaguanina ahora llamada P3/X63 -Ag8. Esta línea fue utilizada primeramente para estudiar fusión de dos células plasmáticas, lo que reveló que las células híbridas producían ambas proteínas de mieloma, por lo que Köhler y Milstein (1975) fusionaron una célula plasmática normal con X63 y obtuvieron el resultado de que el híbrido producía tanto la proteína de la línea MOPC-21 así como un anticuerpo contra glóbulos rojos de cerdo. Por lo que se consideran como los pioneros de la técnica de hibridación celular, la cual esencialmente "inmortaliza" células individuales formadoras de anticuerpos y permite la producción de cantidades ilimitadas de anticuerpos monoespecíficos homogéneos contra casi cualquier antígeno sin que necesariamente esté puro.

Además Köhler y Milstein mostraron que la fusión entre una célula normal secretora de anticuerpo y células de mieloma podría realizarse utilizando virus de Sendai. Las células resultantes continuaban secretando inmunoglobulinas de ambas células y retenían las propiedades malignas del mieloma progenitor. Esto aclaró que, debido a la naturaleza clonal de la respuesta inmune, esta técnica podría resultar en la producción de anticuerpos absolutamente específicos.

1.2 Fusión celular. Durante la primera década del siglo XIX con el descubrimiento de células multinucleadas, se dieron los primeros indicios de que pudiera ocurrir fusión entre células somáticas. Johannes Müller en estudios histopatológicos en enfermedades como tuberculosis, varicela, viruela y rubéola encontró policlones, los cuales se originaban de múltiples o sucesivas mitosis sin las con-

comitantes divisiones del citoplasma, o de la fusión de células mononucleares preexistentes. En 1927 W. H. Lewis (64) reportó que ambos mecanismos se presentaban tanto in vivo como in vitro. Por ejemplo, el hongo Physarum por mitosis da como resultado un policarion denominado plasmodio. Entre los organismos superiores la fusión no se encuentra con frecuencia excepto en asociación con enfermedades, por consiguiente para diferenciar policariones fusionados de plasmodios, el primero ha sido denominado como sincisio.

A pesar de los adelantos en el siglo XIX, los fibroblastos celulares no fueron descubiertos sino hasta 1900 (Tabla III). En los primeros años de esa década, Barski, Sorieul y Cornefert (4) reportaron el aislamiento de cepas celulares de sarcoma obtenidas de una sola célula de ratón, la cual fue aislada posteriormente. Las líneas celulares eran distinguidas unas de otras por los caracteres: Por su habilidad para inducir tumores al ser inyectadas a un organismo recipiente histocompatible y por el número de cromosomas y su morfología.

Existen membranas celulares que se pueden fusionar intracelularmente o intercelularmente con bastante frecuencia. Para el primer caso se tienen ejemplos como la endocitosis, lisosomas y gránulos de secreción. Para la fusión intercelular se tienen ejemplos como la fertilización del óvulo por el espermatozoide (11), la plasmogamia en hongos (98), la formación de miotúbulos (39), osteoclastos y células gigantes (36), así como en los eventos de implantación del embrión en el útero (sincisio trofoblástico). Llama la atención porque, sin embargo, otras estirpes celulares no se fusionan con frecuencia.

T A B L A III

CRONOLOGIA DE EVENTOS EN LA HISTORIA DE LA HIBRIDACION DE CELULAS SOMATICAS

- 1960 Baraki, Sorieul y Cornefert descubren hibridos celulares formados in vitro por fusión celular espontánea.
- 1957 Okada demostró que el virus de Sendai inactivado con luz ultravioleta puede usarse para fusionar células in vitro para generar hibridaciones. Sorieul y Ephraussi, confirman los resultados de Baraki y col.
- 1962 Gershon y Sachs, confirman los resultados de Baraki y col.
- 1964 Littlefield, introduce el uso de células mutantes y medio de cultivo selectivo para la separación de células híbridas.
- 1965 Harris y Watkins e independientemente Okada y Murayama, producen el primer heterocarión específico usando el virus de Sendai inactivado. Ephraussi y Weiss, producen el primer sincarión interespecífico por fusión espontánea.
- 1966 Yerganian y Hall, demostraron que el virus de Sendai puede usarse para producir híbridos. Davison, Ephraussi y Yamamoto, usando células de melanoma y células no pigmentadas, demostraron que un marcador fenotípico de diferenciación histioplásmica (pigmentación) puede ser eliminado selectivamente en los híbridos.
- 1967 Weiss y Green, descubrieron la eliminación preferencial de los cromosomas humanos en los híbridos ratón-humano y demostraron que este fenómeno puede usarse para mapear genes en el hombre. Watkins y Dalbecco e independientemente, Kopro-waki y col, demostraron la liberación de virus cuando partículas activas SV40 emergen de híbridos derivados de células transformadas y permisivas.
- 1969 Harris, Klein y sus colegas iniciaron experimentos donde demostraron que la malignidad no necesariamente domina en sincariónes derivados de células normales y oncogénicas.
- 1970 Lucy y col., iniciaron los experimentos para inducir fusión con lectinas. Cocking y col. posteriormente fusionaron protoplastos de plantas.
- 1971 Radde, Bodmer, Miller, Siniscalco, Boostema y col. comenzaron con el uso sistemático de la hibridación celular como un sistema experimental para el mapeo de cromosomas humanos.
- 1972 Carlson, Smith y Dearing, produjeron un híbrido interespecífico de la fusión de protoplastos de plantas.
- 1975 Köhler y Milstein, desarrollaron la técnica de hibridoma como una fuente de anticuerpos homogéneos con actividad monoespecífica.

Después de la fusión se forman células multinucleadas denominadas heterocariones. Si estas células llevan a cabo la división, fusionan su núcleo y las células hijas poseen un sólo núcleo conteniendo cromosomas de cada célula progenitora y se denominan híbridos. Mientras que algunos híbridos son estables, hay otros en los que se manifiesta una tendencia general para perder cromosomas y en algunos casos los cromosomas de un progenitor se pierden preferencialmente (142).

Aunque gran parte de la importancia histórica de los estudios de células somáticas híbridas estaba basada en la fusión celular - (FC) espontánea, actualmente se conoce que la FC puede ser inducida por el uso de ciertos agentes, tales como los virus, las lectinas y el polietilenglicol (PEG).

En el caso de los virus, debido a la gran variedad de tipos celulares susceptibles al virus de Sendai, que pertenece al grupo de los paramixovirus, es el más utilizado como agente fusionante para generar híbridos celulares. El virus de Sendai se caracteriza por presentar afinidad por las glicoproteínas de la membrana celular a las cuales ataca enzimáticamente, posee una envoltura lipídica rodeada de "picos", tiene una ribonucleoproteína de elevado peso molecular con estructura helicoidal y es una partícula pleomórfica de 5000 Å de diámetro.

Sheid y Choppin (118) observaron que los virus de Sendai crecidos en cultivos de células de riñón, presentaban una glicoproteína de 65 000 daltones y carecían de dos funciones: La hemolítica y la fusionante; sin embargo, si esta glicoproteína era digerida tripticamente y reducida a 53 000 daltones, presentaban las dos funciones. Por consiguiente existe cierta influencia del huésped para de

terminar si se presenta la glicoproteína más grande e infectiva o la pequeña y potente durante el ensamblaje del virus.

En el virus se ve modificada la cubierta al adicionarse a la envoltura los "picos", antes de que éste sea liberado por la célula huésped. Estos "picos" son protusiones entre 80 y 100 Å y funcionan como hemaglutininas univalentes que en conjunto hacen del virus un agente aglutinante multivalente. Además presentan actividad de neuraminidasa, cuya función es hidrolizar las terminaciones de los residuos de ácido siálico de los oligosacáridos de las glicoproteínas, dando por resultado el poner al descubierto los sitios receptores para el virus en la célula susceptible.

La partícula viral actúa como agente fusionante al fijarse a la superficie de dos células diferentes, poniéndolas en íntimo contacto para efectuar la fusión. Dicho mecanismo depende tanto de la multiplicidad del virus como de las características de las células huésped, presencia de iones, del pH y una fuente de energía.

Multiplicidad viral. Esta es importante para una fusión adecuada ya que dependiendo de las condiciones de fusión varía la relación células-virus.

Características celulares del huésped. Entre las más relevantes se encuentran: a) la presencia de receptores en la superficie de la célula, que implica que solo algunos virus reaccionarán con una célula dada. b) especificidad, la susceptibilidad de las células es variable, siendo las malignas más susceptibles que las no malignas, los cultivos primarios más que los secundarios y las jóvenes más que las viejas. c) además se presenta variación según la etapa del ciclo celular en cultivos sincronizados (85).

Concentración de iones Ca^{++} . Como muchos otros fenómenos relacionados con la interacción de superficies celulares, la fu -

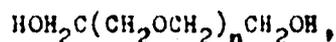
sión inducida por virus se ve influenciada por la presencia de iones Ca^{++} , no así la aglutinación (124).

pH del medio. Okada en 1960 demostró que la fusión de células de ascitis con virus de Sendai era dependiente del pH. Esto puede explicarse por el hecho de que a pH elevado los aniones del amortiguador, fosfato y carbonato precipitan los iones Ca^{++} (86).

Requerimiento de energía. Las células que están llevando a cabo la fusión, al menos en algunos tipos celulares, presentan tanto la respiración aerobia como la anaerobia (glucólisis), por lo que, si la fusión se lleva a cabo a 4°C , disminuye la actividad metabólica y por consiguiente la respiración; sin embargo, la actividad se restablece si después del período a 4°C se incuban a 37°C (143).

En 1974 el PEG fue introducido como un agente aglutinante para protoplastos de vegetales, observándose un alto índice de FC. Un año después Pontecorvo (99) lo experimentó en un sistema de células animales, obteniendo los mismos resultados por lo que propició su utilización como agente fusionante estándar.

El PEG es un polímero de peso molecular elevado cuya estructura química se expresa como sigue:



además es un compuesto relativamente no tóxico para las células, produce alta incidencia de FC, la cual va en relación a su concentración y el peso molecular del PEG que se emplee, obteniendo mejores resultados cuando el PEG se usa a una concentración de 50 % y con un peso molecular entre 300 y 6 000 daltons. Esto sugiere que hay un peso molecular mínimo (300) o un número mínimo de subunidades repetitivas (alrededor de 5) debajo de las cuales el PEG pierde su actividad de fusógeno. Existen otros factores que pueden

afectar la eficiencia de fusión como el pH y la densidad celular(22).

Para poder conocer algo sobre el mecanismo de fusión tanto para el caso de inducción por virus como por agentes no virales es conveniente revisar la arquitectura de la membrana plasmática.

La membrana plasmática está constituida en un 58 a 76 % de proteínas, 20 a 36 % de lípidos y 4 a 6 % de carbohidratos. En los años cincuentas se postuló un modelo conocido como de Davson-Danielli-Robertson o Modelo de la Bicapa, que explica que la membrana está constituida en su interior por lípidos, cuyos extremos hidrofílicos se encontraban orientados hacia fuera, cubiertos ambos extremos por proteínas. Durante la década de los sesentas este modelo perdió popularidad ya que no daba explicación a fenómenos como la fusión, por su relativa ausencia de carbohidratos, su simetría bilateral rígida y su composición de proteínas en configuración β (44). El modelo que se acepta más ampliamente es el de la bicapa de lípidos. Sin embargo, en este modelo las proteínas de la membrana no están excluidas de la bicapa de lípidos, y se encuentran en estado fluido, permitiendo el movimiento extensivo de las proteínas bajo muchos estímulos. El modelo ha sido denominado Modelo del mosaico fluido o Modelo de Singer (121).

Además de la estructura de la membrana existen una serie de eventos que conducen hacia la fusión de células animales: estos eventos incluyen el acercamiento de las células hasta encontrarse en íntimo contacto; entre ellas se tiene a la aglutinación, eliminación de envolturas protectoras de las moléculas de lípidos de la membrana plasmática, rearrreglo físico de las moléculas de lípidos, el llevar a cabo la coalescencia del citoplasma y finalmente la estabilización de las células fusionadas.

La aglutinación es llevada a cabo por aposición cercana de las membranas adyacentes, que interactúan mediante uniones hidrofóbicas la cual es favorecida por agentes fusionantes como el PEG - que causa aglutinación celular, aunque se desconoce como la lleva a cabo. La molécula polimérica ha sido usada como una aglutinina - útil cuando su peso molecular se encuentra entre los rangos de 1500 a 6000 daltons. Ya que el PEG se encuentra ligeramente cargado negativamente en soluciones acuosas, es necesario introducir el efecto adicional del Ca^{++} para formar uniones electrostáticas entre células y llevarse a cabo la aglutinación. Esto puede entenderse por el hecho de que iones divalentes pueden formar puentes entre el PEG y la superficie celular que presenta carbohidratos cargados negativamente (45).

Existen otros agentes aglutinantes como los anticuerpos y las lectinas de plantas, y se ha observado que después del tratamiento con estas últimas se puede llevar a cabo la fusión (122).

No todos los agentes aglutinantes son buenos fusógenos ya que no es sólo el acercamiento de las membranas lo que se requiere para la fusión, sino que, se necesita de las interacciones con los lípidos. Debido a que reconocen los grupos carbohidratos (glicoproteínas y glicolípidos) que forman parte de la capa más externa de la membrana plasmática, pueden impedir el acercamiento de los lípidos de las dos membranas y evitar así la fusión.

Los carbohidratos se encuentran como azúcares neutros (galactosa, manosa y fucosa), acetilaminoazúcares o ácidos silícicos, generalmente se encuentran unidos covalentemente a lípidos y proteínas y pueden tener un papel importante en muchas funciones biológicas (141).

Al encontrarse los carbohidratos en el exterior de la membrana plasmática están implicados en la FC, lo cual se ve reforzado por los siguientes hechos: son responsables de la carga negativa típica en las células a pH fisiológico, son responsables de la especificidad antigénica (grupos sanguíneos), proveen los medios para el reconocimiento célula-célula, determinan los sitios receptores para virus, bacterias, agentes aglutinantes e inductores de exocitosis, y son importantes en el control de la permeabilidad a iones.

Aun cuando se dispone de poca información acerca del mecanismo por el cual el PEG induce FC, se sabe que su iniciación es un evento muy rápido después del tratamiento con el fusógeno. Dicho evento, en un principio, se manifiesta por aglutinación y por la formación de contactos próximos entre las membranas de las células contiguas (48,100). Robinson y col., observaron que la fusión de membrana se manifiesta por una ordenación pentalaminar, una característica asociada con la fusión de membranas en otros sistemas (57,58,90,128). Se ha observado que, después de la FC, hay un intercambio rápido de los antígenos de la superficie celular. Este movimiento puede ser semejante al que se lleva a cabo con cationes divalentes como Ca^{++} , lectinas, anticuerpos o cationes multivalentes como los virus efectuando un desplazamiento de receptores hacia un área y dejando libre otra, fenómeno conocido como "capping" en el caso de anticuerpos y lectinas. Además las cargas negativas de las glicoproteínas contribuyen a despejar la superficie celular y permiten el acercamiento de las dos membranas durante la fusión (115, 130).

Después del tratamiento con PEG el efecto de éste sobre la membrana plasmática no está restringido a regiones especializadas de la misma (2,45,70,108), sino que causa un efecto generalizado sobre la membrana haciendo que todas sus partes sean potencialmente susceptibles a la fusión. Contrariamente a lo observado por Pontecorvo (1977), quien basado en cinemicrografías, sugiere que la fusión ocurre preferencialmente en los extremos de las protuberancias celulares en fibroblastos; otros estudios (48,74) indican que la fusión ocurre inicialmente en pequeñas áreas donde las membranas permanecen en contacto próximo.

Examinando la morfología de la membrana se ha visto que normalmente las membranas celulares no permanecen próximas más de 20 nm, debido a la repulsión electrostática mutua y por el volumen de exclusión de las glicoproteínas de membrana, aunque puede ocurrir la agregación de partículas intramembrana (PIM) por desplazamiento electrostático directo (32). En el caso de fusión de eritrocitos se sabe que las PIM están asociadas con los grupos más fuertemente cargados de la superficie celular (97), aunque son posibles otros mecanismos (32,77). La agregación de PIM parece que no depende del tiempo de tratamiento con PEG, ya que a diferentes tiempos se presenta el mismo grado de agregación (113). Lo que tiene un efecto claramente notable es la temperatura. Cuando se exponen las células a bajas temperaturas después del tratamiento y fusión a 37°C las células muestran un rearrreglo de las PIM. Este rearrreglo no es debido a la baja temperatura sino que las células sin PEG no manifiestan el mismo grado de agregación de las PIM. Posteriormente se encontró que el grado de temperatura que induce agregación varía -

con el tiempo; después del tratamiento con PEG, se encontró un tiempo máximo, transcurrido ese tiempo el nivel de agregación vuelve a su nivel basal. Esta variación en la agregación de las PIM sugiere una posible relación con la FC, ya que puede inferirse que hay una relación entre la fusión y el tiempo de tratamiento con PEG que induce alteraciones en la membrana como lo indica el hecho de que la fusión empieza poco tiempo después (74,99) y no antes (56).

