



15
2 Gen

Universidad Nacional Autónoma de México

FACULTAD DE QUÍMICA

OBTENCION Y CARACTERIZACION DE ANTICUERPOS MONOCLONALES
CONTRA EL FACTOR LIBERADOR DE LA HORMONA LUTEINIZANTE
(LHRH).

T E S I S

RAFAEL SIMITRIO SAAVEDRA DURAN

Químico Farmacéutico Biólogo

Año 1985



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 está 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.

INDICE

I.	INTRODUCCION	1
<u>1.</u>	<u>HORMONA LIBERADORA DE LA HORMONA LUTEINIZANTE</u>	
1.1	GENERALIDADES	2
1.2	BIOSINTESIS DE LA LHRH	4
<u>2.</u>	<u>ANTICUERPOS MONOCLONALES</u>	
2.1	DIVERSIDAD DE LOS ANTICUERPOS	8
2.2	PRINCIPIO DEL METODO DE OBTENCION DE ANTICUERPOS MONOCLONALES	13
2.3	PROPIEDADES Y APLICACIONES DE LOS ANTICUERPOS MONOCLO NALES	20
II.	<u>OBJETIVOS Y ENFOQUE EXPERIMENTAL</u>	23
III.	<u>MATERIAL Y METODOS</u>	
<u>1.</u>	<u>TECNICAS INMUNOQUIMICAS</u>	
1.1	CROMATOGRAFIA EN CAPA FINA	25
1.1.1	Revelado de péptidos	25
1.2	ACOPAMIENTO DE LA LHRH A PROTEINAS ACARREADORAS	26
1.3	PREPARACION DE UN CONJUGADO DE IgG DE CONEJO anti-IgG DE RATON-PEROXIDASA (RAM-POD)	27
1.3.1	Esquema de inmunización	27
1.3.2	Purificación de IgG de conejo anti-IgG de ratón ...	27
1.3.3	Eliminación de anticuerpos inespecíficos contra proteínas de caballo	28
1.3.4	Preparación del conjugado RAM-POD	28

1.4	OBTENCION DE OVOALBUMINA	29
1.5	ELISA PARA CUANTIFICAR ANTICUERPOS anti-LHRH	29
1.5.1	Detección y cuantificación de anticuerpos anti-LHRH	30
1.5.2	Ensayo de especificidad	30
1.5.3	Ensayo de competencia	30
1.6	IODINACION DE LHRH	30
1.7	RIA PARA ANTICUERPOS anti-LHRH	
1.7.1	Titulación de los anticuerpos	31
1.7.2	Ensayo de competencia	31
1.8	DETERMINACION DE CLASE DE INMUNOGLOBULINAS POR LA TECNICA DE OUCHTERLONY	
1.8.1	Preparación de placas	32
1.8.2	Determinación de clase	32
1.8.3	Tinción de las placas	32
1.9	PURIFICACION DE ANTICUERPOS MONOCLONALES DE RATON A PARTIR DE LIQUIDO ASCITICO	33
1.9.1	Precipitación del anticuerpo	33
1.9.2	Purificación por cromatografía de intercambio iónico	34
1.10	ELECTROFORESIS EN GEL DE ACRILAMIDA	34
1.11	ELECTROFOCALIZACION ANALITICA EN CAPA FINA DE GEL DE POLIACRILAMIDA	35
2.	<u>ESQUEMA DE INMUNIZACION</u>	36
3.	<u>CULTIVO DE CELULAS</u>	
3.1	RECOMENDACIONES	37
3.2	SOLUCIONES	37
3.3	SUEROS	38
3.4	MEDIO DE CULTIVO	38
3.5	CONGELACION DE CELULAS	39
3.6	DESCONGELACION	39
3.7	CRECIMIENTO	40
3.8	MEDICION DE LA VELOCIDAD DE CRECIMIENTO POR INCORPORACION DE TIMIDINA-H ³	40
3.9	DETECCION DE MICOPLASMAS	40
3.10	PRODUCCION DE HIBRIDOMAS	
3.10.1	Obtención de macrófagos de cavidad peritoneal de ratón	41

3.10.2	Fusión celular	41
3.10.3	Clonación en medio semisólido	42
3.10.4	Detección de hibridomas productores de anticuerpos <u>in situ</u>	43
3.10.5	Producción de líquido ascítico	44
IV.	<u>RESULTADOS</u>	
<u>1.</u>	ACOPAMIENTO DE LA LHRH A PROTEINAS ACARREADORAS	45
<u>2.</u>	DESARROLLO DE UN ELISA PARA LA DETECCION DE ANTICUERPOS anti-LHRH	48
2.1	OBTENCION Y CARACTERIZACION DE UN CONJUGADO RAM-POD	
2.1.1	Purificación del anticuerpo	48
2.1.2	Obtención del conjugado RAM-POD	51
2.2	OBTENCION DE OVOALBUMINA	51
2.3	OPTIMIZACION DEL ELISA	54
<u>3.</u>	INMUNIZACION DE LOS RATONES Y TITULACION DE LOS SUEROS POR ELISA	57
<u>4.</u>	ELECCION DEL PORCENTAJE OPTIMO DE SUEROS PARA CULTIVO DE CELULAS	58
<u>5.</u>	MONTAJE DE LA CLONACION EN AGAR SEMISOLIDO	61
<u>6.</u>	FUSION CELULAR Y CLONACION DE LOS HIBRIDOMAS	63
<u>7.</u>	CARACTERIZACION DE LOS ANTICUERPOS MONOCLONALES	
7.1	CARACTERIZACION DE LOS LIQUIDOS ASCITICOS	69
7.2	DETERMINACION DE LA CLASE	75
7.3	DETERMINACION DE LOS EPITOPOS DE LA LHRH RECONOCIDOS POR LOS ANTICUERPOS MONOCLONALES	75
7.4	ELECTROFOCALIZACION	83
V.	<u>DISCUSION DE RESULTADOS Y CONCLUSIONES</u>	
<u>1.</u>	PRODUCCION DE HIBRIDOMAS	87
<u>2.</u>	CARACTERIZACION DE LOS ANTICUERPOS	88
VI.	<u>BIBLIOGRAFIA</u>	93

ABREVIATURAS

DNA	Acido desoxirribonucleico
EB	Virus Epstein-Barr
ELISA	Ensayo inmunoenzimático en fase sólida
Ig	Inmunoglobulina
IgG	Inmunoglobulina G
LHRH	Hormona liberadora de la hormona luteinizante
PBS	Solución salina con amortiguador de fosfatos
pI	Punto isoelectrico
POPOP	p-Bis (2-(feniloxazolil))-benceno
PPO	2,5, difeniloxazol
PMSF	Fluoruro de fenilmetilsulfonato
Pristán	2,6,10,14 tetrametilpentadecano
RIA	Radioinmunoanálisis
RNA _m	Acido ribonucleico mensajero
RNA _n	Acido ribonucleico nuclear
SDS	Dodecil sulfato de sodio
SNC	Sistema nervioso central
SPRIA	Radioinmunoanálisis en fase sólida
SV40	Simian Virus 40
TEMED	N,N,N',N' tetrametiletildiamida
TRH	Hormona liberadora de la tirotrópina

I. INTRODUCCION

El descubrimiento de la estructura de la LHRH ha impulsado la investigación concerniente a su biosíntesis y a los mecanismos involucrados en su regulación, debido a la gran importancia del péptido al regular las funciones relacionadas con la reproducción.

La gran mayoría de los experimentos que se llevan a cabo para estudiar a la hormona, requieren la utilización de anticuerpos dirigidos en su contra los cuales tienen el inconveniente de obtenerse en cantidades limitadas y de presentar un sinnúmero de reacciones cruzadas, los cuales varían entre diferentes sangrías de un mismo animal, y son difícilmente controlables.

En 1975, Kohler y Milstein describieron la técnica que permite obtener anticuerpos monoclonales. A la fecha, la técnica se ha vuelto cada vez más accesible, permitiendo obtener anticuerpos monoclonales contra una gran variedad de antígenos. Con el fin de tener herramientas perfectamente caracterizadas que permitan estudiar la biosíntesis de la hormona LHRH y su regulación, se decidió producir anticuerpos monoclonales contra ella.

1. HORMONA LIBERADORA DE LA HORMONA LUTEINIZANTE (LHRH)

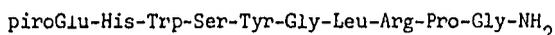
1.1 GENERALIDADES

El hipotálamo es un área relativamente pequeña que se encuentra en la base del cerebro formando la pared inferior y el piso del tercer ventrículo; está localizado abajo del tálamo, detrás de la lámina terminalis, frente a los cuerpos mamilares y constituido por agregados de neuronas llamados núcleos hipotalámicos. A pesar de su tamaño tan pequeño, el hipotálamo es una estructura compleja que regula funciones tan importantes como el control de la temperatura corporal, la regulación neuroendócrina e ingestiva, entre otros, cada una de las cuales se piensa está relacionada con cada núcleo hipotalámico (1).

En 1945 se propuso el control hormonal que ejerce el hipotálamo sobre la adenohipófisis o hipófisis anterior. Ciertas sustancias producidas por el hipotálamo y liberados por éste, llamados factores de regulación o de liberación, controlan la síntesis de las hormonas adenohipofisarias (2). Estudios posteriores llevaron a la confirmación de esta teoría y al descubrimiento y caracterización de diversos factores de liberación, los cuales son péptidos de bajo peso molecular y específicos para cada hormona adenohipofisaria. De ellos, los que se han identificado hasta la fecha son: la hormona liberadora de la tirotrópina o TRH, la hormona liberadora de la hormona luteinizante y de la folículo estimulante o LHRH, la somatostatina o factor-inhibidor de la hormona del crecimiento, la hormona liberadora de la corticotropina o CRF que regula la liberación de la hormona adenocorticotrófica -

(ACTH) y la hormona liberadora de la hormona del crecimiento o GHRH (2).

La síntesis y liberación de la hormona luteinizante y de la folículo estimulante en la adenohipófisis es regulada por la LHRH, conocida también como GnRH, que fue originalmente aislada y caracterizada en hipotálamo porcino en 1971 (3) como un decapeptido con los extremos COOH y NH₂ bloqueados según se observa en su estructura:



La hormona es sintetizada principalmente por las neuronas que constituyen el área media preóptica y los núcleos arcuato y paraventricular (4). Los axones de estas neuronas se proyectan hasta la eminencia media, donde sus terminaciones están en íntima conexión con el sistema porta-hipotalámicoadenohipofiseal (5). Es aquí donde la LHRH se libera para pasar al sistema porta y ser llevada a la adenohipófisis, donde actúa sobre las células gonadotropas por medio de receptores (6), para liberar las hormonas luteinizante (LH) y la folículo estimulante (FSH). Estas, a su vez, pasan a circulación y son transportadas para actuar sobre sus órganos blanco; las gónadas, donde realizan diversas funciones, a saber:

a) En los testículos, controlan la secreción de esteroides y la espermatogénesis. La LH se une a receptores membranales específicos en las células de Leydig, desencadenando una serie de reacciones que culminan con la producción de testosterona y estradiol. La testosterona liberada, junto con la FSH, actúan sobre las células de Sertoli donde influyen en la diferenciación de los espermatozoides y en la espermatogénesis, respectivamente (7,8).

b) En la mujer, la FSH promueve el crecimiento folicular, lo prepara para la acción de la LH y refuerza la liberación de estrógenos. La LH estimula la maduración final del folículo de Graaf, la ovulación y el desarrollo del cuerpo lúteo, estimulando además la secreción de estrógenos y progesterona (9).

Estas hormonas esteroides controlan a su vez la liberación de la LH y la FSH en la adenohipófisis ya sea por mecanismos de retroalimentación positiva o negativa, dependiendo del esteroide y de su concentración (1,10), modulando el número de receptores a la hormona por acción directa a nivel pituitario (11). Se ha observado que estos esteroides, en especial la progesterona, pueden también regular la liberación de la LHRH en la eminencia media, sin embargo su mecanismo de acción permanece aún sin aclararse (11).

Además de encontrarse en hipotálamo, la LHRH se encuentra en todo el SNC (12) así como en testículo (13), ovario (14) y placenta (15) aunque su -

función en estos tejidos no se conoce. Por otra parte, se ha propuesto que además de neurohormona puede también actuar como neurotransmisor (16) y ser el responsable de la conducta sexual.

1.2 BIOSÍNTESIS DE LA LHRH

El descubrimiento de la estructura de la LHRH ha ayudado a entender sus efectos fisiológicos sobre la regulación en la secreción de la LH y FSH en la adenopituitaria, pero actualmente poco es lo que se conoce sobre los mecanismos de su biosíntesis, así como de aquellos involucrados en la regulación de la misma. Los primeros estudios sobre la biosíntesis de la LHRH postulaban un mecanismo no ribosomal, en el cual, complejos enzimáticos específicos en ausencia de mRNA eran los responsables de la síntesis de la hormona (17). Los autores se basaban en el hecho de que algunos péptidos pequeños como la glutatióna y varios antibióticos peptídicos eran sintetizados de esta manera (18). Sin embargo, este péptido posee 2 características presentes en los péptidos sintetizados ribosomalmente, como la ciclización del residuo glutamina aminoterminal y la amidación del aminoácido carboxiterminal, lo cual contradecía este tipo de mecanismo. La biosíntesis por vía ribosomal hace pensar en la posibilidad de que el péptido se derive de un precursor de alto peso molecular, el cual es procesado en la neurona para dar lugar al péptido biológicamente activo, como en el caso del TRH, la ACTH y las encefalinas, cuyas vías de biosíntesis se han demostrado y caracterizado que ocurren de esta manera (19).

Los estudios iniciales hechos por Fawcett et al. (20) demostraron la existencia de una sustancia de alto peso molecular que reaccionaba con anticuerpos anti-LHRH; posteriormente, el uso de anticuerpos dirigidos contra la parte central de la molécula han permitido detectar especies inmunorreactivas de alto peso molecular (21,22,23), lo cual indica que la molécula de LHRH posiblemente se encuentra dentro de la secuencia de la especie de alto peso molecular que bien podría ser el precursor biosintético. Se han hecho numerosos intentos para tratar de caracterizar al precursor utilizando traducción de mRNA de hipotálamo de roedor en un sistema libre de células e inmunoprecipitando los productos de traducción con anticuerpos anti-LHRH, pero los resultados de diversos grupos no han sido reproducibles, ya que se han obtenido pesos moleculares que varían de 28,000 (24) hasta 50,000 daltons (25), obtenido este último en nuestro laboratorio. Por otra parte, se ha demostrado que al tratar las formas de LHRH de alto peso molecular con enzimas como tripsina, aminopeptidasa y carboxipeptidasa, los productos de degrada -

ción obtenidos exhiben una marcada elevación en su efecto biológico (21). - No obstante, estos y otros estudios han permitido postular a Millar un posible mecanismo de biosíntesis de la LHRH, el cual se muestra en la figura # 1. Este mecanismo no ha sido totalmente demostrado y está basado en la similitud de esta hormona con otros péptidos, así como en ciertos estudios hechos por Millar sobre la intervención de algunas enzimas en el procesamiento de algunos precursores aislados por él.

En 1984, P. Seeburg y J. Adelman (26) aislaron un cDNA (DNA complementario) de placenta humana que codifica para un péptido de 10,000 daltons que contiene la secuencia de la LHRH (figura # 2). Se observa en la estructura del precursor, que posterior al extremo carboxiterminal de la hormona, se encuentra una gly que origina el amido terminal y los aminoácidos básicos que son reconocidos por enzimas, liberando así la LHRH tal y como se había propuesto con anterioridad. Por otra parte, se han encontrado ciertas evidencias que dentro de este precursor se encuentra la secuencia del factor inhibidor de la prolactina (27,28).

En la actualidad se desconoce el lugar preciso donde el precursor es procesado para dar lugar al péptido activo. Sin embargo, ha sido posible detectar por técnicas de inmunofluorescencia, utilizando anticuerpos contra la parte central de la molécula, la presencia del posible precursor en el somatoneuronal, mientras que la LHRH se localiza en las terminaciones nerviosas (4). Esto ha permitido que algunos autores sugieran que el precursor es sintetizado en el soma neuronal, aislado en vesículas del aparato de Golgi y transportado por el axón a la terminal nerviosa. Durante su paso por el axón, el precursor es procesado para dar lugar a la LHRH, la cual, en la terminal nerviosa es liberada al sistema porta (5).

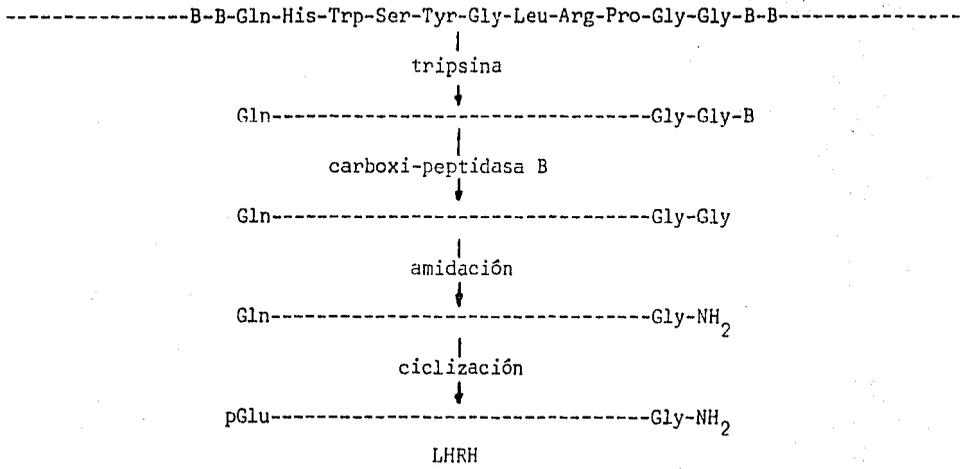


FIGURA # 1: Estructura propuesta del pro-LHRH y su conversión hasta LHRH, propuesta por Millar et al. (21).

2. ANTICUERPOS MONOCLONALES

2.1 DIVERSIDAD DE LOS ANTICUERPOS

Los anticuerpos forman la clase de proteínas llamadas inmunoglobulinas; se encuentran formadas por una unidad básica consistente en 2 cadenas pesadas o H, de peso molecular 50,000 y formadas por 450 aminoácidos, y 2 cadenas ligeras o L de peso molecular 25,000 y formadas por 214 aminoácidos. Las cadenas ligeras se encuentran unidas a las cadenas pesadas por puentes disulfuro, así como la unión entre ambas cadenas pesadas, como se observa en la figura # 3. Las cadenas pesadas y ligeras a su vez, están constituidas por una parte variable V y una parte constante C; las partes constantes de las cadenas pesadas definen la clase o subclase de la inmunoglobulina, siendo altamente constante dentro de la misma clase, aún cuando la especificidad antigénica sea muy diferente. La parte constante de la cadena ligera, en cambio, define el tipo de la misma.

Las partes variables de ambas cadenas se encuentran en la parte amino terminal y están constituidas por 110 aminoácidos aproximadamente. Dentro de estas regiones variables, se encuentran 3 segmentos llamados hipervariables donde la variabilidad de aminoácidos es extrema en cada una de las 2 cadenas, siendo esta una de las causas de la gran diversidad de especificidades de los anticuerpos (29). En su estructura tridimensional los 6 segmentos hipervariables se juntan para formar el sitio de reconocimiento del anticuerpo hacia el antígeno, el cual puede ser diferente entre 2 anticuerpos que reconozcan un mismo determinante antigénico o epítipo (29,30).

La gran diversidad que se presenta en los anticuerpos se encuentra controlada a nivel genético. Los anticuerpos son codificados por 3 grupos de genes: 2 de ellos codifican para las cadenas ligeras y son los llamados loci λ y κ y uno para la cadena pesada llamado locus H (31). Cada locus, a su vez, se encuentra constituido por diversos segmentos genéticos que codifican para las partes constantes y para las partes variables. Para las cadenas pesadas, la parte variable es codificada por los segmentos V, D y J y las partes constantes de las diferentes clases de inmunoglobulinas por los segmentos C; las cadenas ligeras presentan la misma organización a excepción del segmento D, que está ausente (31). Estos segmentos se encuentran separados entre sí por muy largas secuencias de DNA no codificante (29). En el ratón existen 2 segmentos V_{λ} , $4J_{\lambda}$ y $4C_{\lambda}$; 200-300 V_{κ} , $5J_{\kappa}$ y $1C_{\kappa}$; 200-300 V_H , 10-20 -

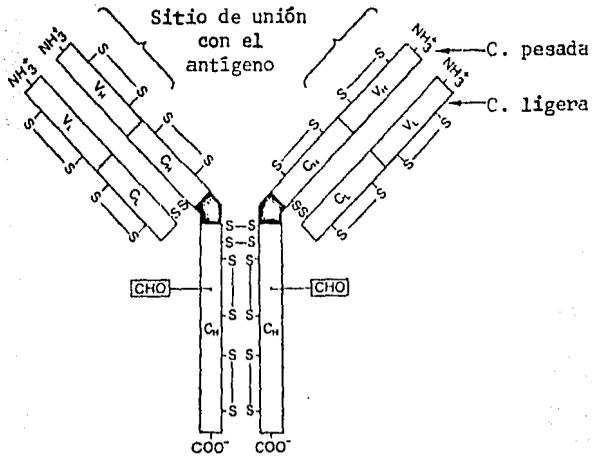


FIGURA # 3: Estructura de una molécula de inmunoglobulina.