Se ha sugerido que la fusión ocurre en frentes de contacto próximo y ese contacto parece ocurrir solo en pequeñas frentes desprovistas de PIM. Por otro lado, las regiones de la membrana que no están en contacto próximo conservan una distribución azarosa de PIM (48). Parece que el PEG induce una agregación de PIM para facilitar el contacto entre células adyacentes, aunque la fusión se efectúa en regiones desprovistas de tales partículas. La presencia de las PIM se ha descrito en varios sistemas. La mayor parte de estudios tratan con el patrón de distribución de las PIM en células como una función de la composición lipídica de la membrana (33,35,42). Este rearrreglo se ha reportado también para inducción de fusión con otros agentes (135,136).

Acercas del mecanismo por el cual ocurre la fusión de membranas, hay evidencias que sugieren que ocurre vía interacción lípido-lípido en regiones desprovistas de proteínas de las membranas opuestas (41,87,91) aunque se ha propuesto también un mecanismo de fusión basado en la interacción de bicapas desprovistas de lípidos (1,48). Lucy (68) ha sugerido que un cambio en los lípidos de la membrana que permite el paso de bimolecular a micelial favorece la fusión.

Dingle (25) con base en estudios sobre termodinámica de superficie arguye que la fusión de dos membranas que se ponen en contacto y que tienen alta tensión superficial es probable a menos de - que existan en el medio factores estabilizadores como protefmas. - Aunque parece que el reordenamiento estructural de los lípidos no es suficiente para la fusión, ya que existe un rango muy estrecho entre fusión y lisis en el caso de los virus, probablemente se requiere de un mecanismo que estabilice las membranas de tal forma que se preserve su estructura integral. Se ha sugerido que dicha actividad requiere de energía que en las células proviene de su actividad de ATPasa, Na y K; y la asociada a Ca^{++} y no de la proveniente de la mitocondria. Aunque también se ha reportado que en presencia de ATP y Mg^{++} , el Na y K-ATPasa promueven un reordenamiento de las protefmas en eritrocitos humanos. El reordenamiento de las protefmas puede implicar un cambio de configuración de alfa-hélice o globular a una configuración β . Esto invalida la idea de Kavanau(44) de que la fusión de membranas requiere un agrupamiento de las protefmas de membrana y que la estabilización de la fusión requiere una reversión a la forma extendida(β).

Hay evidencias que apoyan el movimiento de las glicoprotefmas de la superficie celular (54,55). En la inducción de fusión con virus, se sabe que las glicoprotefmas pueden ser desplazadas de regiones adyacentes por los enlaces de unión a los sitios virales, facilitando la fusión en esos lugares no obstruidos. Esto demuestra no solo que las glicoprotefmas pueden ser removidas de regiones específicas de la superficie celular sino también muestra que la distribución de las mismas depende de estructuras de la membrana como son los microtúbulos y los microfilamentos. Estas estructuras, fre

cuentemente son agentes de motilidad. El movimiento de las glicoproteínas de la superficie durante la fusión o el "capping" pueden ser consecuencia de su actividad, aunque se ha sugerido también que la carga negativa de las glicoproteínas está implicada en el movimiento de estas últimas durante la fusión. Se ha sugerido, por otra parte, que en la inducción de fusión con PEG no se requiere la ruptura de microtúbulos o microfilamentos durante las alteraciones que sufre la membrana (113), en contraste con lo propuesto en estudios de inducción de fusión por virus y Ca^{++} (135).

La formación de una célula fusionada debe involucrar una redistribución de la membrana y una expansión de las continuidades citoplásmicas. Algunos autores han propuesto que las células fusionadas provienen de células conectadas por pequeños puentes citoplásmicos (2,43,99). Knutton indica que dichos puentes llegan a expandirse por un proceso de engrosamiento celular. En muchos casos es común ver en estadios tempranos de la fusión cómo las células se fusionan con tales continuidades citoplásmicas parcialmente expandidas (48).

Por otra parte, se ha sugerido que la fusión requiere eliminar momentáneamente el Ca^{++} y el ATP de las membranas, de manera que proporcionen una región de baja rigidez la cual sea susceptible de fusionarse; sin embargo, esto puede variar según el sistema y las condiciones de fusión, así como del tipo de fusógeno utilizado.

Emmelot(5) muestra que las uniones estrechas de tejido de rata, donde las membranas de las células contiguas están estrechamente opuestas es donde se presenta alta permeabilidad de membrana. Conjuntamente ha observado que dichas áreas están libres de ácido

siálico.

Estudios bioquímicos muestran que durante la inducción de fusión con PEG hay cambios en la permeabilidad de la membrana (48). La pérdida de asimetría catiónica, como se sabe, tiene lugar en la inducción de fusión con virus de Sendai (102) puede entonces resultar en la entrada de agua y la célula turgirse. El origen de este cambio en la permeabilidad de la membrana es desconocido en el caso de tratamiento con PEG, pero si es posible asegurar que el PEG debe perturbar drásticamente la estructura de la membrana, algunas veces de manera irreversible y, frecuentemente, resultar en la segregación de lípidos. En muchos casos el tratamiento con PEG y la incubación subsiguiente a 37°C tienen el efecto de inducir segregación de las regiones lisas de la membranas, es decir, en las regiones desprovistas de PIM aparece la formación de gotitas identificadas como lípidos (48), que frecuentemente producen burbujas en la superficie celular. Tales perturbaciones de la membrana pueden dirigir los cambios de permeabilidad ya que se ha mostrado que algunas condiciones comprimen la bicapa de lípidos (27).

La entrada de Ca^{++} puede ser una posible causa de las burbujas de lípidos, sin embargo, cambios en la permeabilidad de la membrana cualquiera que sea su origen, conducen a la turgencia celular y deben proporcionar la fuerza que expanda las células conectadas por pequeños puentes citoplásmicos, dando la forma esférica a las células fusionadas.

Consecuentemente, después de que microfilamentos parecidos a la actina y a la miosina que subtienden la membrana plasmática de las células son los agentes responsables de efectuar la unión cito

plásmica y los estabilizadores del sistema de fusión. La generación de energía involucrada en la fusión es empleada principalmente en la actividad de esas fibras. Las condiciones ambientales que favorecen su operación incrementan la fusión. Puede decirse que al tas concentraciones de Ca^{++} y el pH, que ayudan también a la coalescencia de la membrana, conducen al crecimiento celular. Así, cuando las células son reincorporadas al medio de cultivo ideal se restituyen las actividades normales de la membrana y la superficie de la misma se restablece a estados en los cuales promueven el crecimiento celular y evita una fusión posterior.

El hecho de que las células vuelvan a condiciones en las cuales pueden continuar con sus actividades celulares normales, ya como un hibridoma, implica que debe efectuarse una sincronía de actividad ya que la fusión de células, que evidentemente se encuentran en diferentes fases de crecimiento, deben necesariamente sincronizar sus funciones.

La fusión es un evento raro, aun cuando se utilice PEG o virus de Sendai. Por lo tanto, si las células de mieloma se fusionan con células normales, en el cultivo sobrepasarán en número las células tumorales y es necesario asegurar que solo los híbridos crezcan. La estrategia general es la desarrollada por Littlefield (66) quien seleccionó dos líneas tumorales: una de ellas que carecía de la enzima hipoxantina-guanina-fosforribosiltransferasa (HGPRT) y la otra carecía de la enzima timidina kinasa (TK). Ya que aunque la droga aminopterina bloquea la ruta principal de purinas y pirimidinas y por lo tanto en su presencia las células que poseen las enzimas TK y HGPRT cancelan el efecto tóxico de esta droga, si el

medio de cultivo contiene timidina e hipoxantina. Estos últimos pueden ser metabolizados directamente por las enzimas a nucleótidos - (ruta silvestre). Sin embargo las células TK⁻ y HGPRT⁻ carecen de esta ruta y por ende la síntesis de ADN cesa y la célula muere. Si estas células deficientes se fusionan con células normales, los híbridos resultantes, al adquirir las enzimas de la célula normal, - pueden crecer en el medio selectivo que contiene hipoxantina, aminoptericina y timidina (medio HAT).

1.3 Utilización de los hibridomas. Los anticuerpos pueden utilizarse para el análisis y purificación de moléculas contenidas en mezclas antigénicas complejas. Sin embargo, hay que tener en cuenta que contienen anticuerpos con diferentes especificidades y que son heterogéneos. Los antisueros convencionales se obtienen de dos - fuentes: los heteroantisueros que se producen por inmunización entre especies animales y los aloantisueros que son el producto de - la inmunización intraespecífica. Algunas de las características - por las cuales se ha restringido su empleo son: a) es imposible reproducir precisamente un lote de anticuerpos; b) cada antisuero es muy heterogéneo en cuanto a especificidad, afinidad y actividad - biológica; ya que contiene anticuerpos que pertenecen a diferentes clases de inmunoglobulinas y están dirigidos contra muchos determinantes antigénicos; c) se producen en especies diferentes a las - que van a ser utilizados, por lo que si son usados in vivo pueden originar problemas de hipersensibilidad; d) hay diferencias en las respuestas individuales dentro de la misma especie; e) es difícil obtener en grandes cantidades antígenos puros necesarios para -

separar a los anticuerpos de un antisuero dado.

Los anticuerpos monoclonales pueden emplearse como un reactivo químico bien definido, los problemas indicados para un antisuero convencional pueden superarse con su utilización. Además los AcM pueden producirse indefinidamente.

A diferencia de los antisueros convencionales, los anticuerpos producidos por la técnica de hibridoma se caracterizan por ser homogéneos en cuanto a la clase de inmunoglobulina que se produce, afinidad y especificidad, lo cual les confiere ventajas para su uso en muchos campos biológicos.

Por otra parte, pueden prepararse AcM contra componentes singulares de cualquier mezcla compleja; así mismo, pueden producirse cantidades ilimitadas de los distintos anticuerpos, lo cual permite descomponer una mezcla de sustancias en sus partes integrantes. Esto es posible inmunizando animales con la mezcla por analizar; se obtienen clonas híbridas y los anticuerpos derivados de cada clona sirven para separar los componentes de la mezcla en forma secuencial.

La técnica de hibridación celular ha sido utilizada en estudios inmunológicos, en particular para la producción de AcM contra una gran variedad de antígenos como son antígenos de la superficie celular (61,123,139), antígenos de histocompatibilidad (29,92), an tígenos tumorales (126) y en estudios de diversidad de anticuerpos (110). Otras líneas de investigación usan la hibridación celular como una aproximación al entendimiento del mecanismo que controla la expresión de inmunoglobulinas (49,50,62,73). Se ha tenido un progreso rápido en la producción de AcM contra antígenos de célu -

las linfoides de humano. Se han reportado AcM para determinantes del loci HLA (20,97,92,93), β -2-microglobulina (10,131), un antígeno asociado con leucemia linfoblástica aguda (112), monocitos (9), timocitos (63,66,108) y varias poblaciones de linfocitos T (37,108, 109,129). Se han hecho también hibridomas contra receptores (133), hormonas (40), haptenos (28,29,110,120), proteínas (83,88,114), - neuronas (26), virus (83,88,114), parásitos (16,93,94,145) y otros microorganismos. Los hibridomas celulares han sido ya empleados en el mapeo cromosómico de ratón y en el hombre (60,132). Así mismo, se ha encontrado que la habilidad para hacer y aislar híbridos ha abierto nuevas rutas en el análisis de la regulación génica en células eucariotas. Tomando como marcadores las propiedades de las células progenitoras y analizando la expresión de dichas propiedades en el híbrido, se puede analizar la regulación de su expresión. Estos estudios ayudarán sin duda a entender los mecanismos que gobiernan el crecimiento celular, la diferenciación durante el desarrollo embriológico normal, la cicatrización y la formación de tumores.

Se tienen grandes perspectivas de aplicación en el futuro, ya que los AcM promueven la posibilidad de identificar y purificar una gran cantidad de moléculas desconocidas. Se piensa que en este campo se tendrá un fuerte impacto. Los hibridomas serán muy importantes en neurobiología y embriología donde los procesos de reconocimiento célula-célula y morfogénesis deben depender de macromoléculas de la superficie celular todavía no definidas. También en el campo de la farmacología y en el estudio de los receptores de hormonas y neurotransmisores.

Una de las aplicaciones más sugestivas es la investigación en la biología de membranas celulares. Se presenta mucha dificultad en aislar las proteínas de membrana, debido a que se encuentran - cantidades pequeñas; y muchas veces su actividad biológica no es fácilmente medible, o éstas se destruyen al desintegrar la membrana para su análisis. Los hibridomas serán invaluable en la clasificación de las células. Una identificación más precisa de las células tumorales podrán ayudar en el diagnóstico y tratamiento del cáncer. Otro de los aspectos en los cuales es posible utilizar los hibridomas es en terapia tumoral. Podrían producirse anticuerpos - anti-tumor de un tipo de inmunoglobulina adecuada de manera que fueran efectivos en llevar a cabo la lisis tumoral mediante los mecanismos del complemento, por medio de células K o por macrófagos.

Se piensa utilizar los AcM en inmunización pasiva. Dada la im pureza de los anticuerpos convencionales, la inmunización pasiva no es un método generalizado de tratamiento, aunque se confía en su eficacia cuando se puede administrar un anticuerpo purificado y además de la misma especie. Se tienen también grandes probabilidades de aplicación de los hibridomas en trasplantes de órganos para una mejor tipificación de antígenos de histocompatibilidad.

Para la aplicación en terapéutica, es deseable que los anticuerpos procedan de linfocitos humanos y no de ratón o rata, pero contrariamente a lo que se esperaba, la utilización de linfocitos humanos ha resultado difícil. El problema reside en que cuando se fusionan células humanas con células animales hay una pérdida preferencial de los cromosomas humanos en las células híbridas (142), y aun no se ha tenido éxito en la búsqueda de una línea tumoral hu

mana adecuada para el cultivo y la fusión que permita obtener un híbrido intraspecifico.

Debido a las propiedades de los anticuerpos monoclonales, - enunciadas anteriormente, el objetivo de este trabajo es la obtención de un anticuerpo homogéneo con actividad monoespecifica dirigida contra el hapteno 2,4-dinitrofenol, mediante el empleo de la técnica de hibridación de células somáticas.

La hipótesis del trabajo establece que al tener células comprometidas contra 2,4-dinitrofenol y fusionarlas con células de mieloma, algunas de las células híbridas resultantes tendrán actividad contra el DNP.

CAPITULO II MATERIAL Y METODOS

2.1 Animales. En los experimentos realizados se utilizaron ratones machos de la cepa BALB/c con edades entre 6 y 8 semanas los cuales se mantuvieron en el bioterio en cajas de acrílico con tapa de rejilla metálica, a una temperatura de 16 a 20 °C, alimentándose con tabletas de purina (Purina de México, S.A. de C.V.) y agua ad libitum.

2.2 Preparación del inmunógeno 2,4-dinitrofenol-hemocianina. Para la inmunización de los ratones se disolvieron 100 mg de carbonato de potasio (K_2CO_3) en 5 ml de agua, a esta solución se agregaron 100 mg de hemocianina (Keyhole limpet hemocyanin, Calbiochem.) (KLH). Por otro lado, se disolvieron 200 mg de ácido-2,4-dinitrobenzoico sulfónico (Eastman Kodak 1) en 5 ml de agua destilada tibia, se añadieron a la mezcla anterior con agitación constante durante 15 h en la oscuridad y a temperatura ambiente. Después se dializó contra agua destilada con un poco de K_2CO_3 hasta obtener un pH de 7.0 a 7.4. La concentración de proteína se determinó por el método de Lowry y col. (67) y la concentración de DNP por lectura de la densidad óptica (DO) a 363 nm en un espectrofotómetro (Helger and Watts).

2.3 Inmunización de los ratones con DNP-KLH. La inmunización de los ratones se efectuó mediante tres dosis. La primera con una concentración de 500 µg de DNP-KLH en 0.2 ml de una mezcla de solución salina isotónica (SSI) y adyuvante completo de Freund v/v (Gibco, Grand Island Biological, N.Y.), por vía intraperitoneal (i.p.).