- V_H: Parte variable de la cadena pesada
- V_L: Parte variable de la cadena ligera
- C_H: Parte constante de la cadena pesada
- C_L: Parte constante de la cadena ligera
- CHO: Cadena de carbohidrato

D_H , $4J_H$ y 10 C_H ; la distribución de los genes se muestra en la figura # 4. - Los genes κ , λ y H se encuentran localizados en el ratón en los cromosomas - 6, 16 y 12 respectivamente, mientras que en el hombre se encuentran en los - cromosomas 2, 22 y 14 (29).

El arreglo de estos genes, cuya expresión final es un tipo de inmunoglobulina se lleva a cabo durante la diferenciación de los linfocitos, siendo - independiente de un linfocito a otro (31,32). El DNA germinal conteniendo - los diversos segmentos codificantes para las partes variables y constantes - sufre un arreglo a nivel de los genes codificantes para la parte variable: - un segmento V, uno D y uno J (o uno V con uno J para las cadenas ligeras) - son unidos, escindiéndose las partes de DNA no codificante entre las regio - nes que las separan (figura # 5). Este DNA es transcrito a un nRNA y éste, a su vez, es usado para producir un mRNA; en este paso, llamado "splicing", - los segmentos VDJ ya unidos se unen al segmento C_H para formar un mRNA que - ya no contiene las partes correspondientes de DNA no codificante. Este mRNA es traducido en los ribosomas para formar cadenas pesadas μ . Dos cadenas μ se unen a dos cadenas ligeras previamente sintetizadas para formar así, una - IgM que queda anclada a la membrana celular en forma de receptor. Cuando un antígeno es reconocido por la IgM de membrana, se llevan a cabo una serie de eventos que llevan a la célula a diferenciarse y a dividirse formando una - clona de células productoras de un mismo anticuerpo. Es en esta fase donde el linfocito puede dejar de producir una IgM y producir otra clase de inmuno - globulina. Esto resulta del mecanismo llamado "class switching" (33) que ocurre a nivel del DNA y, en el cual, el segmento que codificaba para la re - gión constante de las cadenas μ (y eventualmente, otros segmentos codifican - tes para regiones de cadenas pesadas de otras clases) se eliminan. Como re - sultado de este proceso, el grupo de segmentos VDJ unidos se encuentran ahora cercanos de un nuevo segmento codificante para una región constante dife - rente (γ , ϵ ó α), para dar lugar a un nRNA y después del "splicing" a un - mRNA que va a codificar para una inmunoglobulina con la misma parte variable pero de clase diferente (33).

Se ha estimado que un animal es capaz de producir aproximadamente 10^8 - moléculas de anticuerpos diferentes (31), cada una de ellas con cierta espe - cificidad y producida por una clona de linfocitos. Esto se explica debido a la enorme diversidad existente en los genes que codifican para ellos y a las múltiples combinaciones de ensamblaje entre la unión de un solo segmento V, - uno D, J y C (y V, J y C para las cadenas ligeras) (32); estas combinaciones aumentan al tomar en cuenta que una cadena ligera puede acoplarse con cual - quier cadena pesada para formar diferentes inmunoglobulinas. Mas aún, se ha

REGION VARIABLE

REGION CONSTANTE

cadenas ligeras	κ	$V_{\kappa 1}$ $V_{\kappa 2}$ V_{κ} $J_{\kappa 1}$ $J_{\kappa 2}$ $J_{\kappa 5}$ C_{κ}
	λ	$V_{\lambda 1}$ $V_{\lambda 2}$ $J_{\lambda 1}$ $J_{\lambda 2}$ $J_{\lambda 4}$ $C_{\lambda 1}$ $C_{\lambda 4}$
cadenas pesadas		V_{H1} V_{H2} V_H D_{H1} D_{H20} J_{H1} J_{H4} C_{μ} C_{δ} $C_{\gamma 3}$ $C_{\gamma 1}$ $C_{\gamma 2}$ C_{ϵ} C_{α}

11

FIGURA # 4: Distribución de los genes codificantes para las inmunoglobulinas en el ADN germinal.

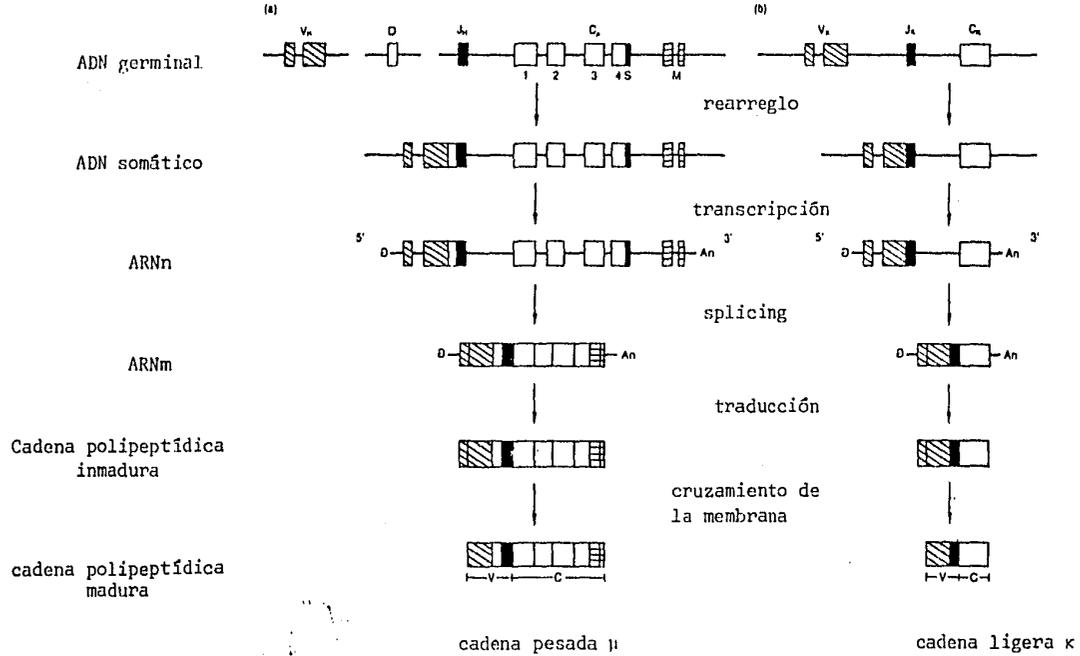


FIGURA # 5: Arreglo y expresión de los genes codificantes para las inmunoglobulinas en los linfocitos B.

propuesto y demostrado un mecanismo denominado de hipermutaciones somáticas- que se lleva a cabo en los genes codificantes para las partes variables, ocasionando así, una diversidad de anticuerpos aún mayor (29).

Esta gran diversidad se ve reflejada en el suero obtenido de un animal- inmunizado contra un antígeno dado, que es de tipo policlonal. La mayoría - de los antígenos contienen un gran número de determinantes antigénicos, los- cuales provocan la aparición de anticuerpos producidos por clonas celulares- diferentes (33). Cada uno de estos anticuerpos será por lo tanto, monoclo - nal, y los anticuerpos presentes en el suero son, la suma de todos los anti- cuerpos monoclonales dirigidos contra cada epítipo, lo que ocasiona la hete- rogeneidad del suero. Esta heterogeneidad suele provocar diversos problemas en algunos ensayos inmunológicos, y en algunos casos es indeseable.

Además de esta heterogeneidad hay que enfrentar ciertos problemas para la obtención de un suero hacia un antígeno dado. Debido a que la respuesta- inmune es impredecible, los anticuerpos producidos por 2 animales, aunque - sean genéticamente idénticos, son generalmente diferentes; además, no hay 2- sangrados de un mismo animal que tengan los mismos anticuerpos (34); por o - tro lado, estos anticuerpos se obtienen siempre en cantidades limitadas. - También es necesario obtener antígenos puros para inmunizar, ya que pequeñas cantidades de contaminantes provocará la aparición de anticuerpos que pudie- ran interferir en los ensayos (33). La solución es, entonces, tratar de ob- tener por separado cada anticuerpo monoclonal específico para cada determi - nante antigénico, lo cual puede ser posible debido a los estudios realizados sobre el mieloma múltiple.

2.2 PRINCIPIO DEL METODO DE OBTENCION DE ANTICUERPOS MONOCLONALES

Un mieloma es un tumor de las células productoras de anticuerpo. En es ta enfermedad, las células sufren una transformación que las lleva a reprodu - cirse de una manera rápida e incontrolable y a producir grandes cantidades - de anticuerpo de especificidad desconocida (34). Los mielomas pueden apare- cer espontáneamente en el hombre o en los animales, o bien en estos últimos- pueden provocarse por medio de virus o de inyecciones repetidas de aceite mi- neral (35); el mieloma obtenido puede transferirse a otros animales de la - misma cepa o a un medio de cultivo donde crece y produce la inmunoglobulina. Como cada mieloma es el resultado de la proliferación de una sola clona de - células, la inmunoglobulina producida es de tipo monoclonal.

En un principio, se pensó que los mielomas pudieran servir como fuente-

de anticuerpos monoclonales contra un antígeno dado. Diversos investigadores trataron de lograrlo mediante la inducción de mielomas en animales previamente sensibilizados al antígeno de interés (36), pero los resultados obtenidos no fueron satisfactorios debido a la enorme cantidad de células B y a la baja probabilidad de poder transformar a la célula adecuada. También se trató de obtener anticuerpos homogéneos transformando células B con virus SV40 o EB pero los resultados fueron también poco alentadores (36). Sin embargo, los estudios realizados en 1973 por Sinkovics et al. y por Swaber y Cohen parecían mostrar que la fusión de células de linfoma de ratón con células de sangre periférica humana llevaba a la obtención de híbridos productores de inmunoglobulinas murinas y humanas (34). Sin embargo, no fué sino hasta 1975 en que George Kohler y César Milstein pudieron demostrar esto, llevando al descubrimiento de lo que se conoce en la actualidad como la técnica del hibridoma.

Estos 2 investigadores realizaban estudios sobre la genética de la producción de anticuerpos (37). Fusionando 2 líneas de mieloma productoras de inmunoglobulinas diferentes mediante virus Sendai y creciendo los híbridos en el medio selectivo HAT descrito por Littlefield, les fué posible obtener células que producían los anticuerpos de las células padres, así como inmunoglobulinas que eran el resultado de diversas asociaciones entre las cadenas diferentes de las células padres. Posteriormente, fusionaron células de mieloma productoras de una inmunoglobulina con células de bazo de un ratón inmunizado contra eritrocitos de carnero y encontraron que algunos de los híbridos resultantes, a los que llamaron hibridomas, eran capaces de producir in vitro e in vivo anticuerpos anti-eritrocitos de carnero. Demostraron que los híbridos obtenidos eran el resultado de la fusión entre una célula de mieloma con un linfocito productor del anticuerpo específico, por lo que el anticuerpo secretado por un hibridoma era de tipo monoclonal.

Este descubrimiento ha sido de gran importancia no solamente en el campo de la inmunología, sino en muchas otras ramas. A partir de esto, se vislumbró un gran futuro en la obtención de anticuerpos monoclonales hacia un sin fin de antígenos, y de hecho, a partir de entonces, se han obtenido anticuerpos monoclonales para una gran variedad de antígenos, siguiendo la técnica descrita por Kohler y Milstein, la cual se muestra en la figura # 6.

Para obtener anticuerpos monoclonales contra un antígeno deseado se necesita inmunizar con éste a un animal. Por lo tanto, es necesario un esquema de inmunización adecuado para obtener una buena respuesta inmune (38). Como se sabe, antígenos estructuralmente complejos como células, virus o proteínas de alto peso molecular son lo suficientemente antigénicas, por lo que

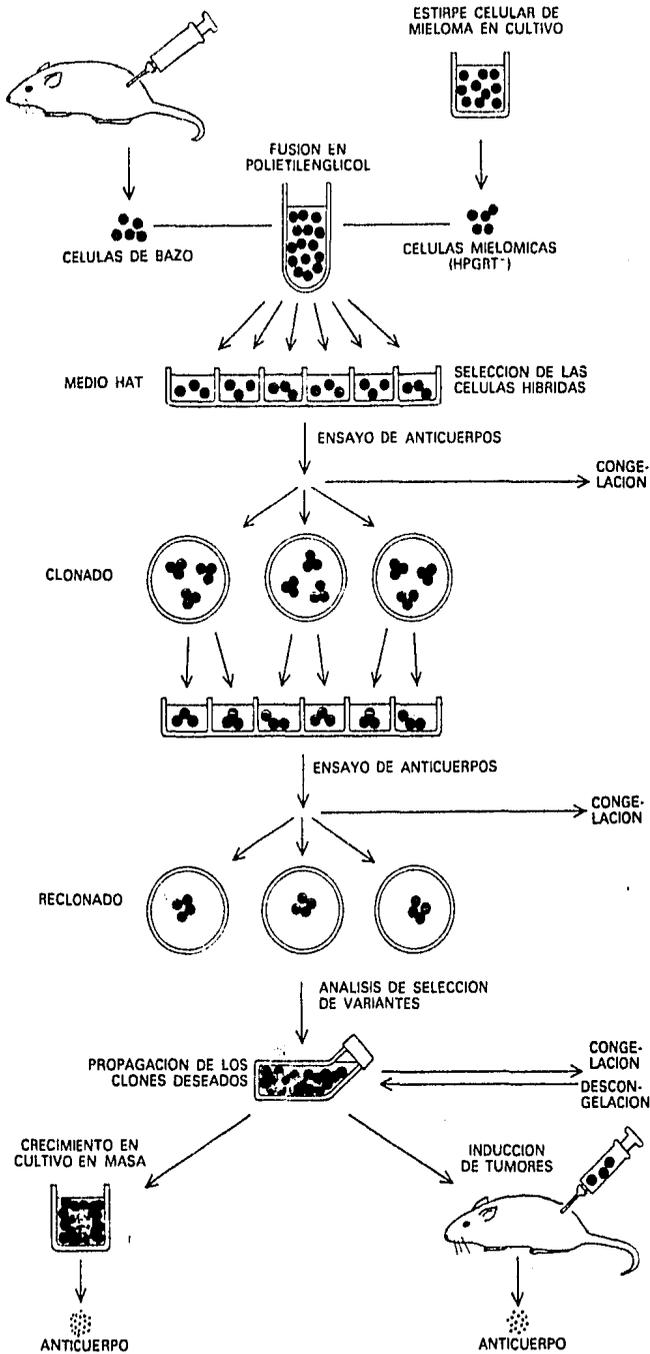


FIGURA # 6: Esquema convencional para la obtención de anticuerpos monoclonales.

se ha visto que después de dar 1 o 2 inmunizaciones al animal y un último re fuerzo aproximadamente 4 días antes de la fusión, es posible obtener una alta incidencia de híbridomas secretores del anticuerpo de interés (38). Sin embargo, cuando se trata de haptenos, la respuesta inmune es más difícil de obtener, y por lo tanto, la incidencia de híbridomas productores del anticuerpo es muy baja. Stahli et al. (39) han reportado un esquema de inmunización que ha aumentado notablemente la incidencia de híbridomas positivos. Esto lo han logrado utilizando antígenos solubles, dando 4-5 estímulos antigénicos con intervalos de 1 mes entre cada uno de ellos, dejando descansar al animal por algunos meses y dando refuerzos los 7 días anteriores a la fusión. Así, es posible obtener una alta incidencia de híbridomas positivos al antígeno de interés. Analizando la población celular, los autores han encontrado una subpoblación importante de células grandes identificadas como blastos 4 ó 5 días después del último estímulo antigénico; de alguna manera este estímulo provocado por el antígeno sobre las células previamente sensibilizadas, las lleva hasta el estadio de blastos, los cuales, por su capacidad de dividirse, se fusionan preferencialmente con las células de mieloma para dar lugar a híbridomas productores del anticuerpo específico.

Inicialmente, las células de mieloma usadas para la obtención de híbridomas productores de anticuerpos, secretaban diversas inmunoglobulinas, ya sea cadenas ligeras o inmunoglobulinas completas (34). El problema que se presentaba al usar estas líneas radicaba en la obtención de híbridos secretores de diversas inmunoglobulinas como resultado de las diferentes combinaciones de asociación entre el anticuerpo secretado por las células de bazo y la inmunoglobulina de las células de mieloma (37). Por lo tanto, la solución consistía en obtener una línea de mieloma que no produjera ningún tipo de inmunoglobulina, lo cual fué posible aislando las mutantes no productoras de inmunoglobulina. En la tabla # 1 se muestran algunas líneas de mieloma de ratón productoras y no productoras de anticuerpo.

Los primeros intentos de fusión celular se llevaron a cabo usando virus Sendai como agente fusionante, aunque la fusión entre 2 células puede ser espontánea, pero muy rara (40). Sin embargo, el manejo de virus en algunos laboratorios es difícil ya que se necesitan instalaciones especiales para poder mantenerlos. No obstante, se sabe que ciertas substancias como los polioles tienen propiedades fusogénicas. Dentro de éstos, el más importante es el polietilenglicol (PEG) (41), el cual es el agente fusionante de elección actualmente. El peso molecular del PEG usado influye bastante en la obtención de híbridos, ya que se ha visto que a menor peso molecular del mismo, su efectividad es disminuida y su toxicidad aumentada (40).

LINEA CELULAR	IMMUNOGLOBULINA PRODUCIDA
P3-X63Ag8	Y ₁ , κ
45.6TG1.7	Y _{2b} , κ
NSI/1-Ag4.1	κ (no secretada)
P3X63Ag8U ₁	κ (no secretada)
Sp2/O-Ag14	Ninguna
X63-Ag8.653	Ninguna

TABLA # 1: Algunas líneas de mieloma de ratón productoras y no productoras de inmunoglobulinas.

Una vez llevada a cabo la fusión celular se procede a sembrar las células en un medio de cultivo. Aproximadamente 1 de cada 10,000 células de bazo es capaz de formar un híbrido viable (42), por lo cual es necesario de un medio de cultivo selectivo que permita solamente el crecimiento de los híbridos resultantes y que elimine las células de mieloma no fusionadas que son incapaces de crecer en un medio de cultivo convencional y que enmascararían a los hibridomas. Las células de bazo no presentan problema alguno ya que son incapaces de crecer en un medio de cultivo a largo plazo (43). Este tipo de medio fué descrito por Littlefield en 1962 (44) y es conocido como medio HAT que contiene hipoxantina, aminopterina y timidina como agentes selectivos.

Las células de mieloma usadas tienen un defecto a nivel genético de las enzimas hipoxantina-guanosina-fosforribosil transferasa (HGPRT) o timidinaquinasa (TK), las cuales son necesarias para la síntesis de purinas y pirimidinas desde fuentes exógenas de hipoxantina o timidina, respectivamente (40). Cuando las células resultantes de la fusión son sembradas en el medio HAT, la aminopterina de éste, al ser un antagonista del ácido fólico, bloquea la enzima dehidrofolato reductasa, impidiendo así, la síntesis de purinas y pirimidinas (45), como se muestra en la figura # 7. Sin embargo, la hipoxantina y timidina del medio pueden utilizarse para la síntesis de estas bases requiriéndose para esto las enzimas HGPRT y TK. Como se mencionó, las células de mieloma carecen de estas enzimas, por lo que mueren en el medio selectivo. En los hibridomas, el defecto es compensado por las células de bazo que les confieren las enzimas activas, por lo que solo éstas son capaces de crecer en el medio selectivo, ya que además, reciben el fenotipo maligno y la habilidad de crecer en medio de cultivo que les confieren las células de mieloma (46).

Las células resultantes de la fusión se siembran en un gran número de pozos de cultivo. Una vez que se observa un buen crecimiento celular es necesario detectar aquellos pozos que contengan hibridomas secretores del anticuerpo de interés, utilizando para este fin técnicas que ofrezcan alta sensibilidad y la facilidad de manejar un número grande de muestras como el ensayo inmunoenzimático en fase sólida (ELISA), radioinmunoensayo (RIA) o radioinmunoensayo en fase sólida (SPRIA).