Treinta días después se les dio una segunda dosis con una concentración de 500 μg de DNP-KLH en 0.2 ml de una mezcla de SSI y adyuvante incompleto de Freund (Gibco) por vía i.p. A los siguientes treinta días se dio una última dosis inmunizante por vía intravenosa (i. v.) con una concentración de 100 μg de DNP-KLH en 0.2 ml de SSI estéril. Después de 4 días de la última dosis se probó que las células de bazo de los animales inmunizados tuvieran CFA mediante la técnica de hemólisis localizada en gel (Jerne, 1963). Estas células además fueron utilizadas para la formación de hibridomas por el método de Köhler y Milstein (50), modificado por Jeffer y col. (31).

2.4 Células tumorales. Para la hibridación se utilizó la línea tumoral SP2/O-Ag14 desarrollada por Schulman y col (120). Esta línea no sintetiza cadenas de inmunoglobulina, es resistente a 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de 8-aza y muere en medio suplementado con HAT. Las células se conservaron a -70°C y 15 días previos a su uso se descongelaron en baño maría a 37°C , se resuspendieron en MCC y se mantuvieron durante 10 min a temperatura ambiente. Posteriormente se lavaron por centrifugación a 250 g durante 5 min y se resuspendieron en MCC con 8-aza verificándose su viabilidad con azul tripano al 0.4% (Gibco) (8). La distribución de las células se realizó en alícuotas de 5 ml en botellas de plástico estériles de 30 ml (Falcon Division, OXNARD USA) y se incubaron a 37°C en atmósfera húmeda y 5% de CO_2 . Cada 2 días se subcultivaron a una concentración de 5×10^4 células/ml en 5 ml y 48 h antes de la fusión se tomó 1.0 ml de la concentración anterior y se ajustó a 10 ml.

2.5 Obtención de linfocitos de ratón para la formación del híbrido.

Para la formación del híbrido se sacrificaron por dislocación cervical dos ratones inmunizados con DNR-KLH. Los bazoos se obtuvieron asépticamente y se colocaron en una caja de Petri estéril de 60 X 15 mm (Falcon) que contenía aproximadamente 10 ml de MCI y se disgregaron con agujas de 25 X 16 mm, las células se transfirieron a un tubo de plástico estéril de 12 ml (Falcon) y se mantuvieron a 4°C durante 10 min. Posteriormente el sobrenadante se pasó a un tubo nuevo con el fin de eliminar las partes gruesas del macerado. La suspensión celular se lavó por centrifugación a 175 xg a 5°C durante 8 min. Las células se resuspendieron en 5 ml de amortiguador - TRIS con cloruro de amonio y se mantuvieron a 4°C durante 10 min - con la finalidad de eliminar los eritrocitos presentes en la suspensión. En seguida se lavaron con MCI frío a 175 xg durante 8 min y finalmente se resuspendieron en MCC para determinar el número de células viables.

2.6 Fusión. Para la fusión de las células tumorales con linfocitos de ratón se mezclaron 10^7 células tumorales con 10^8 células de bazo, se centrifugaron a 175 xg durante 10 min y se lavaron una vez con MCC en las mismas condiciones. Al paquete celular resultante se le adicionó 0.2 ml de PEG al 50 %, la mezcla se agitó suavemente 6 min y posteriormente se centrifugó a 125 xg durante 3 min a temperatura ambiente. Se dejó reposar 5 min y se resuspendió el paquete celular en 5 ml de MCI y se centrifugó nuevamente a 175 xg durante 8 min. Las células se resuspendieron en MCC para tener una concentración de 4×10^5 células/ml. Las células se distribuyeron en placas

de microcultivo (Microtest II, Falcon) con una pipeta de 5 ml (Falcon) colocando dos gotas en cada pozo y se incubaron a 37 °C, con atmósfera húmeda y 5% de CO₂. A las 24 h de cultivo se añadió una gota de MCC con HAT 2X. Posteriormente se agregó una gota de HAT 1X cada 48 h durante una semana y a la siguiente semana las células se alimentaron con una gota de MCC. Tres días después se examinaron los cultivos en un microscopio invertido para determinar la existencia de híbridos. Los híbridos existentes se alimentaron cada 72 h con MCC y a los sobrenadantes se les determinó actividad anti-DNP.

2.7 Clonación. La clonación se realizó por dos métodos: Clonación en agar-blando y clonación bajo condiciones de dilución limitante.

Para la clonación en agar blando se preparó agar (Bacto agar, Difco) al 2.5% en amortiguador salino de fosfatos (ASF) 0.15 M, el agar se esterilizó en autoclave durante 15 min a 15 libras de presión y se mantuvo sin gelificar en baño maría a 44°C. Por otra parte los híbridos se colectaron por centrifugación y se prepararon dos suspensiones de células viables, 2.5 X 10³ y 1.5 X 10³ por ml con MCC y se mantuvieron a 4°C. Se mezclaron volúmenes iguales de agar y MCC adicionado con 40% de SPB y se equilibraron en baño maría a 44°C. De esta mezcla se distribuyó 1 ml en cada pozo de una caja de cultivo de 24 pozos (Micro well, Falcon) y se dejó gelificar durante 10 min. Durante este tiempo se mezclaron 0.5 ml de cada una de las suspensiones celulares con 1.0 ml de agar-MCC 40% y se adicionó 0.6 ml a cada pozo. Las cajas se incubaron a 37°C, con atmósfera húmeda y 5% de CO₂.

Después de 8 a 15 días de incubación, las clonas fueron separadas del agar por medio de una pipeta Pasteur, se colocaron en cajas de cultivo de 24 pozos y se incubaron con las condiciones anteriores. Los cultivos se observaron en un microscopio invertido después de 4 a 8 días para ver si había crecimiento celular. En los pozos donde hubo crecimiento aparente, se probó la actividad anti-DNP de los sobrenadantes mediante hemaglutinación pasiva (HP) y las clonas positivas fueron congeladas a -70°C . Para esto, se lavaron una vez por centrifugación a 175 $\times\text{g}$ durante 8 min resuspendiéndose el paquete celular en 1.0 ml de MCC y se colocaron en viales estériles de 2 ml (PRO-VIAL cooke, Dynatech Lab. Inc.) en volúmenes de 0.5 ml de células con 0.5 ml de medio criopreservador (81).

En el caso de la clonación por dilución limitante, se preparó un soporte de macrófagos. Para ello 3 días antes de la clonación se inocularon 5 ratones de la misma cepa con 3 ml de aceite mineral (Nujol, Plough de México) por vía i.p. El día de la clonación se exsanguinaron con el objeto de disminuir la contaminación del exudado con eritrocitos. Inmediatamente después los animales se fijaron en una placa de corcho por las cuatro extremidades y el abdomen se desinfectó con alcohol etílico al 70%. Se inocularon 3 ml de solución salina balanceada (SSB) (30) con 10 U/ml de heparina (Sigma de México, S.A.) en la cavidad peritoneal y se aplicó masaje con unas pinzas por la parte dorsal durante 2 min, la piel del abdomen se separó y se practicó una pequeña incisión para extraer con una pipeta Pasteur la mezcla de SSB y aceite. El proceso se repitió 2 veces consecutivas con SSB y la suspensión obtenida se centrifugó a 400 $\times\text{g}$ durante 10 min. El sobrenadante se decantó y el paquete -

celular se lavó 3 veces con S3B. Las células se resuspendieron con MCC, se determinó el número de células via los y la suspensión se ajustó a 2×10^5 células/ml. Las células se distribuyeron en cajas de cultivo de 24 pozos en alícuotas de 1.0 ml en cada pozo y se incubaron 48 h a 37°C , con atmósfera húmeda y 5% de CO_2 .

Las células híbridas se ajustaron a una densidad de 10 células/ml. de manera seriada a partir de una densidad de 1×10^4 células/ml. De la suspensión de 10 células se tomó 0.1 ml y se colocó en cada pozo de la caja a la cual se adherieron los macrófagos. Se incubaron a 37°C , con atmósfera húmeda y 5% de CO_2 . Después de 4 a 8 días se verificó que las clonas tuvieran actividad anti-DNP mediante HP y de las clonas positivas se eligió una para la expansión y el resto se congeló a -70°C .

2.8 Expansión. La expansión de la clona se efectuó de dos maneras: in vitro e in vivo. Para la expansión in vitro se cultivaron 100ml de células a una densidad inicial de 3×10^5 células/ml, en botellas de 30 ml a 37°C , con atmósfera húmeda y 5% de CO_2 . A los 8 días de incubación, las células se colectaron por centrifugación a 250 rg durante 10 min, se subcultivaron de igual manera y el sobrenadante se conservó a -20°C para la ulterior purificación de los anticuerpos.

La expansión in vivo se hizo en ratón y para ello se inocularon 10 ratones con 0.5 ml de pristán (2,6,10,14-hexiloctadecano, Aldrich, Milwaukee, W.I. USA) por vía i.p. Después de 23 días se les inocularon 3×10^4 células y a los 18 días se sangraron para comprobar la presencia de anticuerpos en circulación mediante HP. Des

pués de 7 días desarrollaron líquido de ascitis, el cual se extrajo por drenado de la cavidad peritoneal, se mantuvo a 4°C durante 30 min y se centrifugó a 400 g durante 10 min. El sobrenadante se conservó a -20°C para la purificación posterior de los anticuerpos.

2.9 Purificación de los anticuerpos. Se utilizaron diferentes técnicas para la purificación de los anticuerpos, las cuales se enuncian a continuación:

A) Precipitación de inmunoglobulinas con solución saturada de sulfato de amonio (SSSA) tanto de los sobrenadantes de los cultivos así como del líquido de ascitis. Para la precipitación de las inmunoglobulinas se mezclaron volúmenes iguales de cada muestra con SSSA con pH 6.5, se incubaron con agitación constante durante 60 min a 4°C. Las mezclas se centrifugaron a 5 900 g durante 10 min. Los precipitados se resuspendieron 1:20 con respecto al volumen original en agua destilada y se dializaron durante 3 h contra agua destilada; después contra ASF 0.01 M pH 7.2 durante 24 h y por último con SSI hasta que los precipitados estuvieran libres de sulfato, lo cual se corroboró mediante la adición de cloruro de bario al 10% a una alícuota de la SSI en diálisis. Finalmente se determinó la concentración de proteína por lectura de DO a 280 nm.

B) Separación de inmunoglobulina IgG por cromatografía en columna con dietilaminoetil-celulosa (DEAE-celulosa). La DEAE-celulosa (Sigma) previamente activada por el método de Curtis y Chase (19) se empacó en una columna de 1.7 X 46 cm y se lavó con amortiguador de fosfatos (AF) 0.01 M pH 8 hasta tener en el eluido el pH del amortiguador. Después se pasó la muestra y se eluyó con el mismo amor-

tiguador separando alícuotas de 3 ml en un colector de fracciones (LDB 7000 ULTRORA C). La concentración de proteína de las alícuotas se determinó mediante lectura de DO a 280 nm, aquellas que contenían proteína se mezclaron, determinándose luego la concentración de proteína en la mezcla. Así mismo, se probó la actividad anti-DNP mediante doble inmunodifusión(DID)(17) y HP.

C) Absorción de los anticuerpos con actividad anti-DNP con sefarosa acoplada a DNP-lisina. Unicamente se procedió a la absorción de los anticuerpos presentes en la muestra procedente de líquido de ascitis por ser la que se obtuvo en mayor cantidad. Para ello a la sefarosa (Sepharosa 4B, Farmacia) previamente activada y acoplada con DNP-lisina (71,101) se le adicionó la muestra y se incubó en obscuridad durante 15 a 18 h, a temperatura ambiente y con agitación constante. Transcurrido el tiempo de incubación se filtró la sefarosa en un embudo büchner "C" y el filtrado se recuperó para corroborar la inexistencia de anticuerpos con actividad anti-DNP mediante DID y HP. Posteriormente la sefarosa-anticuerpos se lavó con ASF 0.01 M pH 7.2 hasta eliminar la proteína no absorbida a la sefarosa, comprobándose ésto mediante la lectura de DO cercana o igual a cero a 280 nm.

La separación del conjugado se hizo eluyendo la sefarosa con una solución de DNP 10^{-2} M. Para ello se incubaron la sefarosa-anticueros con 50 ml de solución de DNP 10^{-2} M durante 60 min a temperatura ambiente, con agitación constante y en la obscuridad. En seguida se filtró en el embudo büchner y se lavó con 50 ml de la misma solución. El filtrado se concentró 10 veces por ultrafiltración por osmosis (Membrane DIAFLOW M 100 000 MW AMICON Corp. Lexington Mass USA) y se determinó la concentración de proteína mediante el méto-

do de Lowry y col.

D) Separación de los anticuerpos del DNP mediante cromatografía en columna con DOWEX I. Para la separación de los anticuerpos del hapteno se utilizó una columna de 1.7 X 30 cm en la cual se empacó DOWEX I (IX8 400 Chloride form Sigma) previamente hidratado y activado. La muestra se pasó por la columna y se eluyó con ASF 0.01 M pH 7.2, colectándose fracciones de 3 ml. Por último la concentración de proteína y DNP presentes en las fracciones se determinaron mediante lectura de DO a 280 y 363 nm respectivamente.

Las alícuotas conteniendo a los anticuerpos se mezclaron y concentraron por ultrafiltración con amicon. Posteriormente se determinó la concentración de proteína por el método de Lowry y col. y la actividad anti-DNP por DID y HP.

2.10 Caracterización de los anticuerpos. Después de la separación del hapteno DNP de los anticuerpos, se analizaron éstos últimos mediante electroforesis reductora con 2-mercaptoetanol en gel de poliacrilamida (140). Por otra parte para determinar el tipo de inmunoglobulina producida por la clona expandida, se empleó la técnica de DID que se aplicó con sueros liofilizados anti-inmunoglobulinas de ratón (Miles Laboratoires Inc. USA) producidos en conejo contra las clases IgM, IgA e IgG y las subclases de IgG correspondientes a IgG₁, IgG_{2a}, IgG_{2b} e IgG₃. Finalmente, mediante la técnica de isoelectroenfoque (53,84) se analizaron los anticuerpos obtenidos con el fin de comprobar la naturaleza homogénea de los mismos.

C A P I T U L O I I I
R E S U L T A D O S

3.1 Cinética de respuesta a DNP de los ratones inmunizados con DNP-KLH. Para determinar la presencia del mayor número de CFA producidas contra DNP por los ratones inmunizados con DNP-KLH y definir por este medio el día más propicio para llevar a cabo la FC, se realizó una cinética de respuesta a DNP los días 3, 5 y 8 posteriores a la inmunización. Para cada determinación se emplearon tres ratones inmunizados con las dosis indicadas en la parte de material y métodos y tres ratones normales, a los cuales se les determinó el número de CFA por el método de hemólisis localizada en gel. Como puede verse en la Tabla IV y en la Figura 1, entre los días 3 y 5 se presentó una mayor proporción de CFA, por consiguiente se eligió el día 4 después de la última dosis inmunizante para llevar a cabo la FC.

3.2 Fusión. La fusión se llevó a cabo con las células cosechadas el cuarto día a partir de la última dosis inmunizante, para esto se utilizaron los bazos de los ratones inmunizados que mostraron CFA en sus bazos, en cantidades óptimas. Por el contrario, los ratones control no presentaron respuesta a DNP.

Por otra parte, se colectaron las células tumorales y se procedió a la fusión cultivándose las células a una concentración de 4×10^5 /ml durante 24 h. Por otro lado se cultivaron 5×10^7 células de bazo provenientes de ratones inmunizados en 5 volúmenes de MCC y en presencia de $100 \mu\text{g/ml}$ de lipopolisacárido de E. coli durante 24 h (125). Al transcurrir este

T A B L A IV

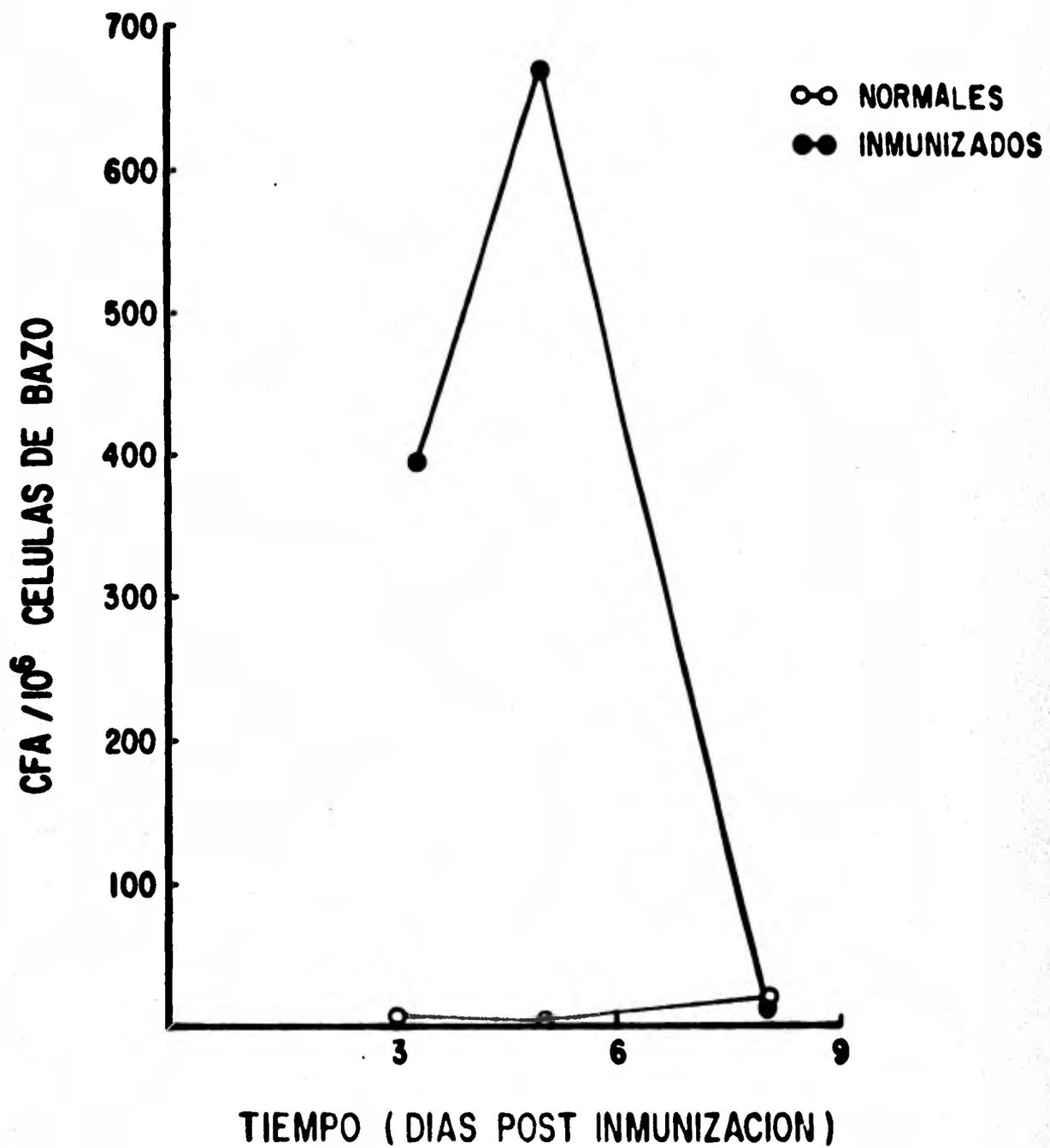
CINETICA DE RESPUESTA A DNP DE LOS RATONES INMUNIZADOS^a

Días postinmunización	Ratones ^b	CFA/10 ⁶ Células de base \pm E.E.	
		GRC	GRC-TNP ^c
3	Normales	2.0 \pm 0.76	1.2 \pm 0.6
	Inmunizados	3.2 - 1.48	400.0 - 0.0
5	Normales	0.0	0.0
	Inmunizados	0.0	679.0 - 32.9
8	Normales	0.0	10.8 - 1.8
	Inmunizados	0.0	7.6 - 3.5

- a Los ratones se inmunizaron por vía i.p. con tres dosis de DNP-KLH como se indica en la parte de material y métodos.
- b Se reportan los valores promedio de CFA determinadas en tres ratones inmunizados y tres ratones normales.
- c Los globulos rojos de carnero se acoplaron con TNP como se describe en el apéndice C.

FIGURA 1

Cinética de respuesta a DNP determinada mediante la técnica de hemólisis localizada en gel, en 3 ratones normales y 3 ratones inmunizados con 3 dosis de DNP-KLH. Se representan CFA promedio de terminadas con GRC acoplados a TNP menos CFA de terminadas con GRC normales.



tiempo se fusionaron con las células tumorales. Se utilizó el lipopolisacárido que es un mitógeno de células B (65) con el fin de aumentar la frecuencia de fusión. Se observó que, en efecto, hay un incremento en la frecuencia de fusión en las células tratadas.

Después de 15 días de la inducción de fusión con PEG, se hizo aparente la presencia de colonias de híbridos, las cuales aparecieron en 70 de los 109 cultivos, lo que equivale a un 65 % de cultivos con colonias de híbridos. Los sobrenadantes de todos los pozos con crecimiento visible de híbridos se ensayaron para detectar la presencia de actividad anti-DNP mediante H₂. La frecuencia de detección de hibridomas positivos fue de 38 que corresponde a un 52.7 %.

3.3 Clonación. Una vez que se detectaron los hibridomas positivos se determinó la viabilidad de las células de una sola colonia positiva (No.26) y la cual se eligió al azar. En esta colonia se obtuvo una densidad de 3.7×10^5 células/ml, a partir de la cual se efectuó una dilución semilimitante. Para llevar a cabo ésta, se cultivaron 3.7×10^2 células en 0.1 ml en cajas de cultivo a las cuales previamente se había adherido una monocapa de células peritoneales obtenidas de ratón. Los sobrenadantes de 50 cultivos ocho días después se ensayaron por H₂ y de ellos 36 fueron positivos en su respuesta a DNP. Al probarse estos mismos por inhibición de la hemaglutinación con DNP-ficoll, 11 resultaron francamente positivos a DNP. De estos 11 cultivos, 7 se clonaron por la técnica de agar-blando (Tabla V).

T A B L A V

CULTIVOS POSITIVOS EN SU RESPUESTA A DNP LOS CUALES SE CLONARON
POR LAS TECNICAS DE AGAR-BLANDO Y DILUCION LIMITANTE

	Múm. de cultivo	células via- bles/ml($\times 10^5$)	células para clo- nar/ml ($\times 10^3$)	clonas po- sitivas
Dilución Semilimitante	26	3.7	3.7	36 ^a
Agar-blando ^b	31	2.5	6.0	-
	33	2.3	6.0	3
	34	1.8	9.0	-
	35	1.0	5.0	-
	37	4.1	8.0	7
	38	5.9	9.0	8
	39	2.1	7.0	-
Dilución limitante	32	14.9	c	17,29,36 ^d

- a De los 36 cultivos que resultaron positivos 7 se clonaron por la técnica de agar-blando y 1 por dilución limitante. El resto de los cultivos se congelaron.
- b Las clonas 3,7 y 8 se expandieron in vitro y los cultivos que resultaron positivos se congelaron.
- c Se efectuaron diluciones seriadas a partir de 1×10^4 células por ml hasta tener una densidad de 10 células por ml
- d La clona 36 se expandió in vivo e in vitro. Las clonas 17 y 29 se congelaron

Por otra parte, se tomó la colonia número 32 de los 36 cultivos que fueron inicialmente positivos y se clonó por la técnica de dilución limitante. En esta colonia se tuvo una densidad de células viables de 14.9×10^5 por ml, la cual se ajustó a una densidad de 1×10^4 células/ml que se diluyó de una manera seriada hasta tener una concentración de 10 células/ml. De esta última dilución se cultivaron 50 pozos con una sola célula. Al probar la actividad anti-DNP de los sobrenadantes de los 50 cultivos, 3 de ellos presentaron respuesta positiva en HP, por lo que se eligió la clona número 36 para hacer la expansión (Tabla V).

3.4 Expansión. La clona seleccionada se expandió in vitro hasta obtener una densidad de 3×10^5 células/ml en 100 ml. Se obtuvieron las células y el sobrenadante. Este último mostró actividad anti DNP (Tabla VI) por lo que se conservó para la purificación posterior de los anticuerpos. Las células se subcultivaron para la expansión in vivo.

Cuando se inocularon las células híbridas a ratones previamente inoculados con pristán, los híbridos crecieron como un tumor en el 80 % de los animales. Esto se determinó mediante la detección de anticuerpos circulantes cuando se probó el suero de los ratones en HP. Dichos hibridomas continuaron secretando grandes cantidades de anticuerpos a través del líquido de ascitis en el 62 % de los ratones, lo cual pudo ser corroborado por HP (Tabla VI).

T A B L A VI

HEMAGLUTININACIÓN DE SOBRENADANTES DE CULTIVO Y
DE LIQUIDO DE ASCITIS ANTES DE PRECIPITAR CON SSSA

GRC acoplados más anti-TNP	+ 1:64
GRC normales más anti-TNP	-
GRC acoplados solos	-
GRC normales solos	-
GRC acoplados más suero normal	-
GRC normales más suero normal	-
GRC acoplados más medio de cultivo	-
GRC normales más medio de cultivo	-
GRC acoplados más sobrenadante (-)	-
GRC normales más sobrenadante (-)	-
GRC acoplados más sobrenadante I+	+ 1:128
GRC normales más sobrenadante I+	-
GRC acoplados más sobrenadante II+	+ 1:64
GRC normales más sobrenadante II+	-
GRC acoplados más líquido de ascitis I	+ 1:4096
GRC normales más líquido de ascitis I	-
GRC acoplados más líquido de ascitis II	+ 1:4096
GRC normales más líquido de ascitis II	-
GRC acoplados más líquido de ascitis normal	-
GRC normales más líquido de ascitis normal	-

I+ y II+ corresponden a la primera y segunda expansión

in vitro

I y II se refieren a la primera y segunda expansión

in vivo

(-) sobrenadante de un cultivo anterior que no dio res-
puesta a DNP

Para seguir expandiendo la clona, a uno de los ratones se le extrajo el tumor que creció en forma agregada, se disgregó y se cultivó in vitro, tanto en presencia de 8-aza como de HAT; después de ser expandido in vitro y probada su actividad por HP la cual resultó ser positiva (Tabla VI), nuevamente se expandió in vivo. De este modo se obtuvo el crecimiento de hibridomas secretoras de anticuerpos en el líquido de ascitis del 100 % de los animales, lo que se comprobó mediante la determinación de actividad anti-DNP del mismo por HP (Tabla VI).

3.5 Purificación de los anticuerpos. La precipitación de inmunoglobulinas del líquido de ascitis y de los sobrenadantes de los cultivos celulares se realizó con SSSA y aportó 168 mg/ml y 5.2 mg/ml de inmunoglobulinas respectivamente, después de probar su actividad anti-DNP (Tabla VII) se separó la IgG por cromatografía en columna con DEAE-celulosa. La IgG se colectó de la fracción 23 a la 45 en el caso de líquido de ascitis y de la 30 a la 36 en el de sobrenadantes de cultivo (Figura 2). Las fracciones se analizaron en inmunoelectroforesis y mostraron una sola banda que se identificó como IgG (Figura 3).

Por otra parte, al probarse ambas fracciones por HP presentaron actividad anti-DNP con títulos de 1:128 (Tabla VIII); igualmente, la actividad anti-DNP se corroboró al probarse en DID con DNP acoplado a hemocianina. Con estos antecedentes se pudo proceder a la absorción de los anticuerpos con actividad anti-DNP mediante sefarosa acoplada a DNP-lisina, lo cual se hizo evidente cuando después de incubar la muestra con la sefa

T A B L A VII

HEMAGLUTINACION PASIVA DE SOBRENADANTES DE CULTIVO
Y LIQUIDO DE ASCITIS PRECIPITADOS CON SSSA

GRC acoplados más anti-TNP	+ 1:128
GRC normales más anti-TNP	-
GRC acoplados solos	-
GRC normales solos	-
GRC acoplados más suero normal	-
GRC normales más suero normal	-
GRC acoplados más sobrenadantes	+ 1:512
GRC normales más sobrenadantes	-
GRC acoplados más líquido de ascitis	+ 1:1024
GRC normales más líquido de ascitis	-

FIGURA 2

Perfil cromatográfico en columna con DEAE-celulosa de las inmunoglobulinas precipitadas con solución saturada de sulfato de amonio.

A Curva de elución de las inmunoglobulinas obtenidas de líquido de necitís.

B Curva de elución de las inmunoglobulinas obtenidas de sobrenadantes de cultivo.

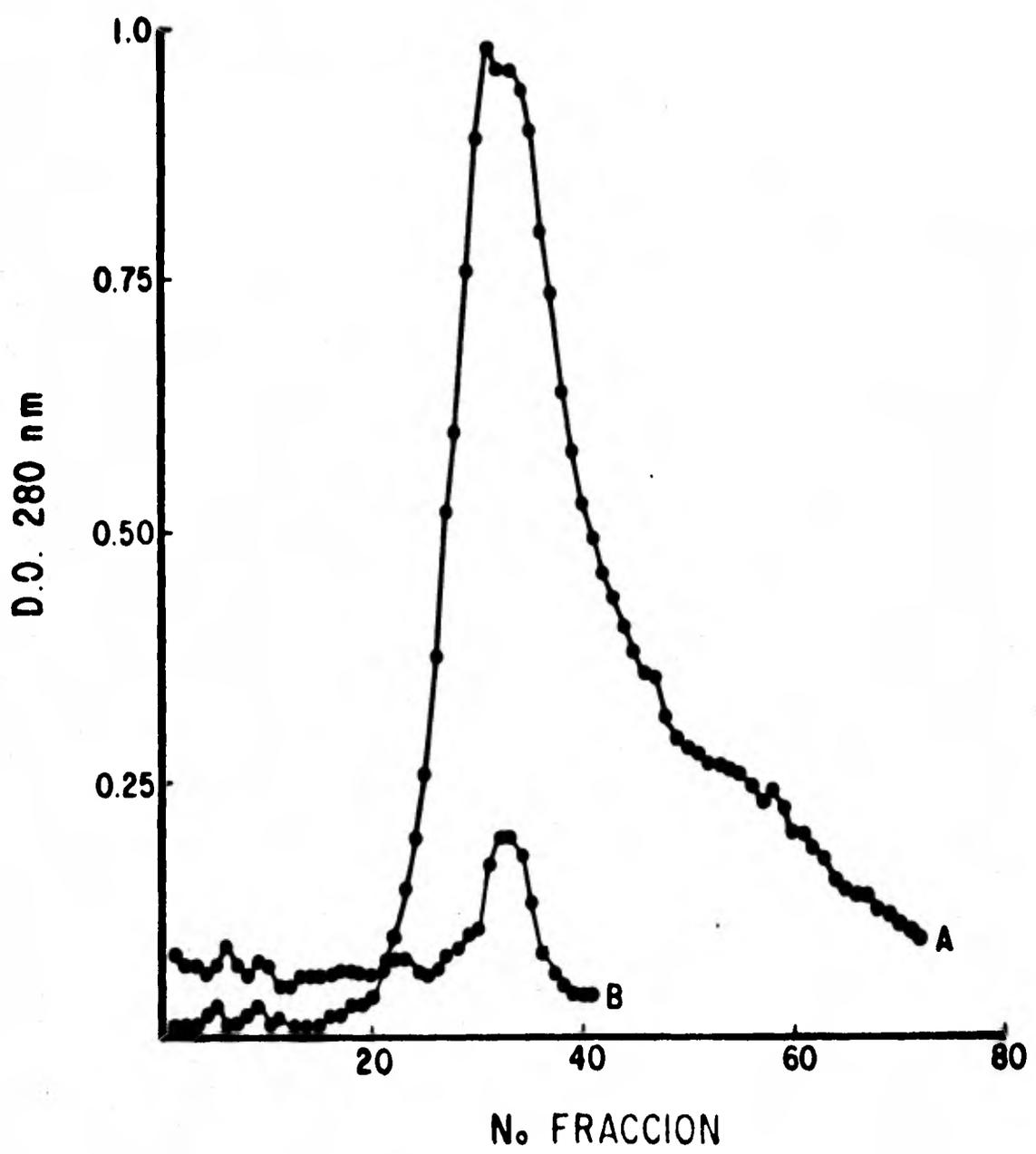
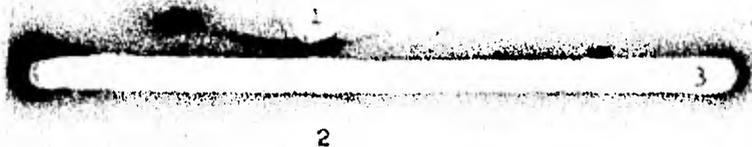


FIGURA 3

Inmunolectroforesis de las inmunoglobulinas obtenidas de liquido de ascitis de ratón y de sobrenadantes de cultivo.

- 1 Inmunoglobulina de liquido de ascitis
- 2 Inmunoglobulina de sobrenadante de medio de cultivo
- 3 Anti-IgG de ratón



T A B L A VIII

HEMAGLUTINACION PASIVA DE LAS INMUNOGLOBULINAS SEPARADAS POR CROMATOGRAFIA EN DEAE-CELULOSA DE LOS SOBRENADANTES DE CULTIVO Y DE LIQUIDO DE ASCITIS.