Una vez detectados los pozos que contengan hibridomas productores del anticuerpo de interés es necesario realizar una clonación para poder separar las células productoras de las no productoras, si es que las hay. Frecuentemente es necesario llevar a cabo varias clonaciones, ya sea por dilución limitante o en agar semisólido, ya que los hibridomas son inestables cromosómicamente (38) y pueden perder la información genética para la producción

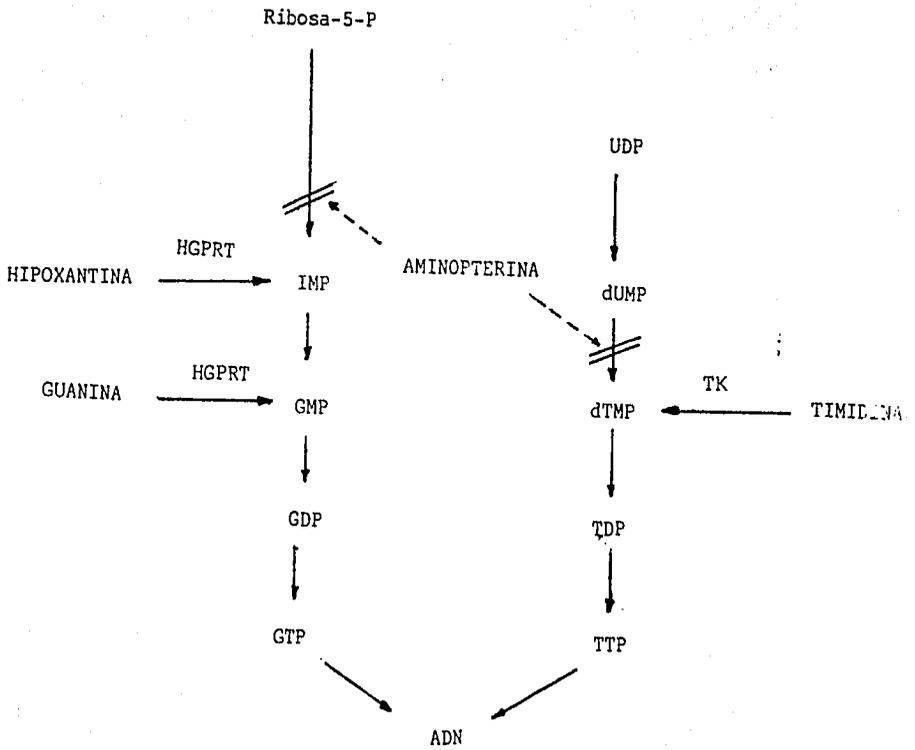


FIGURA # 7: Esquema de las vías de biosíntesis de los precursores del ADN y modo de acción del medio selectivo HAT.

del anticuerpo, mientras que otras dejan de producirlo; por ello, al realizar las clonaciones se puede saber si la clona obtenida es estable para la producción del anticuerpo (36). Las clonas de hibridomas productores se crecen en medio de cultivo donde producen 1-150 µg de anticuerpo por ml. Si se inyectan en el peritoneo de ratones histocompatibles al hibridoma se obtiene líquido ascítico que contiene 10-20 mg del anticuerpo por ml. (36). Las células se pueden congelar en N₂ líquido para así constituir una fuente inagotable del anticuerpo monoclonal.

2.3 PROPIEDADES Y APLICACIONES DE LOS ANTICUERPOS MONOCLONALES

Aún cuando los anticuerpos monoclonales son un arma poderosa tanto en el campo de la inmunología, como en otras ramas, no quedan exentos de ciertos inconvenientes. Algunos de estos anticuerpos son incapaces de llevar a cabo ciertas funciones inmunológicas como las reacciones de precipitación (34,46); esta función depende de la formación de mallas insolubles entre el antígeno y el anticuerpo y debido a que los anticuerpos monoclonales solo reconocen un determinante antigénico, la formación de estas mallas es imposible a menos que el antígeno contenga 3 o mas determinantes antigénicos iguales. No obstante, la solución a éste problema se lleva a cabo usando una mezcla de diferentes anticuerpos monoclonales contra diferentes epítomos de la molécula, creando así un reactivo policlonal bastante bien definido y reproducible (34,46). El uso de 2 anticuerpos monoclonales no solamente se lleva a cabo en este tipo de ensayos sino también en aquellos en los que se necesite una alta sensibilidad y especificidad para la cuantificación de un antígeno presente en pequeñas cantidades (47,48).

Otro tipo de interacciones antígeno-anticuerpo como la aglutinación, citotoxicidad y fijación del complemento que dependen de la clase de la inmunoglobulina, si pueden llevarlas a cabo los anticuerpos monoclonales, si es que son de la clase requerida. Cabe mencionar aquí, que de igual manera a lo anteriormente descrito, el uso de 2 anticuerpos monoclonales en este tipo de reacciones puede incrementar de manera considerable la eficiencia de la reacción (48).

Aun cuando los anticuerpos monoclonales solo reconocen un determinante antigénico, no son específicos ya que también son capaces de interactuar con otras sustancias parecidas estructuralmente al antígeno (36). Cuando este tipo de reacción cruzada es indeseable, la única manera de resolverlo parece ser la eliminación del uso del anticuerpo y en su lugar producir o

tros con mayor especificidad hacia el determinante antigénico de interés (34).

Uno de los principales enfoques que se ha intentado hacer de la técnica es hacia la obtención de anticuerpos monoclonales humanos para su futuro uso en inmunoterapia, pero se han encontrado ciertas restricciones hacia ello. - Se ha visto que los hibridomas obtenidos de la fusión entre células de mieloma y linfocitos de una misma especie son bastante estables, pero al tratar - de fusionar células de especies diferentes, por ejemplo (ratón x humano) o - (ratón x conejo), los hibridomas obtenidos son sumamente inestables y tien - den a perder cromosomas (46). Sin embargo, la excepción a esto son los hi - bridomas obtenidos entre células de ratón y rata, que se han visto son bas - tante estables e incluso se ha obtenido una mayor proporción de hibridomas - productores del anticuerpo de interés (46). Por lo tanto, la solución al - problema de los anticuerpos monoclonales humanos radica en la obtención y es - tabilización de una línea de mieloma humano (49) para que de esta manera, - los híbridos obtenidos sean tan estables como la célula de mieloma que le - dió origen. Paralelamente, se ha tratado de obtener y estabilizar una línea de células obtenidas de la fusión entre un mieloma de ratón y un mieloma hu - mano que en un futuro pudiera servir como mieloma al fusionar con linfocitos humanos (50).

Actualmente, la técnica del hibridoma es ampliamente usada para la obten - ción de anticuerpos monoclonales contra una gran diversidad de antígenos y - con diversos fines, dentro de los que se pueden citar:

a) Analíticos, en los cuales el principal enfoque de su utilización es - hacia la detección de los antígenos por diversas técnicas inmunológicas como el ELISA, RIA, inmunofluorescencia o aglutinación con fines diagnósticos o - de investigación básica. Con este objetivo, dentro de los antígenos hacia - los cuales ya se han producido anticuerpos monoclonales se encuentran bacte - rias, virus, hormonas, drogas, enzimas, proteínas, antígenos de histocompati - bilidad y antígenos característicos de subpoblaciones celulares (51).

b) Preparativos, en los cuales los anticuerpos monoclonales obtenidos - de animales sensibilizados con mezclas biológicas complejas como células, o - de mezclas conteniendo al antígeno de interés en una proporción muy baja - son usados para purificar el antígeno por medio de cromatografía de afinidad que permite la obtención del mismo con una pureza bastante alta (52). Por e - jemplo, los anticuerpos monoclonales obtenidos contra una mezcla que conte - nía interferón en baja proporción permitieron montar columnas de afinidad pa - ra obtenerlo con una pureza, una actividad específica y un rendimiento lo su - ficientemente alto para poder seguir estudiándolo de una manera mas concre - ta (46).

c) Terapéuticos, en los cuales los anticuerpos monoclonales se usan - principalmente para combatir enfermedades neoplásicas (33,53). De esta mane- ra se han producido anticuerpos monoclonales hacia diversas células tumora - les para su uso posterior en la destrucción de las mismas por lisis comple - mento-dependiente o por citotoxicidad ya sea in vivo o in vitro (54,55), o - para la detección de los tumores marcando los anticuerpos con radioactivi - dad.

II. OBJETIVOS

La utilización de anticuerpos en el área de la neuroendocrinología es de suma importancia, ya que mediante éstos ha sido posible estudiar a las diferentes hormonas descubiertas a la fecha. En nuestro caso en particular, la utilización de anticuerpos contra la LHRH es muy importante para poder seguir estudiándola tanto en su biosíntesis como en su regulación.

Con el fin de obtener herramientas perfectamente caracterizadas que permitan realizar estos estudios, se decidió producir anticuerpos monoclonales contra esta hormona. Los objetivos principales de este trabajo son la obtención de tales anticuerpos y su posterior caracterización con el fin de determinar el sitio antigénico de la molécula de LHRH reconocido por los anticuerpos.

La obtención de los anticuerpos monoclonales permitirá en un futuro estudiar el procesamiento del precursor de LHRH, que ya ha sido caracterizado. De igual manera, se aplicarán en estudios de inmunocitoquímica para conocer el sitio de biosíntesis de la hormona y permitirán detectarla por RIA en diversos extractos, así como en un cultivo de neuronas, donde se pretende estudiar los mecanismos de la regulación de la biosíntesis de la LHRH.

ENFOQUE EXPERIMENTAL

La obtención de anticuerpos monoclonales hacia la LHRH (y contra cualquier otro antígeno) requiere de un detallado y cuidadoso esquema de trabajo.

Para poder inmunizar a los animales con la hormona es necesario conjugarla a una proteína acarreadora para aumentar su inmunogenicidad. En vista de que la molécula no contiene grupos carboxi libres es necesario introducir

lo acoplándola con el ácido p-aminobenzoilacético, para lo que de esta manera, se conjugue posteriormente a la proteína acarreadora por el método de la carbodiimida.

Una vez obtenido el conjugado se inmunizan a los ratones de acuerdo a un esquema de inmunización que permita una respuesta inmune lo mejor posible. Paralelamente, se deben de montar las técnicas de ELISA para la detección de anticuerpos anti-LHRH y una prueba de inhibición para comprobar la especificidad de los anticuerpos. Para estos ensayos es necesaria la obtención de un anticuerpo de conejo anti-ratón conjugado a la enzima peroxidasa para que sirva como revelador en el ensayo.

Es necesario, también, optimizar la técnica de clonación en agar semi-sólido que permitirá posteriormente obtener clonas de hibridomas.

Una vez optimizadas todas las técnicas y habiendo obtenido una buena respuesta por parte de los animales se procederá a realizar la fusión entre células de bazo de estos animales y células de mieloma para la obtención de los hibridomas productores del anticuerpo monoclonal deseado, los cuales se someterán a 2 clonaciones con el fin de separar las clonas productoras de las no productoras. Una vez obtenidas las clonas se procederá a la producción de los anticuerpos in vitro e in vivo, por inoculación en ratones. Del líquido ascítico obtenido de estos últimos se purificarán los anticuerpos por cromatografía de intercambio iónico.

Los anticuerpos monoclonales obtenidos se caracterizarán por ensayos de competencia usando como competidores péptidos que son partes de la molécula original de LHRH con el fin de poder determinar el sitio de la molécula reconocido por los anticuerpos.

III. MATERIAL Y METODOS

1. TECNICAS INMUNOQUIMICAS

1.1 CROMATOGRAFIA EN CAPA FINA

Se realiza sobre placas de sílica gel 60F₂₅₄ de Merck de 0.25 mm de grosor, dejando correr los solventes adecuados en forma ascendente, en una cámara de cromatografía previamente saturada a temperatura ambiente.

Solventes:

Metanol-Cloroformo-Amoniaco (60:45:5). Usar para LHRH, LHRH-OH y 1-3 LHRH.

Acetato de etilo-Butanol-Acido acético-Agua (2:1:1:1). Usar para 7-10 LHRH, 4-6 LHRH y 4-10 LHRH.

1.1.1 Revelado de péptidos

a) Método de Pauly: Mezclar en partes iguales una solución de ácido sulfanílico al 1% en HCl 1N y una de NaNO₂ al 5% preparado recientemente, y

dejar 5 min a 4°C. Cubrir la cromatoplaça con esta solución, dejar secar y cubrir con una solución al 15% de Na₂CO₃. Los péptidos que contengan los aminoácidos histidina y tirosina mostrarán un color anaranjado.

b) Método de Ninhidrina:

Reactivo de ninhidrina

Ninhidrina	0.5 g
Acido acético	5 ml
Butanol	cbp 100 ml

Rociar la cromatoplaça con esta solución y colocarla a 110°C por 10 min. Los péptidos que contengan aminas primarias no bloqueadas presentan un color violeta.

1.2 ACOPLAMIENTO DE LA LHRH A PROTEINAS
ACARREADORAS

10 μ moles de ácido p-aminofenilacético en 25 μ l de HCl 2N se diazotiza con 10 μ moles de NaNO₂ en 25 μ l de agua a 4°C. Después de 8 min se agregan 150 μ l de una solución de NaHCO₃ 0.5M pH 8.5 e inmediatamente se hace reaccionar con 11.8 mg (9.97 μ M) de LHRH disueltos en 100 μ l de una solución compuesta por 40% de NaHCO₃ 0.5M pH 8.5 y 60% de dimetilformamida, a la cual se le había agregado 30,000 cpm de LHRH-I¹²⁵. Se deja a 4°C toda una noche.

La mezcla se acidifica a pH 2 con HCl 2N y se lava con 2 volúmenes de éter 5 veces, deshechando las fases etéreas. La fase acuosa se ajusta a pH 7 con NaHCO₃ 0.5M y se analiza por cromatografía en capa fina, revelando por la técnica de Pauly. Se lleva a sequedad la mezcla en secador tipo Savant, se disuelve en 50 μ l de dimetilformamida y se agregan 2.1 mg de dicitclohexil carbodiimida y 2.5 mg de N-hidroxisuccinimida. Se mezcla perfectamente, se deja a temperatura ambiente por 30 min y se centrifuga. El sobrenadante se divide en 3 partes de 15 μ l. A cada parte se agregan proteínas diferentes disueltas en 120 μ l de NaHCO₃ 0.1N: a una se agrega 10 mg de albúmina sérica bovina, a la otra 10 mg de tiroglobulina y a la tercera 5 mg de polilisina, dejando agitar una noche a 4°C. Se diluye cada parte con 1 ml de amortiguador de fosfatos 50 mM y NaCl 0.15M pH 8 contando la radioactividad presente en cada tubo. Se dializa contra el mismo amortiguador 2 veces, cam -

biando después por NaCl 0.15M y se deja 2 días más, contando la radioactividad al cabo de éstos. En base a los resultados se calcula la eficiencia de la reacción y se diluyen los conjugados a 2 mg/ml con solución salina. Se hacen alícuotas de 1 ml y se guardan a -20°C.

1.3 PREPARACION DE UN CONJUGADO DE IgG DE CONEJO anti-IgG DE RATON-PEROXIDASA (RAM-POD)

1.3.1 Esquema de inmunización

Se usaron 2 conejos adultos de la raza Nueva Zelanda. Se inoculó a cada conejo 500 µg de IgG de ratón purificada, emulsificada en 1 ml de adyuvante completo de Freund, por vía subcutánea en diversos sitios. 1 mes después se inocularon 250 µg de IgG en 1 ml del mismo adyuvante por vía subcutánea. Se dejaron descansar 3 meses, y posteriormente se inoculó la misma dosis por la misma vía. 1 mes después se repitió la inoculación. Posteriormente se sangraron los conejos semanalmente durante 1 mes y medio para la obtención del suero. Se verificó la presencia de anticuerpos por doble inmunodifusión.

1.3.2 Purificación de IgG de conejo anti-IgG de ratón

a) Precipitación: se ultracentrifuga el suero de conejo por 30 min a 50,000-100,000 g. La precipitación se realiza a 4°C agregando a 12 ml del suero, 6 ml de una solución saturada a 4°C de sulfato de amonio. Se deja en agitación durante una noche a la misma temperatura, se centrifuga a 3,500 g por 30 min y se realizan 2 precipitaciones más, disolviendo el precipitado en 10 ml de PBS pH 7.8 y agregando 5 ml del sulfato lentamente. Al término de las precipitaciones se disuelve el precipitado en 5 ml de un amortiguador de Tris 20 mM y NaCl 20 mM a pH 7.8 y se dializa 2 veces contra el mismo amortiguador.

b) Purificación: se lleva a cabo por cromatografía de intercambio iónico. 10 g de DEAE-Celulosa Whatman DE 32 se suspenden en 200 ml de HCl 1M, se deja 5 min, se filtra y se lava 3 veces con agua destilada. Se lava 3 veces con un amortiguador de Tris 20 mM a pH 7.8, se monta en una columna de 1.2 x 20 cm y se deja equilibrando en el mismo amortiguador a 4°C. Se aplican las inmunoglobulinas de conejo en la columna y se eluye con el mismo amortiguador a un flujo de 20 ml/hr. Se lee la densidad óptica a 280 nm, reuniendo las fracciones del pico, correspondientes a la IgG.

1.3.3 Eliminación de anticuerpos inespecíficos contra proteínas de caballo

Se realiza por cromatografía de afinidad. Se suspenden 1.5 g de amino-hexil-sepharosa en 100 ml de NaCl 0.5M, se lava sobre filtro Buchner con 400 ml de NaCl 0.5M y posteriormente con 200 ml de NaHCO₃ 0.1M pH 8.6. Se transfiere a un tubo y se mezcla con 50 ml de glutaraldehído al 2.5% en el amortiguador de bicarbonato; se deja 30 min a temperatura ambiente. Se lava sobre filtro Duchmer con 200 ml de agua y posteriormente con 500 ml de la solución de bicarbonato. Paralelamente, se inactiva suero de caballo a 56°C por 30 min, se agregan 10⁻⁵ M de PMSF y se dializa 3 veces contra NaHCO₃ 0.1M pH 8. Se agrega a la resina activada 20 ml del suero de caballo ajustada la concentración de 10 mg de proteínas/ml y se deja mezclando por 2 h a temperatura ambiente. Se centrifuga a 166 g por 5 min, se lava una vez con 100 ml de NaHCO₃ y se incuba una noche a 4°C con 20 ml de etanolamina 0.2M pH 8. Se lava sobre Buchner con un amortiguador de Tris 0.2M + NaCl 0.15M a pH 8 y se monta en una columna de 0.8 x 20 cm. Se guarda a 4°C en presencia de azida de sodio al 0.01%. Se aplican 10 mg de la IgG de conejo purificada en la columna, ajustando previamente la molaridad de NaCl a 0.15M. Se eluye con PBS pH 7.8 a un flujo de 20 ml/h, colectando fracciones de 3 ml. Se lee la densidad óptica de cada una a 280 nm y se juntan las fracciones que presenten la máxima absorbancia.

Posteriormente, se procede a precipitar la IgG a 4°C con la mitad del volumen de una solución saturada a la misma temperatura de sulfato de amonio por una hora. Se centrifuga a 3,500 g por 30 min y se disuelve el precipitado con PBS pH 7.8 a una concentración final de 10 mg/ml. Se dializa contra 500 ml del mismo amortiguador. 6 horas después se dializa 2 veces contra un amortiguador de carbonato 10 mM pH 9.5 + NaCl 0.15M.

1.3.4 Preparación del conjugado RAM-POD

Se disuelven 5 mg de peroxidasa en 1 ml de amortiguador de carbonatos - 0.3M pH 8.1 fresco y se añaden 100 µl de una solución al 1% de dinitrofluorobenceno en etanol absoluto. Se deja agitando suavemente durante una hora en oscuridad. Se añade 1 ml de m-NaIO₄ 0.08M, se mezcla suavemente por 30 min y se agrega 1 ml de etilenglicol 0.16M, dejando una hora con agitación suave en oscuridad. Se dializa contra 1 l de amortiguador de carbonato 0.01M pH - 9.5 por 3 veces. Se añade 7.5 mg del anticuerpo purificado y se deja en a -

gitación suave por 3 h. Se dializa contra PBS pH 7.5 y se diluye a 200 µg/ml en PBS pH 7.8 y BSA al 1%. Se guarda en oscuridad a -20°C.

1.4 OBTENCION DE OVOALBUMINA

Se recogen las claras de 10 huevos, se mide el volumen y se agrega el mismo de una solución de sulfato de sodio saturada a 32°C. Se deja agitando por 2 h, se elimina el precipitado por centrifugación y se agrega una solución de H_2SO_4 0.2N gota a gota hasta pH de 4.6-4.8. Posteriormente, se agrega sulfato de sodio en polvo lentamente y con agitación hasta la aparición de una opalescencia permanente y se deja una noche a temperatura ambiente. Se centrifuga a 830 g y el precipitado se disuelve en un volumen de agua igual al volumen original de las claras y se llevan a cabo 3 recristalizaciones con sulfato de sodio, requiriéndose aproximadamente de 140 a 180 g de la sal por litro de solución. Se dializa contra agua destilada y se liofiliza. Se corre una electroforesis en gel desnaturalizante para comprobar la pureza de la ovoalbúmina obtenida.

1.5 ELISA PARA CUANTIFICAR ANTICUERPOS anti-LHRH

Soluciones

PBS pH 7.8: NaH_2PO_4 0.02M y NaCl 0.15M. Ajustar el pH a 7.8

Solución de lavado: PBS pH 7.8 + 0.05% de Tween 20.

Solución para diluir: PBS pH 7.8 + 10% de suero de caballo + 1% de BSA + 0.05% de Tween 20.

Solución de saturación: PBS pH 7.8 + 1% de ovoalbúmina.

Sustrato: Ortofenilendiamina 0.4 mg/ml + hidroperóxido de urea 0.2 mg/ml, disueltos en amortiguador de fosfatos 0.1M pH 5.

Fase sólida; placas de poliestireno de 96 pozos.

1.5.1 Detección y cuantificación de anticuerpos anti-LHRH

Se colocan 100 μ l de una solución de 3 μ g/ml del conjugado de polilisina-LHRH en PBS 7.8 en cada pozo y se deja a 4°C durante una noche, después - de la cual, se retira y se colocan 150 μ l de la solución de saturación y se deja a temperatura ambiente por 4 h. Se lava 5 veces con la solución para - este uso y se colocan 100 μ l de la muestra con el anticuerpo disuelta en la solución adecuada y se deja una noche a 4°C. Se lava 5 veces y se colocan - 100 μ l de una dilución 1:1,000 de un anticuerpo de cabra o de conejo anti- - IgG de ratón conjugado a peroxidasa y se deja incubando 4 h a temperatura am- biente en oscuridad. Se lava 5 veces, se añaden 100 μ l del sustrato, se de- ja 10 min a temperatura ambiente y en oscuridad, y al término, se añaden - 100 μ l de HCl 6N. Se lee la densidad óptica a 490 nm en un espectrofotómetro para microELISA.