ORC acoplados más anti-TNP	+ 1:4
ORC normales más anti-TNP	-
ORC acoplados solos	-
ORC normales solos	-
ORC acoplados más sobrenadantes	+ 1:128
ORC normales más sobrenadantes	-
ORC acoplados más líquido de ascitis	+ 1:128
ORC normales más líquido de ascitis	-

rosa, se encontró que en el filtrado no persistía actividad anti-DNP, indicando que los anticuerpos habían sido absorbidos a la sefarosa. Posteriormente se efectuó la separación del conjugado DNP-anticuerpo de la sefarosa y se aisló de éste el anticuerpo. Esto último se concretó al pasar el conjugado DNP-anticuerpo por una columna de cromatografía con Dowex. El anticuerpo se colectó de la fracción 4 a la 7. La curva de elución se muestra en la (Figura 4).

Ya separados los anticuerpos del hapteno, los primeros se concentraron y ensayaron para determinar la presencia de actividad anti-DNP mediante inhibición de la hemaglutinación con DNP-ficolil (Tabla IX), HP (Tabla X) y DID con DNP acoplado a diferentes acarreadores (Figura 5). Así mismo se probó la actividad del anticuerpo utilizando diferentes diluciones del mismo frente a DNP acoplado a hemocianina (Figura 6).

3.6 Caracterización de los anticuerpos. Se analizaron los anticuerpos mediante electroforesis reductora en gel de poliacrilamida (Figura 7) encontrándose que el producto secretado por la clona expandida presentó en todos los casos el patrón característico de una inmunoglobulina, la cual presentó una pureza confiable, lo cual puede ser corroborado por el empleo de técnicas más finas, como lo es el isoelectroenfoque.

Por otra parte, mediante el empleo de antisueros contra las diferentes clases de inmunoglobulinas de ratón se reveló en DID (Figura 8) que el anticuerpo obtenido de líquido de ascitis pertenece a una inmunoglobulina de la subclase IgG_3 . Finalmente

FIGURA 4

**Perfil cromatográfico en columna con DOWEX-I del
conjugado DNP-anticuerpo obtenido de líquido de
ascitis.**

T A B L A IX

INHIBICION DE LA HEMAGLUTINACION CON DNP-FICOLL
DEL ANTICUERPO PURIFICADO DE LIQUIDO DE ASCITIS

GRC acoplados más DNP-ficoll más anticuerpo normal	-
GRC normales más DNP-ficoll más anticuerpo normal	-
GRC acoplados más DNP-ficoll más anticuerpo de l.a.	+ 1:128
GRC normales más DNP-ficoll más anticuerpo de l.a.	-
GRC acoplados más DNP-ficoll	-
GRC normales mas DNP-ficoll	-
GRC acoplados más anticuerpo de líquido de ascitis	+ 1:512
GRC normales más anticuerpo de líquido de ascitis	-
GRC acoplados más anticuerpo normal	-
GRC normales más anticuerpo normal	-

l.a. líquido de ascitis

T A B L A X

HEMAGLUTINACION PASIVA DEL ANTICUERPO PURIFICADO DE
LIQUIDO DE ASCITIS EN VARIAS COLUMNAS DE DOWEX

GRC acoplados más anti-TNP	+	1:64
GRC normales más anti-TNP	-	
GRC acoplados solos	-	
GRC normales solos	-	
GRC acoplados más suero normal	-	
GRC normales más suero normal	-	
GRC acoplados más anticuerpo I	+	1:512
GRC normales más anticuerpo I	-	
GRC acoplados más anticuerpo I'	+	1:128
GRC normales más anticuerpo I'	-	
GRC acoplados más anticuerpo I''	+	1:1024
GRC normales más anticuerpo I''	-	

FIGURA 5

Doble inmunodifusión del anticuerpo purificado de líquido de ascitis de ratón (pozo central) frente a varias diluciones (1, concentrado; 2, 1:2, 3, 1:4; 4, 1:8; 5, 1:16; 6, 1:32) de diferentes acarreadores acoplados a DNP (pozos periféricos) los que se prepararon como se indica en el Capítulo II.

- A) DNP-albúmina humana (fracción V)
- B) DNP-albúmina de conejo (fracción V)
- C) DNP-gamma globulina humana (fracción II)
- D) DNP-albúmina bovina (fracción V)
- E) DNP-hemocianina (KLH)
- F) Acarreadores sin DNP (a, b, c, d y e)

Se observa que en la mayoría de las diluciones aparecen bandas de precipitación, excepto cuando se uso cualquiera de los acarreadores sin DNP.

FIGURA 4

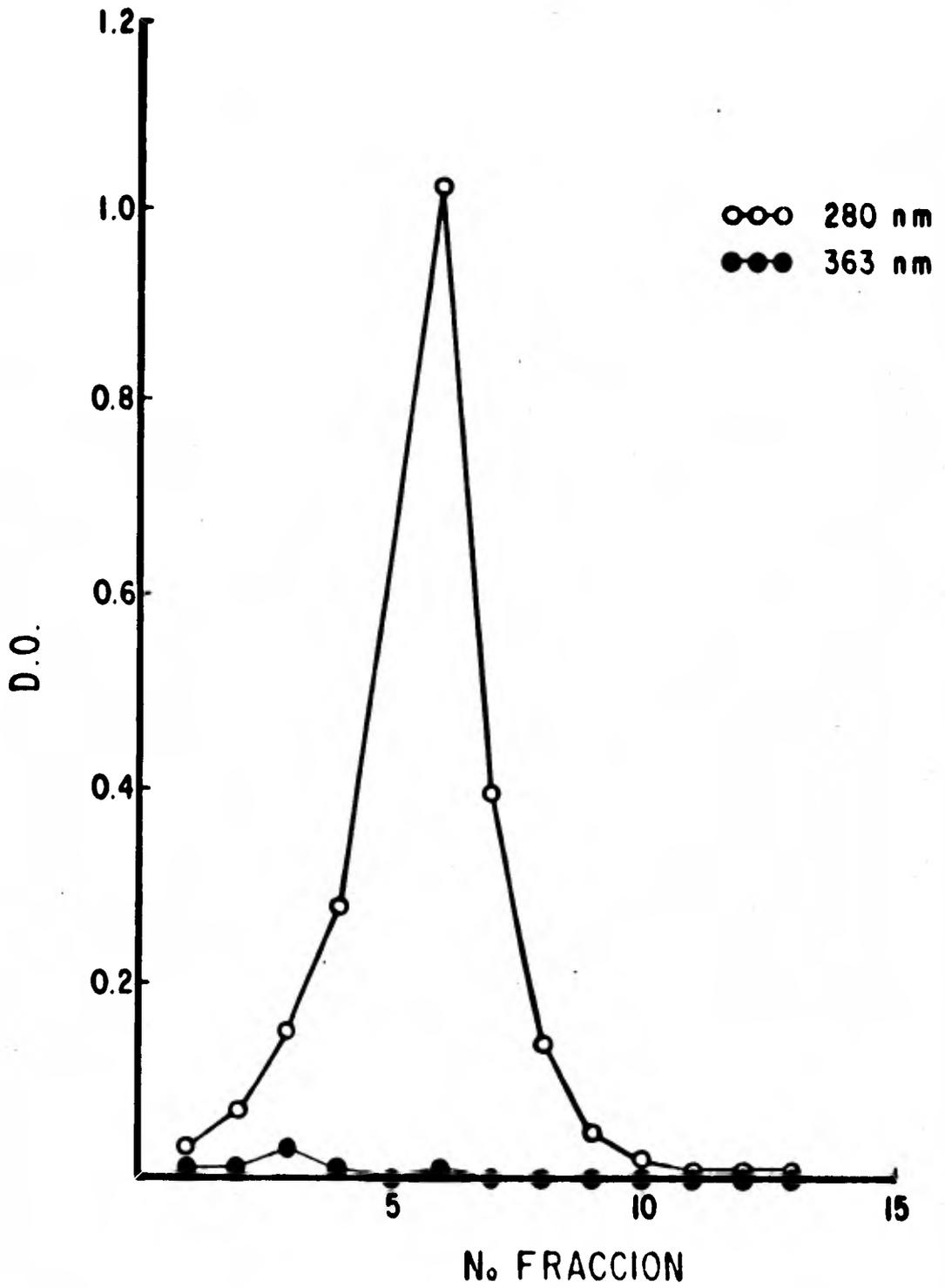
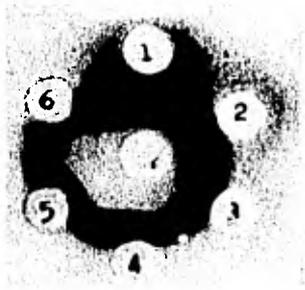
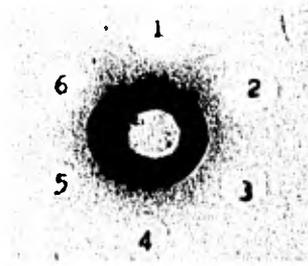


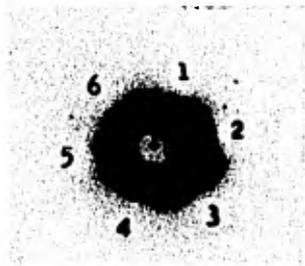
FIGURA 5



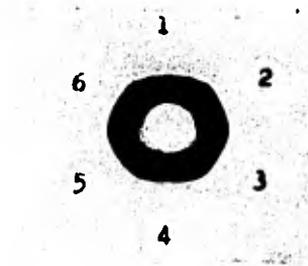
A



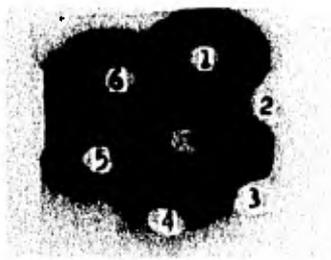
B



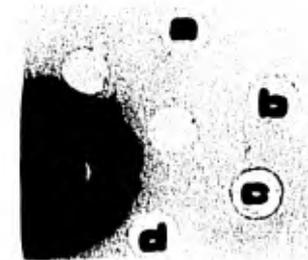
C



D



E



F

FIGURA 6

Doble inmunodifusión del anticuerpo purificado de líquido de ascitis de ratón (pozo central) frente a varias diluciones (1, concentrado; 2, 1:4; 3, 1:8; 4, 1:16; 5, 1:32; 6, 1:64) de DNP-KLH.

A anticuerpo concentrado

B anticuerpo 1:2

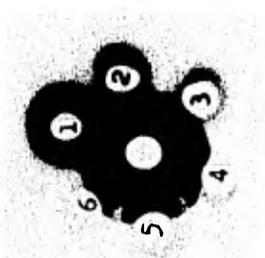
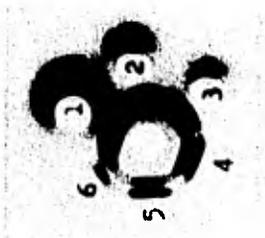
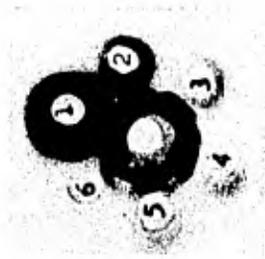
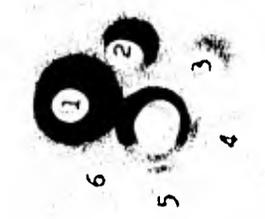
C anticuerpo 1:4

D anticuerpo 1:8

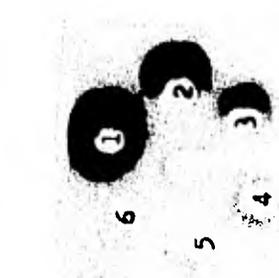
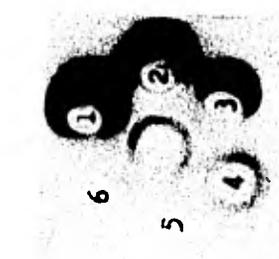
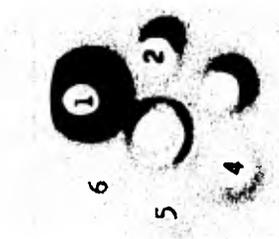
E anticuerpo 1:16

F anticuerpo 1:32

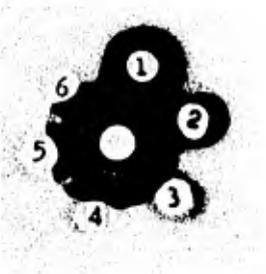
G anticuerpo 1:64



A B C D



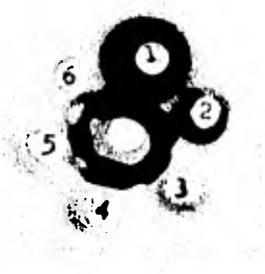
E F G



A



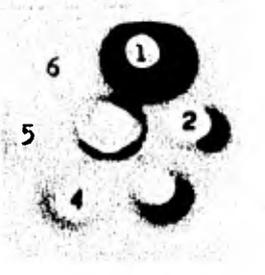
B



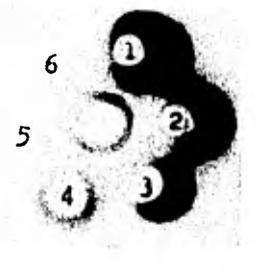
C



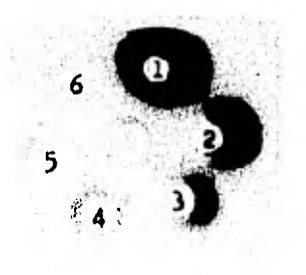
D



E



F



G

FIGURA 7

**Electroforesis reductora en gel de poliacrilamida
con 2-mercaptoetanol y DSS al 10 %**

A Patrón

B IgG de cerdo

C Anticuerpo monoclonal control

**D, D' y D'' Anticuerpo obtenido de líquido de
ascitis purificado en varias co -
lunas de DOWEX I**

a Cadenas pesadas

b Cadenas ligeras

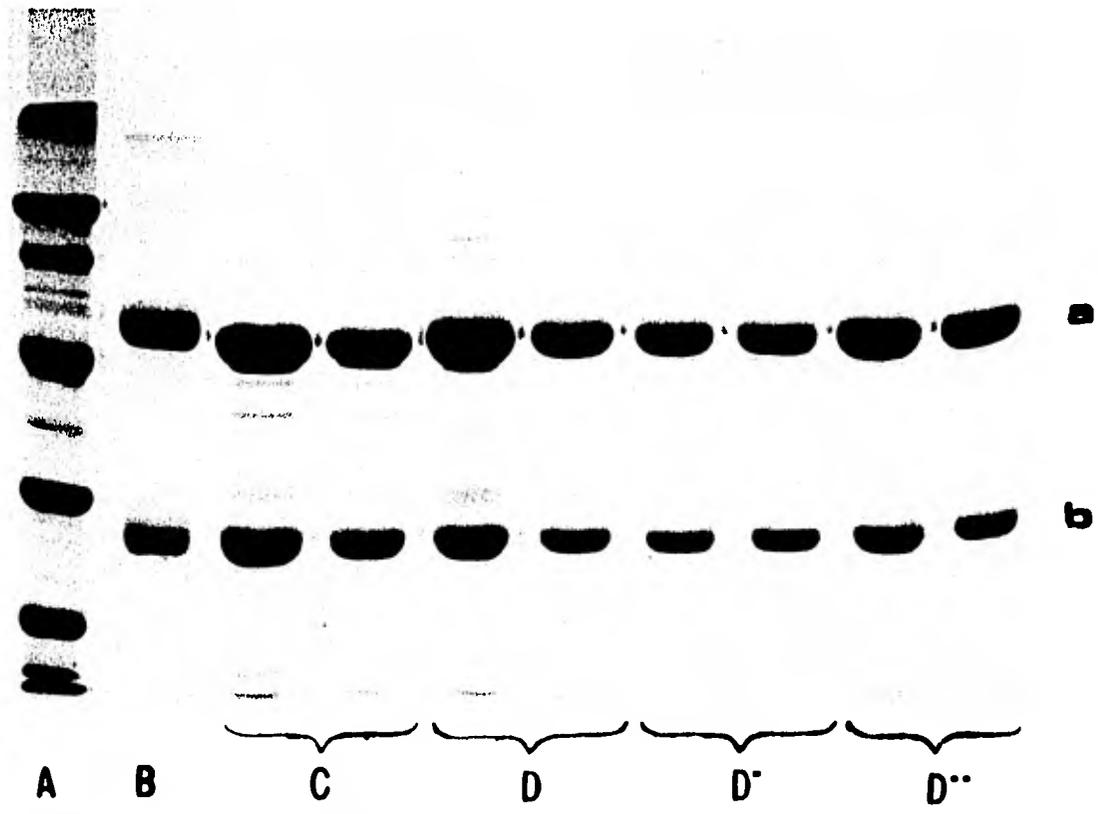
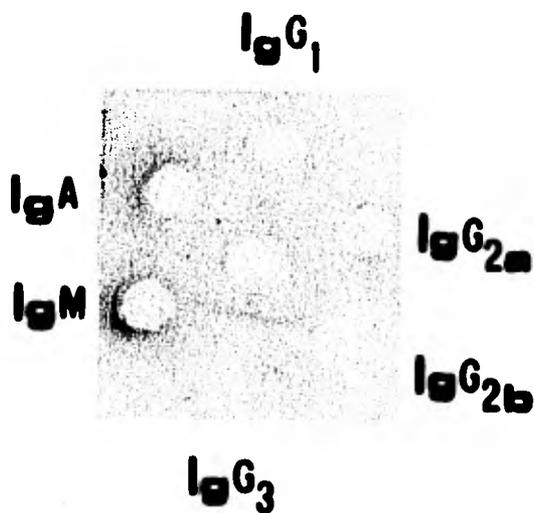


FIGURA 8

Doble inmunodifusión del anticuerpo purificado de líquido de necitís de ratón frente a antisueros de ratón producidos contra las diferentes clases de insunoglobulinas del mismo.



se encontró por isoelectroenfoque que la muestra analizada contiene anticuerpos del mismo punto isoelectrónico (Figura 9).