1.5.2 Ensayo de especificidad

Se hacen diluciones de LHRH en la solución para diluir de concentracio- nes de 800, 300, 80, 30, 8, 3 y 0.8 ng LHRH/ml y paralelamente una dilución- 1:500 del anticuerpo en el mismo amortiguador. Se mezclan volúmenes iguales del antígeno y del anticuerpo y se incuba a 4°C por 4 h. Después de este - tiempo se colocan 100 μ l en un pozo previamente cubierto con el conjugado de polilisina-LHRH y saturado con ovoalbúmina. Se incuba por una noche a 4°C y se sigue el mismo protocolo para el ELISA.

1.5.3 Ensayo de competencia

Preparar concentraciones decrecientes de los péptidos a probar. Colo- car 50 μ l en cada pozo previamente cubierto con el conjugado de polilisina - LHRH y saturado con ovoalbúmina y posteriormente 50 μ l del anticuerpo a una- dilución tal que corresponda a una densidad óptica de 1. Realizar cada pun- to por triplicado. Incubar 1 noche a 4°C y seguir el mismo protocolo para - ELISA.

1.6 IODINACION DE LHRH

Columna de exclusión molecular:

Hidratar 4 g de Sephadex G25-40 en 150 ml de ácido acético 0.01M durante 1 noche a 4°C. Empacar una columna de 0.8 x 20 cm y equilibrar una noche a 4°C.

Iodinación:

Disolver 2.5 µg (2.1 nM) de LHRH en 25 µl de ácido acético 0.01M, agregar 25 µl de un amortiguador de fosfatos 0.5M pH 7.5 y adicionar 1 mCi de NaI^{125} (actividad específica = 2.2 Ci/µM). Iniciar la reacción con 10 µl de una solución de 2 mg/ml de cloramina T en el mismo amortiguador y 20 seg después detener la reacción con 20 µl de una solución de 2 mg/ml de metabisulfito de sodio en el mismo amortiguador. Aplicar a la columna, eluir con ácido acético 0.01N a un flujo de 3 gotas/min y coleccionar fracciones de 17 gotas. Contar alícuotas de 5 µl de cada fracción para detectar los picos correspondientes a la molécula de LHRH marcada radioactivamente.

1.7 RIA PARA ANTICUERPOS anti-LHRH

1.7.1 Titulación de los anticuerpos

Solución amortiguadora usada: PBS pH 7.8 + BSA 0.5%

- a) Agregar a cada tubo 100 µl de LHRH- I^{125} (20,000 cpm, actividad específica = 2.2 Ci/µM) y 0.1 µl de suero normal de ratón
- b) Agregar 100 µl de las diluciones de los anticuerpos: 1:10, 1:32, 1:100, 1:320, 1:320,000.
- c) Incubar 24 h a 4°C.
- d) Agregar 50 µl de suero de conejo anti-IgG de ratón diluido 1:1, previamente titulado.
- e) Incubar una noche a 4°C.
- f) Agregar 2 ml de amortiguador y centrifugar 30 min a 830 g.
- g) Contar la radioactividad presente en el precipitado.
- h) Determinar la dilución que precipite un 50% de la hormona con respecto al máximo obtenido en la misma curva.

1.7.2 Ensayo de competencia

Agregar a cada tubo:

- a) 50 μ l de LHRH o del péptido análogo a la molaridad adecuada.
- b) 50 μ l de LHRH- I^{125} (20,000 cpm, actividad específica = 2.2 Ci/ μ M), y 0.1 μ l de suero normal de ratón.
- c) 100 μ l del anticuerpo a la dilución adecuada.
- d) Incubar 24 h a 4°C.
- e) 50 μ l de suero de conejo anti-IgG de ratón 1:1, previamente titulado.
- f) Incubar 1 noche a 4°C.
- g) Agregar 2 ml del amortiguador y centrifugar a 830 g por 30 min.
- h) Contar la radioactividad presente en el precipitado.

1.8 DETERMINACION DE CLASE DE INMUNOGLOBULINAS POR LA TECNICA DE OUCHTERLONY

1.8.1 Preparación de placas

Disolver 0.2 g de agar purificado de Merck en 50 ml de agua destilada y calentar a 100°C. Dejar enfriar a 60°aproximadamente y agregar 75 μ l de glicerol. Cubrir con una fina capa de esta solución los portaobjetos a usar.

Disolver 1 g de NaCl, 1 g de agar y 3 g de polietilenglicol en 98 ml de agua y calentar a 100°C. Dejar enfriar a 45-50°C, agregar azida de sodio al 0.1% final y colocar 5 ml cuidadosamente sobre cada portaobjeto. Dejar solidificar y guardarlos en una caja en atmósfera húmeda a 4°C. Se conservan - hasta 6 meses en estas condiciones.

1.8.2 Determinación de clase

Sueros anticlase: anti-IgG, anti-IgG₁, anti-IgG_{2a}, anti-IgG_{2b}, anti - IgM, anti-IgA y anti-IgG₂ (Laboratorios Meloy, Estados Unidos).

Diluirlos en un volumen equivalente de suero de caballo-fetal bovino - (75:25). Dejar a temperatura ambiente por 3 h, centrifugar 15 min a 830 g y guardar el sobrenadante. Para llevar a cabo la inmunodifusión, usar medio - de cultivo con anticuerpos concentrado. Esto se realiza liofilizando 1 ml de la muestra y resuspendiendo en 140 μ l de agua destilada. Se colocan 10 - μ l de cada muestra en los pozos de las placas de inmunodifusión contra 10 μ l de cada suero anticlase.

1.8.3 Tinción de las placas

Solución para teñir:

Amido black	1 g
Acido acético 1M	425 ml
Acetato de sodio 0.1M	425 ml
Glicerol	150 ml

Sumergir las placas de inmunodifusión en PBS 7.8 por 3-4 días (1 día/ - 1 mm de grosor). Colocar papel filtro sobre cada placa y dejar secarlas sobre el portaobjeto por 1 día a temperatura ambiente, quedando adherido el agar deshidratado como una fina película sobre el portaobjetos. Enjuagar con agua y teñir por 2 h. Desteñir con ácido acético al 2%.

1.9 PURIFICACION DE ANTICUERPOS MONOCLONALES DE RATON A PARTIR DE LIQUIDO ASCITICO

Soluciones:

- A: Tris 20 mM + NaCl 40 mM a pH 7.8
- B: Tris 20 mM + NaCl 20 mM a pH 7.8
- C: Tris 20 mM + NaCl 400 mM a pH 7.8
- D: Tris 20 mM a pH 7.8

Sulfato de amonio saturado a 4°C

DEAE-Celulosa DE 52 microgranular, preswollen, Whatman. Suspenden en B retirando las partículas finas varias veces. Conservar a temperatura ambiente en suspensión al 25% aproximadamente, adicionando con azida de sodio al 0.1%.

1.9.1 Precipitación del anticuerpo

a) Diluir el líquido de ascitis 1:4 con PBS 7.8 y centrifugar 30 min a 50,000-100,000 g.

b) Agregar un volumen equivalente de la solución de sulfato de amonio lentamente y con agitación. Dejar a 4°C durante una hora.

c) Centrifugar a 12,500 g por 15 min.

d) Redissolver el precipitado en un pequeño volumen de la solución A. - Transferir a una bolsa de diálisis.

e) Dializar contra 100 volúmenes de la solución B en una probeta, sin-agitación. Cambiar la solución 3-4 h después y dializar 8 h más como mínimo.

f) Centrifugar a 15,000 g durante 15 min. Recuperar el sobrenadante - y medir la densidad óptica a 280 nm. Después de la precipitación se recuperan aproximadamente de 8 a 12 mg de proteína/ml de ascitis.

1.9.2 Purificación por cromatografía de intercambio iónico

a) Montar la columna con 1 ml de resina por cada 5 mg de proteína bajo una presión de 40 cm. Equilibrar con la solución B.

b) Diluir la muestra con un volumen igual de la solución B y aplicar sobre la columna. Colectar fracciones de 15 min.

c) Lavar con 2 volúmenes de solución B.

d) Eluir con un gradiente de solución B-C. Usar 5-10 volúmenes de columna para eluir a un flujo de 1-2 volúmenes de columna por hora, en 10 h.

e) Medir la densidad óptica de las fracciones. Juntar las fracciones del pico. La mayor parte de los anticuerpos monoclonales eluyen entre 40 y 80 mM de NaCl, y otros entre 120-150 mM.

1.10 ELECTROFORESIS EN GEL DE ACRILAMIDA

Soluciones:

A: Disolver 30 g de acrilamida y 0.8 g de metilen-bisacrilamida en agua a un volumen final de 100 ml.

B: Disolver 18.15 g de Tris en 24 ml de HCl 1N y 230 µl de Temed; - ajustar a pH 8.9 y aforar a 100 ml.

C: Disolver 14 mg de persulfato de amonio en 10 ml de agua.

D: Disolver 3 g de Tris y 14.4 g de glicina en un volumen final de 500 ml de agua destilada y ajustar el pH a 8.3.

Solución de muestra: 2 ml de solución B, 6 ml de glicerol al 10% y 20 µl de azul de bromofenol al 1%.

Solución de corrida: diluir 1:10 la solución D al volumen que sea necesario.

Solución para tefir: azul de Coomassie G250 al 0.04% (p/v) en HClO₄ al 3.5%. Agitar 1 h a temperatura ambiente y filtrar. Se conserva indefinidamente.

Preparación del gel: mezclar 3 ml de la solución A y 3 ml de la solución B; desgasificar con vacío y agregar 6 ml de la solución C recientemente preparada. El gel queda a una concentración final de 7.5% de acrilamida y - 0.2 % de bisacrilamida. El gel se prepara en una cámara de electroforesis - de 0.75 mm de grosor, vertical y constituida por 2 placas de vidrio de 12 x - 15 cm. Después de vaciar la solución de acrilamida, colocar el peine y de - jar polimerizar. Diluir la muestra de líquido ascítico 1:4 en la solución - de muestra y aplicar al gel. Correr a un voltaje constante de 200 V hasta - que el colorante alcance la parte inferior. Una vez finalizada la electrofo - resis teñir el gel por 3 h y posteriormente desteñir con una solución de áci - do acético al 10%.

1.11 ELECTROFOCALIZACION ANALITICA EN CAPA FINA DE GEL DE ACRILAMIDA

Soluciones:

A: 10 g de acrilamida y 0.27 g de bisacrilamida. Aforar a 30 ml con - una solución de urea 3.5M.

B: 1 mg de riboflavina en 10 ml de una solución de urea 3.5M.