3.7 Cuantificación de los anticuerpos. La obtención de los anticuerpos se realizó mediante la purificación en alcuotas de una parte del líquido de ascitis; a cada una de estas alcuotas se determinó la concentración de proteína mediante el método de Lowry y col. en cada una de las etapas del proceso de purificación. Se obtuvo una concentración final de 11 mg/ml de proteína y un total de 20 ml.

FIGURA 9

Isoelectroenfoque del anticuerpo purificado de líquido de ascitis de ratón, en condiciones reductoras.

A Corrimiento en anfolinas de pH 3 a 10

B Electroforesis reductora en gel de poliacrilamida con 2-mercaptoetanol y DSS al 10 %

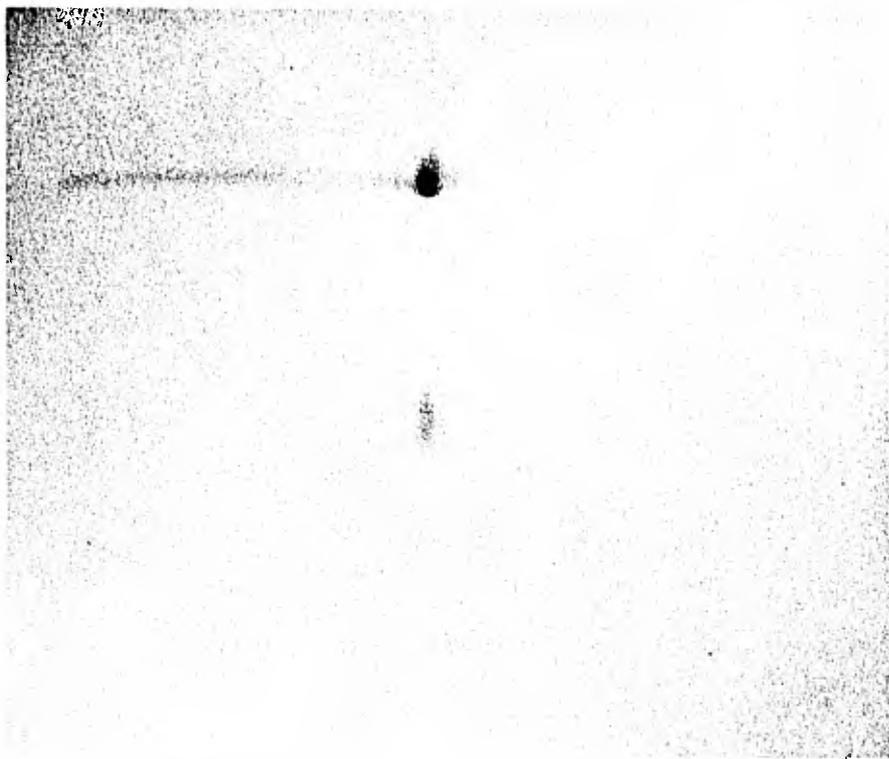
a Cadenas pesadas

b Cadenas ligeras



a b

A



a

b

B

C A P I T U L O I V D I S C U S I O N

En este trabajo se utilizó la técnica de hibridación de células somáticas desarrollada por Köhler y Milstein para la producción de un anticuerpo monoclonal (AcM) específico de la clase IgG con actividad anti-dinitrofenol.

Se ha demostrado la cooperatividad entre anticuerpos (95), sin embargo es conveniente emplear AcM para corroborar este mecanismo. Por lo tanto, el presente trabajo tiene por objetivo preparar un AcM contra DNP.

Al hacer los análisis de los trazos de Scatchard de reacciones antígeno-anticuerpo utilizando inmunoglobulinas obtenidas de animales inmunizados, se ha observado que presentan un brazo ascendente que podría ser explicado por la presencia de interacciones cooperativas entre las moléculas de anticuerpo. Sin embargo, debido a la heterogeneidad que se presenta en los sueros hiperinmunes sería interesante probar y analizar estas reacciones con anticuerpos homogéneos: y con una sola afinidad. Por lo que el anticuerpo obtenido en el presente trabajo se probará para dicho fin.

Se sabe que las características de la respuesta inmune pueden depender tanto del esquema de inmunización como de la naturaleza del antígeno; sin embargo, diferentes determinantes sobre la misma molécula antigénica pueden variar en inmunogenicidad y su habilidad para inducir la aparición secuencial de diferentes tipos de anticuerpos (111). Durante la respuesta inmune primaria la mayoría de los antígenos inducen inicialmente la formación de anticuerpos de la clase IgM, seguidos de la producción de la clase IgG y poste

riormente de la clase IgA. Mientras que en respuesta inmune secundaria se producen preferencialmente anticuerpos de la clase IgG (13, 47). En base a lo anterior se utilizó un protocolo de inmunización consistente en dosis repetitivas con el fin de incrementar la frecuencia de CFA de la clase IgG (39), así como el número de estas células en el bazo con respecto a la IgM, lo cual puede observarse por el número de híbridos obtenidos detectados por HP.

Se ha encontrado que, con pocas excepciones, las células plasmáticas secretando inmunoglobulinas no están restringidas a la síntesis de una sola especie de molécula de inmunoglobulina (6,14,21) y que estas células plasmáticas que secretan IgG o IgA son derivadas de precursores que sintetizan IgM (46,59). Se sabe también que la maduración de una respuesta inunitaria va a menudo acompañada por un cambio en la clase de anticuerpo que está siendo producido, desde IgM hasta IgG y que la especificidad del anticuerpo se mantiene a través de este cambio (137). Durante el período de transición se encuentran ciertos inmunocitos que sintetizan tanto moléculas de IgM como moléculas de IgG. Esto podría explicar la presencia simultánea de varias clases de inmunoglobulinas sobre algunas células B (96, 144). Por otra parte, no todas las células inmunocompetentes se diferencian a células plasmáticas productoras de anticuerpos, sino que una parte de la población celular sensibilizada a determinado antígeno persiste como célula de memoria (146).

Se ha sugerido que las poblaciones heterogéneas de anticuerpos producidos en respuesta a la estimulación por un determinante antigénico, representa el producto de numerosas clonas celulares que producen anticuerpos homogéneos (3,7). Así mismo, la respuesta

inmune humoral a la estimulación antigénica con conjugados hapteno-proteína está caracterizada por la producción de una población heterogénea y altamente específica de moléculas de anticuerpo. Se ha hecho un análisis sobre esto y se ha encontrado que la progenia clonal de un solo precursor de CFA (célula B) produce una población restringida de moléculas de anticuerpo (107).

En la Teoría de la Selección Clonal que es la más aceptada hasta la actualidad, se implica que el sistema inmune responde al antígeno por selección, activación y expansión de algunas clonas de linfocitos, los cuales están precomprometidos con un antígeno particular (12) y que por lo tanto la respuesta humoral a un antígeno dado es el resultado de la suma del producto de muchas clonas individuales.

En la respuesta inmune normal, la CFA es probablemente una célula en "estado final", es decir, es una célula incapaz de diferenciación posterior. Se cree que las CFA tienen una vida media de solo pocos días; sin embargo, una CFA puede, bajo transformación maligna, producir grandes cantidades de inmunoglobulinas homogéneas, como es el caso del mieloma múltiple, donde aun cuando no se ha podido demostrar la actividad de anticuerpo para la mayoría de proteínas procedentes de él, una extensiva selección ha demostrado la actividad de anticuerpo para algunas proteínas de mieloma (106).

Bajo ciertas condiciones las células pueden fusionarse para generar un híbrido, en el cual una célula aporta la especificidad y la otra la inmortalidad por su capacidad para dividirse constantemente. De esta manera se origina una clona que secreta una inmunoglobulina específica contra el antígeno (50).

En este trabajo se fusionaron células plasmáticas con células de mieloma. Se produjeron varios hibridomas, el que se caracterizó secretó una inmunoglobulina de la subclase IgG_3 con actividad anti DNP, debido a que las células que se fusionaron fueron células de base secretoras de IgG con células de mieloma de ratón SP2/O-Ag14 no secretoras de inmunoglobulina (120). Estas últimas son variantes de líneas celulares de mieloma de ratón y tienen la propiedad de no secretar inmunoglobulinas. Estas líneas celulares han sido ampliamente reportadas y sus efectos estudiados (52, 116). Con el empleo de dichas células se impide la formación de moléculas nuevas de inmunoglobulinas (15, 117), por lo mismo, queda excluida la posibilidad de asociación entre cadenas ligeras y pesadas de las líneas progenitoras, como ocurre con las células híbridas provenientes de mielomas secretoras de inmunoglobulinas (50). Se desconoce el mecanismo por el cual se regula la síntesis de anticuerpos en las células híbridas, aunque se ha sugerido que la pérdida de producción de un anticuerpo por una clona probablemente es consecuencia de la pérdida del cromosoma o cromosomas portadores de los genes responsables de la producción de inmunoglobulinas (52).

En el presente trabajo se empleó el PEG como agente inductor de FC, ya que con él se superan algunas limitaciones que se presentan con el uso de agentes como los virus (24, 38) y las lectinas (17), tales como la frecuencia de hibridación, la dificultad de preparación y la falta de reproducibilidad de un lote a otro. En el caso de los virus, además, se tiene que la actividad fusionante es variable y expuesta a decaer, y no puede excluirse la posibilidad de introducir fragmentos de la información viral a las células

tratadas (100). Otra diferencia es que el número de células multinucleadas después del tratamiento con virus de Sendai, se ve fuertemente influenciado por pequeños cambios en el pH (17,124). Aunque el PEG se ha caracterizado como un agente altamente activo en inducir fusión debido a su constante actividad fusionante de lote a lote y a su fácil uso, además es igualmente efectivo en un amplio rango de pH (22, 134) hay limitaciones respecto a su uso; por ejemplo, que dificulta la FC en suspensión debido a su alta viscosidad (22,23,34) y que la concentración del PEG y el tiempo de exposición sean cruciales para obtener un mínimo entre toxicidad y máximo de frecuencia de fusión (22,34).

Para la clonación se eligió la colonia al azar porque para el trabajo se requería obtener una colonia que presentara actividad anti-DNP independientemente del número de células viables que tuviera la misma. Aunque esto último es un aspecto importante para los fines del trabajo no se requería de la evaluación de todas las colonias. En la clonación por la técnica de agar-blando se presentó el inconveniente de la contaminación, ya que es un medio nutritivo muy rico además de los híbridos llegan a crecer otros organismos. Por otra parte, el tiempo de incubación para la obtención de la clona es un poco mayor en comparación con el necesario para la clonación por dilución limitante. Sin embargo los cultivos efectuados mediante esta última son también muy susceptibles de contaminarse.

Con respecto a la clonación por dilución limitante se plantea la interrogante de que si se cultivó una sola célula. La pregunta es difícil de contestar. Sin embargo, aunque no se corroboró por

microscopía, los resultados obtenidos como la reacción exclusiva de la inmunoglobulina obtenida con el antisuero dirigido contra IgG_3 y la existencia de un solo punto isoeléctrico, sugieren que en efecto se clonó una sola célula.

Después de analizar los anticuerpos por electroforesis reductora se observó que junto con las cadenas de las inmunoglobulinas aparecen otras bandas, debido a la composición del líquido de ascitis, se cree que estas bandas son contaminantes que se precipitaron junto con las inmunoglobulinas y que no pudieron ser eliminadas durante la purificación de los anticuerpos. Por otro lado, probablemente esta contaminación hubiera sido menor si el anticuerpo se hubiera purificado de sobrenadante de cultivos. Aunque la desventaja de este último es que para obtener cantidades suficientes de anticuerpo se necesitan cantidades muy grandes de medio, lo cual sería muy costoso por la composición del mismo.

Por otra parte, se decidió purificar solamente el anticuerpo obtenido de líquido de ascitis, ya que la concentración de inmunoglobulinas fue mayor que la obtenida de sobrenadantes de cultivo. Independientemente, el interés del trabajo no contemplaba la procedencia del anticuerpo.

Considerando la presencia de DNP en las muestras purificadas (Figura 4) se observó una concentración casi nula de DNP, lo que sugiere que el anticuerpo tiene una pureza confiable. Así mismo, el hecho de que la muestra analizada reaccione solamente con el antisuero dirigido contra IgG_3 y que además tengan un solo punto isoeléctrico sugiere fuertemente que se trata de un anticuerpo monoclonal.

Finalmente, el rendimiento obtenido por ratón que fue de 1 mg puede considerarse como un rendimiento apropiado, tomando en cuenta que se pierde una cantidad importante durante el proceso de purificación y que además la inmunoglobulina obtenida pertenece a una subclase que se encuentra en pequeña cantidad en el suero de los ratones normales.

C O N C L U S I O N E S

- 1) La fusión entre células tumorales con células de bazo comprometidas a DNP, produjo un porcentaje razonable de híbridos que secretan anticuerpos anti-DNP.
- 2) El anticuerpo obtenido es una inmunoglobulina de la subclase IgG₃ lo cual se esperaba por el esquema de inmunización que se empleó.
- 3) Este anticuerpo es homogéneo y monoespecífico.

A P E N D I C E A

Medios de cultivo. Para los experimentos se utilizaron medios de cultivo preparados de varias formas a partir del medio Eagle modificado por Dulbecco (MEMD) con L-glutamina y glucosa en una concentración de 4.5 g/lit (Gibco).

Medio de cultivo incompleto (MCI). El MEMD fue suplementado con bicarbonato de sodio y N-2-hidroxiethyl piperacina ácido N-2-etanosulfónico (HEPES) para obtener una concentración final de 0.24 M y 0.08 M respectivamente. El pH se ajustó a 7.0 con hidróxido de sodio (NaOH) o ácido clorhídrico (HCl) 0.1 N y se esterilizó por filtración con membranas Millipore de 0.22 μ m conservándose a 4°C para su uso posterior.

Medio de cultivo completo (MCC). Cada 100 ml del medio de cultivo anterior fueron adicionados previamente a su uso con:

1 ml de piruvato de sodio 100 mM (Gibco 100X)

1 ml de L-glutamina 200 mM (Gibco 100X)

1 ml de aminoácidos no esenciales 10 mM (100X)

1 ml de una mezcla de penicilina (100UI/ml) y estreptomycin 100 μ g/ml

15 ml de suero fetal bovino (SFB) (Gibco) previamente inactivado a 56°C durante 30 min.

50 μ l de una solución de 2-mercaptoetanol 5×10^{-5} M

Medio de cultivo con hipoxantina, aminopterina y timidina (HAT). Al medio de cultivo completo se añadió una mezcla de hipoxantina-timidina (HT) y aminopterina 1 X que se elaboraron de la siguiente manera: La hipoxantina (hidroxipurina, Sigma) a una concentración de 10×10^{-2} M se disolvió con NaOH 1 N y la timidina (Sigma) a una concentración de 1.6×10^{-3} M. Cien ml de cada una de las soluciones se combinaron y aforaron a 300 ml. El pH se ajustó a 9.5 y se

esterilizó por filtración con membranas millipore de 0.45 μ m conservándose a -20°C .

La aminopterina (ácido fólico-4-amino, ácido glutámico-4-aminopterol)(Sigma) se preparó a una concentración de 4×10^{-7} M y se disolvió con NaOH 1 N, el pH se ajustó a 7.5 ó 7.8 con ácido acético 1N y se esterilizó por filtración con membranas millipore de 0.45 μ m conservándose a -20°C protegida de la luz. La aminopterina se adicionó al medio HT poco antes de añadir el HAT a las células.

Preparación de la solución de 8-azaguanina. La solución de 8-azaguanina (8-aza)(2-amino-6-oxi-8-azapurina)(Sigma) se preparó a una concentración final de 10^{-4} M, se disolvió en baño maría a 37°C adicionando NaOH 1N. El pH se ajustó con ácido acético 1 N. La esterilización se hizo por filtración con membranas millipore de 0.22 μ m y se conservó a -20°C .

Preparación del polietilenglicol. 10 g de PEG con un peso molecular de 1000 daltons (Sigma) se fundió y esterilizó en autoclave durante 30 min a 15 libras de presión. Se mantuvo líquido en baño maría a 50°C y se mezcló con un volumen de 10 ml de MCI, se conservó a -20°C .

Medio criopreservador. Se preparó con SFB al 50%, dimetilsulfóxido (DMSO) al 20% y MCC al 30 %.

Lipopolisacárido de E. coli. 20 mg de lipopolisacárido (Lipopolysaccharide W E. coli Difco) se disolvieron en 5 ml de SSI y se esterilizó 30 min con luz ultravioleta. Después se mezclaron con 15 ml de SSI estéril y se conservó a -8°C .

A P E N D I C E B

Soluciones amortiguadoras

Amortiguador de boraton (AB)

Solución I

ácido bórico 12.40 g

cloruro de sodio 5.84 g

se aforó a 1000 ml con agua destilada

Solución II

hidróxido de sodio 8.0 g

se aforó a 1000 ml con agua destilada

Solución de trabajo: A 250 ml de la solución I se adicionó 50.9 ml de la solución II, se mezclaron con agua destilada y se ajustó el pH con la solución II antes de aforar a 1000 ml.

Amortiguador barbital modificado (ABM)

ácido 5,5-dietilbarbitúrico 2.875 g

5,5-dietilbarbiturato de sodio 1.375 g

cloruro de calcio anhidro 0.875 g

cloruro de magnesio anhidro 0.238 g

cloruro de sodio 42.501 g

Los reactivos que contienen barbital se disolvieron en 500 ml de agua destilada en baño maría a 90°C, a continuación se disolvieron los reactivos restantes. La solución se dejó enfriar y se aforó a 1000 ml con agua destilada. La solución se conservó a 4°C.

Solución de trabajo: Se hizo una dilución 1:5 con agua destilada, el pH normalmente se obtiene de 7.3 a 7.4, en caso necesario se ajusta con NaOH o HCl 0.1 N. Se esterilizó por filtración con membranas millipore y se conservó a 4°C.

Amortiguador de cacodilatos

Solución I

ácido dimetil-arsénico (ácido cristalino) 2.864 g/1000 ml

Solución II

ácido dietil-arsénico (sal de sodio cristalina) 4.48 g/100ml

Solución de trabajos: Se tomaron 50 ml de la solución I y se ajustó el pH a 6.9 con la solución II.

Amortiguador de equilibrio

2-mercaptoetanol	5 %
glicerol	10 %
DSS	2 %
TRIZMA-HCl pH 6.9	0.06 M

Amortiguador de extracción

amortiguador de lavado	89.0 ml
Nondet P-40	1.0 ml
glicerol	10.0 ml

Amortiguador de lavado

cloruro de sodio	137.00 mM
TRIS (hidroxilaminometano)	20.00 mM
cloruro de calcio	0.92 mM
cloruro de magnesio	0.99 mM

Amortiguador de lisis

amortiguador de extracción	0.10 ml
glicerol	0.02 ml

Amortiguador de fosfatos (AF) 0.01 M

Solución I

fosfato de sodio monobásico monohidratado 1.38 g/1000 ml

Solución II

fosfato de sodio dibásico anhidro 1.42 g/1000 ml

Solución de trabajos: A la solución II se añadió la solución I con agitación constante y en el potenciómetro, hasta obtener el pH requerido.

Amortiguador salino de fosfatos (ASF) 0.01 M

A cada una de las soluciones anteriores de fosfatos se adicionó 8.5 g de cloruro de sodio y se aforaron a 1000 ml. La solución de trabajo se preparó de la misma manera.

Amortiguador salino de fosfatos (ASF) 0.15 M

Solución I

Cloruro de sodio /1000 ml

Solución II

fosfato de potasio monobásico anhidro 20.410 g/1000 ml

Solución III

fosfato de sodio dibásico anhidro 21.290 g/1000 ml

Solución de trabajo: Se mezclaron la solución I con 240 ml de la solución II y 760 ml de la solución III. El pH se ajustó a 7.2 con la solución II si estaba alcalina y con la solución III si estaba ácida.

Amortiguador TRIS-Base 2 M

TRISMA-Base (Sigma) 24.22 g/100 ml

Se agregó HCl hasta ajustar el pH a 8.8

Amortiguador TRIS-cloruro de amonio

Solución I

cloruro de amonio 4.15 g/500 ml

Solución II

TRIS 2.05 g/100 ml

el pH se ajustó a 7.65 con NaOH o HCl 0.1 M

Solución de trabajo: Se mezclaron 450 ml de la solución I con 50 ml de la solución II y el pH se ajustó a 7.6 con NaOH o HCl 0.1 M

Amortiguador TRIS-glicina

TRISMA-Base 12.0 g

glicina-glicosola-acido amino acético 57.6 g

se aforó a 1000 ml con agua desionizada

Solución de trabajo: 200 ml de amortiguador TRIS-glicina, 8 ml de DES (10 mg/ml) se mezclaron y aforaron a 1000 ml con agua desionizada.

Amortiguador TRIS-HCl 2 M

TRIZMA-HCl (Sigma) 37.6 g/100 ml

Se agregó NaOH hasta ajustar el pH a 6.8

A P E N D I C E C

Resinas

DEAE- celulosa. 15 g de DEAE-celulosa (Sigma) se hidrataron en 600 ml de NaOH 0.5 N y NaCl 0.5 N. La resina se mantuvo con agitación hasta desgasificar y se dejó sedimentar durante 30 min, el sobrenadante se decantó y se resuspendió en 600 ml de HCl 1 N. Nuevamente se dejó sedimentar, se decantó y se filtró en un embudo büchner de dos piezas y se lavó con HCl 1 N. Posteriormente se resuspendió en 600 ml de HCl 1 N, se filtró y se lavó con agua destilada hasta que el agua de lavado alcanzó pH de 7 aproximadamente. Finalmente la resina se ajustó a pH 8 mediante 3 pases de resuspensión y decantación en 600 ml de una solución concentrada de AF pH 8. Después se lavó una vez con AF pH 8 0.01 M, se resuspendió en 400 ml del mismo amortiguador y se conservó a 4°C.

Sefarosa. 200 g de sefarosa se hidrataron con 200 ml de agua destilada con agitación constante, se adicionaron 400 ml de bicarbonato de sodio 0.1 M pH 9.5 y 10 ml de solución de bromuro de cianógeno en acetonitrilo (2g/ml) y se mantuvo en agitación constante durante 5 min. Se filtró la resina en un embudo büchner "C" y se lavó con 250 ml de bicarbonato de sodio, 3 lt de agua destilada y 3 lt de ASF 0.01 M pH 7.0. Los grumos formados se eliminaron agitando fuertemente el paquete en 800 ml del mismo amortiguador. Se filtró nuevamente, se resuspendió en AB pH 8.76 y se adicionó 6.5 mg de DNP-lisina (Sigma) disuelta en AB a una concentración de 1mg/ml. Se agitó durante 5 h a 4°C, se filtró y se lavó con 1 lt de AB. Finalmente se resuspendió en 200 ml de glicina 1 M (Sigma) y se mantuvo con agitación constante durante toda una noche. Se lavó con ASF

y se resuspendió en el mismo amortiguador conservándose a 4°C.

Dowex. 30 g de dowex se hidrataron con tres volúmenes de agua destilada, se dejó sedimentar y se decantó. Posteriormente se lavó con agua destilada mediante pases de resuspensión y decantación hasta eliminar los residuos finos del sobrenadante.

La resina se empacó en la columna y se lavó con 250 ml de acetato de sodio al 10 % y en seguida con agua destilada adicionada con azida de sodio hasta tener en el eluido el pH de la misma. Antes de pasar la muestra se lavó con ASF 0.01 M pH 7.2 hasta tener en el eluido el pH del amortiguador.

A P E N D I C E D

Técnicas de detección de anticuerpos.

Las técnicas utilizadas para determinar la actividad anti-DNP de los anticuerpos obtenidos fueron doble inmunodifusión (DID), hemaglutinación pasiva e inhibición de la hemaglutinación con DNP-ficoll.

Doble inmunodifusión. Se prepararon portaobjetos barnizados con agarosa al 0.1 % en ASF 0.15 M pH 7.2 Sobre cada uno de los portaobjetos se colocaron 4 ml de agarosa al 0.6 % disuelta al punto de ebullición en el mismo amortiguador y adicionada con azida de sodio.

Después de colocar las muestras respectivas se incubaron a temperatura ambiente durante 24 h aproximadamente en cámara húmeda. Cuando aparecieron las bandas de precipitación, se lavaron las placas con solución salina al 0.85 % durante 7 días. Posteriormente las placas se secaron, se tñeron con ácido negro al 0.1 % durante 10 min y se lavaron con ácido acético al 10 % hasta eliminar los residuos de colorante.

Hemaglutinación. Para la hemaglutinación tanto pasiva como la inhibición de la misma con DNP-ficoll se acoplaron glóbulos rojos de carnero (GRC) a trinitrofenol (TNP).

Para el acoplamiento del TNP a los GRC se empleó el siguiente protocolo: Los GRC se obtuvieron asépticamente 3 días antes de ser acoplados y se conservaron en solución estéril de Alsever a 4°C. Los GRC se lavaron por centrifugación a 400 $\times g$ durante 10 min tres veces con ABM. Del paquete de GRC se tomó 1 ml y se colocó en 7 ml de amortiguador de cacodilatos 0.28 M pH 6.9 (106) en el que pre -

viamente se disolvieron 25 mg de ácido 2,4,6-trinitrobencénicosulfónico (Eastman) y se mantuvieron con agitación constante en la obscuridad durante 10 min. Posteriormente se lavaron en 35 ml de ABM frío, por centrifugación a 400 xg durante 10 min. Se dió una segunda lavada en las mismas condiciones pero con ABM previamente adicionado con 22 mg de glicil-glicina (Sigma)(69). Finalmente se lavaron a 400 xg durante 10 min hasta obtener el ABM transparente. El acoplamiento de los GRC al TNP se probó con un antisuero anti-TNP obtenido en borrego previamente absorbido con GRC a 4°C durante 60 min y descomplementado durante 30 min a 56°C.

Hemaglutinación pasiva. En placas de hemaglutinación (Dynatech-laboratoires) se agregaron 0.025 ml de cada muestra, 0.025 ml de GRC acoplados y se incubaron a 37°C durante 60 min. después se lavaron 3 veces por centrifugación a 50 xg durante 3 min con ABM y se agregaron 0.025 ml de suero anti-inmunoglobulina de ratón diluido 1:6, previamente inactivado y absorbido. Las placas se incubaron a temperatura ambiente durante 15 h.

Inhibición de la hemaglutinación con DNP-Ficoll. Se emplearon soluciones de DNP-Ficoll a concentraciones de 1000, 500, 250, 125, 62.5, 35.25, 15.12 y 7.56 mg/ml; de las cuales se colocaron 0.05 ml en una placa de hemaglutinación. A la vez, se añadieron 0.05 ml de GRC acoplados. Las placas se incubaron a 37°C durante 60 min y después se agregó 0.05 ml de suero anti-inmunoglobulinas de ratón diluido 1:6; previamente inactivado y absorbido. Finalmente se incubaron a temperatura ambiente durante 15 h.

Las técnicas utilizadas para determinar la clase de anticuer-

pos obtenidos fueron inmunolectroforesis, electroforesis reductora e isoelectroenfoque.

Inmunolectroforesis. Los geles se prepararon colocando los portaobjetos sobre inmunomarcos y sellando las uniones con agarosa al 0.8% preparada con AB (Electra BI Buffer, Helena, Lab. USA) y adicionado con azida de sodio. Se colocaron 24 ml de agarosa en la misma concentración por inmunomarco y se dejó gelificar. Las muestras se colocaron y para su separación se pusieron en un campo eléctrico con un potencial de 2 miliampares por laminilla durante 60 min. Después se colocó el antisuero y se incubaron 24 h a temperatura ambiente en cámara húmeda. Cuando aparecieron las bandas de precipitación se lavaron y tñieron con la metodología empleada en la DID.

Electroforesis reductora. Para la electroforesis se prepararon dos geles. El gel inferior se preparó con 11 ml de acrilamida 30 % y bisacrilamida 0.8 %, 6 ml de TRIS-base, 0.3 ml de DSS al 10 %, 0.5 ml de persulfato de amonio (10g/ml) y 11.25 ml de agua destilada. Se desgasificó con agitación durante 2 min y se acidionó 30 μ l de tetrametiletilendiamina (TEMED) volviéndose a desgasificar de la misma manera. Se dejó polimerizar durante 2 h. El gel superior se preparó con 3.5 ml de acrilamida y bisacrilamida en las mismas concentraciones que en el gel inferior, 0.65 ml de TRIS-HCl, 0.1 ml de DSS (10mg/ml) y 11.5 ml de agua destilada. Se desgasificó y se adicionó 10 μ l de TEMED, desgasificándose nuevamente. Se dejó polimerizar 60 min. Se colocaron los geles y se dejaron reposar durante 4 h.

Para correr las muestras se preparó una solución con 0.1 g de

DSS, 0.0074 g de etilendiaminotetracetato (EDTA), 1 ml de glicero -
rol, 0.1 ml de 2-mercaptoetanol (10%) y TRIS-HCl hasta 10 ml. Como
marcador se adicionó azul de bromofenol en una concentración final
del 10%. De esta solución se tomaron entre 5 y 20 μ l y se mezcla -
ron con 100 μ l de cada muestra con una concentración de 50 μ g, la
mezcla se calentó a 100°C durante 2 min.

En la cámara mayor se colocaron 1000 ml de amortiguador TRIS-
Glicina y sobre el gel superior se colocó un poco del mismo amorti -
guador; en seguida se adicionaron las muestras. La cámara menor se
cubrió con 500 ml del amortiguador anterior y para la separación -
de las muestras se pusieron en un campo eléctrico con 15 miliampe -
res por placa. Cuando el frente de iones pasó del gel superior al
inferior el voltaje se aumentó al doble hasta que el frente de io -
nes llegó al final del gel.

La tinción del gel se hizo con una mezcla de azul de coomassie
al 0.06%, metanol al 30% y ácido acético al 10%. Cuando aparecieron
las bandas se lavó toda la noche en ácido acético al 10%.

Isoelectroenfoque. Para el isoelectroenfoque se efectuaron -
dos electroforesis. En la primera se separaron los componentes del
anticuerpo de acuerdo a su punto isoelectroico y en la segunda por
peso molecular. (electroforesis reductora).

El gel para la primera electroforesis se preparó con 2.5 ml -
de acrilamida al 18% y bisacrilamida al 0.65% en área 8.5 M, 0.2
ml de Nondet P-40, 0.25 ml de anfolinas pH 3, 0.25 ml de anfolinas
pH 10, 7 ml de urea 10 M. La mezcla se desgasificó al vacío duran -
te 2 min; se adicionaron 20 μ l de persulfato de amonio para nueva -
mente desgasificar durante 0.5 min. Finalmente se agregó 10 μ l de

TEMED. El gel se colocó en un tubo de vidrio de 0.3 cm de diámetro hasta cubrir una distancia de 10 cm y se dejó polimerizar durante 2 h. Para correr la muestra se preparó una solución de la composición siguiente: 20 μ l de muestra en 10 mg de urea, 1 μ l de DSS al 10 % y 1 μ l de 2-mercaptoetanol. Se calentó a 100°C durante 2 min. Después de enfriarse se colocó sobre el gel y sobre la solución se adicionaron 27 μ l de amortiguador de lisis con 1 μ l de azul de bromofenol como marcador.

Para la separación de la muestra se colocó la parte inferior del tubo en NaOH 0.02 M y la superior en ácido fosfórico 0.01 M. Se aplicó un potencial eléctrico con un rango de 400 a 1200 volts en 3 h. Después de extraer el gel del tubo se mantuvo en 50 ml de amortiguador de equilibrio durante 2 h.

Para la segunda electroforesis, el primer gel se sobrepuso al gel superior de la electroforesis reductora y se procedió a la separación como se indica en la parte correspondiente.

B I B L I O G R A F I A

- 1) Ahkong, Q. F., Fisher, D., Tampion, W. y Lucy, J. A., *Nature* 253: 194, 1975
- 2) Ahkong, Q. F., Howell, J. I., Lucy, J. A., Safuat, F., Davez, M. R. y Cocking, E. C., *Nature* 255: 66, 1975
- 3) Askonas, B. A., Williamson, A. R. y Wright, B. E., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 67: 1398, 1970
- 4) Barski, G., Sorieul, S. y Cornefert, F. J., *Natl. Cancer Inst.* 26: 1269, 1961
- 5) Benedetti, E. L. y Enselot, P., *S. Cell Sci.* 2: 499, 1967
- 6) Berner, G. M. y Cebra, J. J., *J. Immunol* 95: 246, 1965
- 7) Bossa, M. y Weiler, E., *J. Immunol* 104: 203, 1970
- 8) Boyce, E. A., Old, L. J. y Chouroulinkov, I., *Meth. Med. Res.* 10: 39, 1964.
- 9) Breard, J., Reinkerz, E. L., Kung, P. C., Goldestein, G. y Scholossman, S. P., *J. Immunol* 124: 1943, 1980
- 10) Brodsky, F. M., Bodmer, W. F. y Parhas, P., *Er. J. Immunol* 9: 536, 1979
- 11) Burgos, M. H. y Fawcett, D. W., *J. Biophys. Biochem. Cytol.* 1: 287, 1955
- 12) Burnet, F. M. "The clonal selection theory of acquired immunity" Vanderbilt University Press. Nashville, Tennessee. 1959
- 13) Burrows, P. P., Beck, G. B. y Wabl, M. R. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78: 564, 1981
- 14) Cebra, J. J., Colberg, J. E., Dray, S., *J. Exp. Med.* 123: 547, 1966
- 15) Cotton, R. G. H. y Milstein, C., *Nature* 244: 42, 1973
- 16) Craig, S. P., Mitchell, P. M., Cruise, M. K. y Rickard, D. M., *The Australian journal of experimental biology and medical science* 58: 339, 1980
- 17) Croce, C., Sawicki, W., Kritchevsky, D. y Koprowski, H., *Exp. Cell - Res.* 67: 427, 1971
- 18) Crowle, A. J., *Immunodiffusion*, 2nd Ed. Acad. Press. 1973
- 19) Curtis, A. W. y Chase, M. W. (Ed) *Methods in immunology and immunochemistry* I, II, III. Acad. Press. 1968
- 20) Charon, D. J. y McDevit, H. O., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76: 6567 1979

- 21) Chiappino, G. y Pernis, B., *Pathol. Microbiol.* 27: 8, 1964
- 22) Davidson, R.L. y Gerald, P.S., *Meth. in Cell Biol.* 15: 325, 1977
- 23) Davidson, R.L. y Gerald, P.S., *Somat. Cell Genet.* 2: 165, 1976
- 24) Davidson, R.L., *Exp. Cell Res.* 55: 422, 1969
- 25) Dingle, J.T., *Br. Med. Bull.* 24: 141, 1968
- 26) Eisenbarth, G.S., Walsh, F.S. y Nirenberg, M., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76: 4913, 1979
- 27) Elgeneter, A., Shotton, D.M. y Branton, D., *Biochim. Biophys. Acta* - 426: 101, 1976
- 28) Eshhar, A., Ofarim, M. y Waks, T., *J. Immunol.* 124: 775, 1980
- 29) Galfre, G., Howe, S.C., Milstein, C., Butcher, G.W. y Howard, J.D., *Nature* 266: 550, 1977
- 30) Garvy, J.S., Crenner, N.E. y Sussdorf, D.H., *Methods in immunology*. W.A. Benjamin, USA? 1979
- 31) Geffer, M.L., Margolies, D. y Sharf, M.D., *Somat. Cell Genet.* 3: 231, 1977
- 32) Gingel, D. y Ginsberg, L., *Cell Surface Rev.*, 5: 791, 1978
- 33) Haest, C.W.M., Verkleij, A.J., DeGier, J., Scheek, R., Veruergaert, P.H. J. y VanDeenen, L.L.M., *Biochim. Biophys. Acta* 357: 17, 1974
- 34) Hales, A., *Somat. Cell Genet.* 3: 227, 1977
- 35) Halverson, C.A., Esser, A.F. y Sousa, K.A., *J. Supramolec. Struct.* 8: 129, 1978
- 36) Ham, A.W. "Histology" 7th Ed. Lippincott, Philadelphia, Pennsylvania, 1974
- 37) Hansen, J.A., Martin, P.J. y Nowinski, R.C., *Immunogenetics* 10: 247, 1980
- 38) Harris, H., Wtkins, J.F., Ford, C.E. y Schoeff, G.I., *J. Cell Sci.* 1: 1, 1966
- 39) Holtzer, H., Abbott, J. y Lash, J., *Anat. Rec.* 111: 567, 1958
- 40) Ivanyi, J. y Davies, P., *Mol. Immunol.* 17: 287, 1980
- 41) Jacobson, C.O., *Exp. Cell Res.* 53: 316, 1968
- 42) James, R. y Branton, D., *Biochim. Biophys. Acta* 123: 387, 1973
- 43) Jerne, N.V. y Nordin, A.A., *Science* 40: 405, 1963
- 44) Kavanau, J.L. "Structure and function in biological membranes" I y II, Holden-Day, San Francisco, California, 1965

- 45) Kao, K.N. y Michayluk, M.R., *Planta* 115: 355, 1974
- 46) Kinkade, P.W., Lawton, A.R., Bochman, D.E., y Cooper, M.D., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*: 67: 1918, 1970
- 47) Kishimoto, R. e Ishizaka, K., *J. Immunol.* 114: 1177, 1975
- 48) Knutton, S., *J. Cell Sci.* 36: 61, 1979
- 49) Köhler, G., Hengartner, H. y Schulman, M.J., *Eur. J. Immunol.* 8: 82, 1978
- 50) Köhler, G. y Milstein, C., *Nature* 256: 495, 1975
- 51) Köhler, G., Howe, S.C., y Milstein, C., *Eur. J. Immunol.* 2: 292, 1976
- 52) Köhler, G. y Milstein, C., *Eur. J. Immunol* 6: 511, 1976
- 53) Köhler, G. *Isoelectrofocousin, Course on tecnology of hybridoma, Bello Horizonte, Brazil, 1979*
- 54) Konberg, R.D. y McConnell, H.M., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 68: 2564, 1972.
- 55) Konberg, R.D. y McConnell, H.M., *Biochemistry* 10: 111, 1972
- 56) Krahling, H., Schinkewitz, U., Barker, A. y Hulser, D.F., *Cytobiologie* 17: 51, 1978
- 57) Lagunoff, D.J., *J. Cell Biol.* 57: 252, 1973
- 58) Lawson, D., Raff, M.C., Comperts, V., Pestrell, C. y Gulula, N.B., *J. Cell Biol.* 72: 242, 1977
- 59) Lawton, A.R., Asofsky, R., Hyton, M.V. y Cooper, M.D., *J. Exp. Med.* 135: 277, 1972
- 60) Leinwand, L.A., Kozak, C.A. y Ruddle, F.H., *Somat. Cell Genet.* 4: 223, 1978
- 61) Lenke, H., Hünnerling, G.J., Höhmann, C. y Rajewsky, K., *Nature* 271: 249, 1978
- 62) Levy, R. y Dilley, J., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 75: 2411, 1978
- 63) Levy, R., Dilley, J., Fox, R.I. y Warnke, R., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76: 6552, 1979
- 64) Lewis, W.H., *Am. Rev. Tuberc.* 15: 616, 1927
- 65) Ling, N.R. "Lymphocyte activation" Willey, N.Y. 1968
- 66) Littlefield, J.W., *Science* 145: 709, 1964
- 67) Lowry, V.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. y Randal, R.J., *J. Biol. Chem.* 193: 1951
- 68) Lucy, J.A., *Nature (London)* 227: 315, 1970
- 69) Macris, N.T. y Chase, M.W., *Fed. Proc.* 24: 185, 1965
- 70) Maggio, B., Ahkong, Q.F. y Lucy, J.A., *Biochem. J.* 155: 353, 1976

- 71) March, S.C., Parikh, I. y Cuatrecasas, P., *Analytical Biochemistry* 60: 119, 1974
- 72) Mandel, M.A. y DeConse, J.J., *Surg. For.* 21: 129, 1970
- 73) Maroudas, N.G., *Nature (London)* 254: 695, 1975
- 74) Maul, G.G., Stepienewski, Z., Weibel, J. y Koprowski, H., *In vitro* 12: 787, 1976
- 75) McIntere, K.R. y Princler, G.L., *Immunology* 17: 481, 1969
- 76) McMichael, A.J., Pilch, J.R., Galfre, G., Mason, D.Y., Fabre, J.W.-y Milstein, C., *Eur. J. Immunol.* 9: 205, 1979
- 77) Mervin, R.M. y Algire, G.H., *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.* 101: 437, 1959
- 78) Milstein, C., Adetugbo, K., Cowan, M.J., Köhler, G., Secher, D.S. y Wilde, C.D., *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 41: 793, 1976
- 79) Molinaro, G.A., Quaranta, V. y Ferrans, S., *Transplantation Proceeding* 11: 748, 1979
- 80) Morse, H.C., *J. Immunol.* 120: 44, 1978
- 81) Nabholz, M. *Criopreservation, Course on technology of hybridoma, Bello Horizonte, Brazil.* 1979
- 82) Nossal, G.J.V. Warner, N.L. y Lewis, H., *Cellular Immunol.* 2: 41, 1971
- 83) Nowinski, R.C., Lostrom, M.E., Tam, M.R., Stone, M.R. y Burnette, W.F. *Virology* 91: 111, 1979
- 84) O'Farrel, P.H., *J. Biol. Chem.* 250: 4007, 1975
- 85) Okada, Y., *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 48: 102, 1969
- 86) Okada, Y., y Murayama, F., *Exp. Cell Res.* 52: 34, 1968
- 87) Orci, L., Perrelet, A. y Friend, D.S., *J. Cell Biol.* 75: 23, 1977
- 88) Orozlar, S. y Nowinski, R.C., *Virology* 101: 296, 1980
- 89) Ovary, Z. y Benacerraf, B., *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 114: 72, 1963
- 90) Palade, G.E. y Burns, R.R., *J. Cell Biol.* 37: 633, 1968
- 91) Papahadjopoulos, D., Poste, G. y Shaeffer, V.E., *Biochim. Biophys. Acta* 121: 23, 1973
- 92) Parham, P., y Bodmer, W.F., *Nature* 276: 397, 1978
- 93) Parham, P., Barnstable, C.J. y Bodmer, W.F., *J. Immunol.* 121: 342, 1979
- 94) Pearson, T.W., Pinder, M., Roselants, G.E., Kar, K.S., Lundin, L.B., Mayor-Withey, K.S. y Hewett, R.S., *J. Immunol. Meth.* 14: 141, 1980
- 95) Pérez, M.R.E. "Cooperatividad de la reacción antígeno-anticuerpo" Tesis para obtener el título de QFB, Fac. Química, UNAM. 1977

- 96) Pernis, B., Forni, L. y Amante, L., Ann. NY Acad. Sci. 190: 420, 1971
- 97) Pinto DA Silva, P. y Nicolson, G.L., Biochim. biophys. Acta 363: 311, 1974
- 98) Pontecorvo, G., Annu. Rev. Microbiol. 10: 393, 1956
- 99) Pontecorvo, G., Riddle, P.N. y Hales, A., Nature (London) 265: 257, 1977
- 100) Pontecorvo, G., Somat. Cell Genet. 1: 397, 1975
- 101) Porath, J., Axen, R. y Ernback, S., Nature 215: 1491, 1967
- 102) Poste, G. y Pasternak, G.A., In Cell Surface Reviews 5: 305, 1978
- 103) Potter, M., Ann. NY Acad. Sci. 190: 306, 1971
- 104) Potter, M. y Robertson, C.L., J. Natl. Cancer Inst. 25: 847, 1960
- 105) Potter, M. y Boyce, C., Nature 193: 1086, 1962
- 106) Potter, M., Adv. Immunol. 25: 141, 1977
- 107) Press, J.L. y Klinman, N.R., Eur. J. Immunol. 4: 155, 1974
- 108) Reinherz, E.L., Kung, P.C., Goldstein, G., Levey, R.H. y Schlossman, S.F., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77: 1598, 1980
- 109) Reinherz, E.L., Kung, P.C., Goldstein, G. y Schlossman, S.F., J. Immunol. 124: 1301, 1980
- 110) Reth, M., Hammerling, G. y Rajewsky, K., Eur. J. Immunol. 8: 393, 1978
- 111) Rittenberg, M.B. y Askrat, A.A., J. Immunol. 97: 421, 1966
- 112) Ritz, J., Pesando, J.M., Notis-McConarty, J., Lazarus, H. y Schlossman, S.F., Nature 283: 583, 1980
- 113) Robinson, J.M., Roos, D.S., Davidson, R.L. y Karnowsky, J.J., J. Cell Sci. 40: 63, 1979
- 114) Roehring, J.T., Coe, J.A. y Schlesinger, J.J., Virology 101: 41, 1980
- 115) Rosenblith, J.Z., Ukena, P.D., Berlin, R.D. y Karnowsky, M.J., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 70: 1625, 1973
- 116) Secher, D.A., Milstein, C. y Adetunbo, K., Immunol. Rev. 36: 51, 1977
- 117) Schwaber, J. y Cohen, E.P., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 71: 2203, 1974
- 118) Sheid, A. y Choppin, P.W., Virology 57: 475, 1974
- 119) Shevach, E.M., Stobo, J.D. y Green, I., J. Immunol. 108: 1146, 1972
- 120) Shulman, M., Wilde, C.D. y Köhler, G., Nature 276: 269, 1978
- 121) Singer, S.J. y Nicholson, G.L., Science 175: 1972
- 122) Smith, C.W. y Goldman, A.S., Exp. Cell Res. 66: 317, 1971
- 123) Springuer, T., Galfre, G., Secher, D.S. y Milstein, C., Eur. J. Immunol. 8: 539, 1978
- 124) Stadler, J.K. y Adelberg, E.A., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 69: 1929, 1972

- 125) Stahli, C., Staehelin, T., Miggiano, V., Schmidt, J., y Herring, P.
Course on tecnology of hybridoma, Bello Horizonte, Brazil, 1979
- 126) Stern, P.L., Willison, K.R., Lennox, E., Galfre, G. y Milstein, C.,
Cell 14: 775, 1978
- 127) Takakura, K., Yamada, H., Weber, A.J. y Hollanier, V.P., *Cancer Res.*
27: 932, 1967
- 128) Tandler, B. y Poulsen, J.H., *J. Cell Biol.* 68: 775, 1976
- 129) Taniguchi, M y Miller, J.F.A.P., *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 91:
212, 1978
- 130) Taylor, R. B., Duffus, W.P.H., Raff, M.C., y dePetris, S., *Nature (Lon-
don) New Biol.* 233: 225, 1971
- 131) Trucco, M.M., Stocker, J.W. y Cappelini, R., *Nature* 273: 666, 1978
- 132) Turner, V.M., Smith, M., Turner, V.S., Kicherlapati, R.S., Ruddle, F.H.
y Hirschhorn, K., *Somat. Cell Genet.* 4: 45, 1978
- 133) Tzartos, S.J. y Linostrom, J.M., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 11: 775,
1978
- 134) Vaughan, L.V., Hansen, D., Stadler, J., *Somat. Cell Genet.* 2: 537, 1976
- 135) Volsky, D.J. y Loyter, A., *J. Cell Biol.* 78: 465, 1978
- 136) Vos, J., Ahkong, Q. F., Bothan, G.M. Quirk, S.J. y Lucy, J.A., *Biochem.
J.* 158: 651, 1976
- 137) Wabe, M.R., Porni, L. y Loor, F. *Science* 199: 1078, 1978
- 138) Wang, A.C., Wilson, S.K., Hopper, J.E., Fudenberg, H.H. y Nisonoff, A.,
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 66: 337, 1970
- 139) Warner, N.L., *A. Immunol.* 19: 631, 1974
- 140) Weber, K., Pingle, J.R. y Osborn, M., Measurement of molecular -
weight by electrophoresis on SDS-acrilamide gel. *Methods in En-
zimology XXVI*, Acad. Press, 1972
- 141) Whaley, W.G., Dausliet, M. y Kephart, J.E., *Science* 175: 596, 1972
- 142) Weiss, M.C. y Green, H., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 58: 1104, 1967
- 143) Yanovsky, A. y Loyter, A., *J. Biol. Chem.* 247: 4021, 1972
- 144) Yuan, D., Vitetta, E.S. y Kittman, J.R., *J. Exp. Med.* 145: 142, 1977
- 145) Yoshida, N., Nussenzweig, R.S., Potocnjack, P., Nussenzweig, V.Y.,
Science, 207: 71, 1980.
- 146) Roit, I. "Essential immunology" Blackwell Scientific publica-
tions, London, 1980.