Preparación del gel: mezclar 10 ml de la solución A, 50 ml de una so - lución de urea 3.5M y 3 ml de anfolinas 3-10 (Bio-Lyte 3-10, Bio-Rad). Des - gasificar con vacío por 30 min. Agregar 1 ml de la solución B y 10 μ l de - Temed. Colocar en el molde para el gel (25 x 11 x 0.2 cm) y dejar polimeri - zar a la luz directa por 3 h. Una vez polimerizado, dejar a 4°C por 2 h.

Colocar en los carriles 30 μ g de proteínas de la muestra. Usar como - soluciones de electroforesis H_3PO_4 1N en el ánodo y NaOH 1N en el cátodo. Correr por 4 h, fijando como valores máximos 1,100 V, 50 mA y 25W. Una vez - finalizada la electrofocalización, colocar el gel por 2 h en 500 ml de - $HClO_4$ al 3.5%. Teñir posteriormente con azul de Coomassie G250 por 2 h; des - teñir con ácido acético al 10%.

2. ESQUEMA DE INMUNIZACION

Se usaron ratones de ambos sexos de las cepas Balb/c, Balb/k y Q57B1/6- de 8 semanas de edad, criados en el Bioterio del Instituto de Investigaciones Biomédicas.

Los ratones se inocularon de acuerdo al siguiente esquema de inmunización:

INMUNIZACION	µg DE CONJUGADO	ADYUVANTE EMPLEADO	VIA
<u>1</u>	200	Completo de Freund	Subcutánea
<u>2</u>	100	Incompleto de Freund	Subcutánea
<u>3</u>	100	Incompleto de Freund	Subcutánea e Intraperitoneal
<u>4</u>	100	Incompleto de Freund	Subcutánea e Intraperitoneal
<u>5</u> (día -7)	1	-	Intraperitoneal
<u>6</u> (día -4)	200	-	Intraperitoneal
<u>7</u> (día -3)	200	-	Intraperitoneal e Intravenosa

En las primeras 4 inmunizaciones hubo un intervalo de 3 semanas entre cada una de ellas, inoculando el antígeno emulsificado en un volumen equivalente del adyuvante. Entre la inmunización 4 y 5 hubo un periodo de descanso de un mes y medio. Las últimas 3 inoculaciones se hicieron en solución salina isotónica.

3. CULTIVO DE CELULAS

3.1 RECOMENDACIONES

Para el cultivo de células es necesario recordar que hay que tener un máximo de cuidados al trabajar así como de la limpieza del material usado y de las soluciones, por lo que:

a) Todo el material utilizado debe estar perfectamente limpio, enjuagado con agua bidestilada y estéril.

b) Todo método que involucre el manejo de las células debe de llevarse a cabo en un cuarto destinado para cultivo de células y las manipulaciones - deben de efectuarse en una campana de flujo laminar.

c) El material destinado para cultivo de células debe de utilizarse únicamente para este fin.

d) Usar reactivos de máxima pureza y cuando sea posible, reactivos de grado cultivo de células.

3.2 SOLUCIONES

Aminoácidos no esenciales (100x)

L-alanina	89 mg
L-asparagina	150 mg
L-ac. aspártico	133 mg
L-ac. glutámico	147 mg
Glicina	75 mg
L-prolina	115 mg
L-serina	105 mg

Disolver en 100 ml de agua tridestilada, filtrar en filtro Millipore - de 0.22 μm y conservar a 4°C.

Piruvato de sodio (100x);

Disolver 1.1 g en 100 ml de agua tridestilada. Esterilizar por filtración y guardar a -20°C.

Estreptomina (100x)

Disolver 1 g en 100 ml de agua tridestilada, esterilizar por filtración y guardar en alícuotas a -20°C.

Hipoxantina-Timidina (100x)

Disolver 136.1 mg de hipoxantina y 37.8 mg de timidina en 100 ml de agua tridestilada. Calentar una hora a 45-50°C con agitación. Esterilizar por filtración y guardar en alícuotas a -20°C. Si al momento de usar se observa un precipitado blanco, calentar a 45°C hasta la completa disolución del mismo.

Aminopterina (100x)

Disolver 8.8 mg en 45 ml de agua tridestilada. Agregar 0.5 ml de NaOH 1N, disolver y ajustar a 50 ml. Agregar 0.5 ml de HCl 1N, esterilizar por filtración y guardar en alícuotas a -20°C.

Polietilenglicol al 50%

Esterilizar 4 g de PEG a 120°C y 15 lbs de presión por 20 min. Dejar enfriar a 60°C y agregar un volumen igual de RPMI sin suero. Mezclar perfectamente y guardar a 4°C. Al momento de usar ajustar el pH a 7.8-8 con NaOH-0.1N estéril.

3.3 SUEROS

Se usó suero fetal bovino, lote SFT-85-005 de la compañía Biocel, México y suero de caballo obtenido directamente del Instituto Nacional de Higiene, S.S.A. Ambos sueros se centrifugaron a 1,000 g durante 30 min y posteriormente se esterilizaron bajo presión de N_2 sobre doble membrana Millipore de 0.22 μ m. Se guardaron a -20°C. Al momento de usar se inactivan a 56°C durante 30 min.

3.4 MEDIO DE CULTIVO

El medio de cultivo utilizado en este trabajo fué el DMEM (Dulbecco's-Modified Eagle's Medium), el cual se prepara de acuerdo a las instrucciones del distribuidor, disolviendo en agua recientemente tridestilada, ajustando

la concentración de glucosa a 4.5 g/l y de NaHCO_3 a 3.7 g/l y ajustando el pH a 7 con CO_2 . Se esteriliza en doble filtro Millipore de 0.22 μm bajo presión positiva de N_2 y se guardan en alícuotas de 100 y 500 ml a 4°C en oscuridad, conservándose en estas condiciones por 2 meses aproximadamente. Al momento de usarlo se suplementa de acuerdo a las necesidades. La preparación de diferentes medios se muestra en la tabla siguiente:

SUPLEMENTOS	MEDIO HAT o HT		MEDIO COMPLETO	
	500 ml		500 ml	
	%	ml	%	ml
Aminoácidos no esenciales	1	5	1	5
Piruvato de sodio	1	5	1	5
Suero fetal bovino	2.5	12.5	2.5	12.5
Suero de caballo	12.5	62.5	12.5	62.5
Hipoxantina-Timidina (HT)	1	5	-	-
Aminopterinina (A)	1	5	-	-
Medio DMEM		400		400

3.5 CONGELACION DE CELULAS

Las células de 5 ml de medio con crecimiento óptimo se centrifugan y resuspenden en 1 ml de medio DMEM completo añadido con 5% de suero fetal bovino y 10% de DMSO a 4°C. Se colocan en un criotubo en una caja de polietileno con paredes de 1 cm de grosor, la cual se guarda a -80°C por 24 h y posteriormente, los criotubos se transfieren a un tanque de N_2 líquido. Las células se mantienen en estas condiciones por tiempo indefinido.

3.6 DESCONGELACION

Se retira el criotubo del N_2 líquido y se descongela rápidamente en un

baño a 37°C. El medio con células se transfiere a un tubo con 10 ml de medio completo o HT, dependiendo de las células. Se centrifuga, se lava con 5 ml del mismo medio 2 veces y se resuspenden en 5 ml del mismo, se colocan en una botella Roux y se incuban a 37°C con 6% de CO₂ y atmósfera húmeda.

3.7 CRECIMIENTO

Las células de mieloma e hibridomas deben de mantenerse a una densidad de $10^5 - 4 \times 10^5$ células por mililitro, lo cual se logra diluyéndolas diariamente 1:5 con el medio de cultivo adecuado.

3.8 MEDICION DE LA VELOCIDAD DE CRECIMIENTO POR INCORPORACION DE TIMIDINA-H³

Centrifugar las células de mieloma y lavar una vez con medio sin suero. Ajustar la concentración a 10,000 células/ml en los diferentes medios con los sueros a probar y sembrar 3 pozos con 100 µl para cada medio en 3 placas de 96 pozos. Incubar por 24 h. Agregar a cada pozo de una placa 0.5 µCi (20 µl) de timidina tritiada diluida en medio de cultivo sin suero. Dejar 4 h y recolectar las células por filtración. Realizar esta operación durante 3 días seguidos y colocar cada papel filtro seco en un frasco vial conteniendo 4 ml de líquido de centelleo. Contar la radioactividad de cada frasco en un contador de radiaciones β.

Líquido de centelleo:

PPO	0.5 g
POPOP	100 mg
Tolueno	1 l

3.9 DETECCION DE MICOPLASMAS

Esterilizar cubreobjetos y colocar en el fondo de cada pozo de una caja de cultivo de 24 pozos. Tripsinizar células epiteliales de riñón de berrero de una línea estable (OVK) y sembrar en cada pozo sobre los cubreobjetos, en un medio de cultivo sin antibiótico. Agregar a cada pozo 0.1-1 ml de sobrenadante de los medios de cultivo de mielomas crecidos en presencia

de los sueros a probar. 24-72 h después, se retira el medio con las células en suspensión y las adherentes son fijadas 2 min en metanol-ácido acético - (75:25). Se realizan 2 fijaciones mas de 5 min cada una. Secar al aire y - teñir con el colorante H33258 disuelto en PBS 7.5 (0.2 µg/ml) durante 30 min. Lavar los cubreobjetos 4-5 veces con agua destilada y montarlos en portaobje - tos con glicerina en PBS pH 7 (9.1). Observar en un microscopio de fluores - cencia.

3.10 PRODUCCION DE HIBRIDOMAS

3.10.1 Obtención de macrófagos de cavidad peritoneal de ratón

Sacrificar el ratón y sumergirlo en etanol para desinfectar. Inyectar intraperitonealmente 5 ml de una solución de sacarosa 0.35M a 4°C; mover un - poco el abdomen del animal e introducir paralelamente al mismo una aguja # - 18. Recoger el líquido con macrófagos en un tubo y colocar en hielo. Cen - trifugar a 500 g por 10 min y resuspender en el medio adecuado. Si se recu - peran los 5 ml originales se obtienen aproximadamente 2×10^6 células por ra - tón. Si se utilizan placas de 96 pozos se siembran 5,000 células/100 µl y - si se usan placas de 24 pozos se siembran 20,000 células/ml.

3.10.2 Fusión celular

Sacrificar el ratón, obtener el bazo, colocarlo en una caja de Petri - con medio RPMI y obtener las células por perfusión con el mismo medio. Pa - sar a un tubo y dejar sedimentar los pedazos de tejido no dispersos; pasar - el sobrenadante a otro tubo y centrifugar a 500 g por 10 min. Lavar 3 veces con el mismo medio. Contar la viabilidad de las células por tinción con a - zul de tripano y en base a esto, mezclar la cantidad adecuada en un tubo con las células de mielomas, éstas últimas previamente lavadas 3 veces con el - mismo medio. Centrifugar, quitar el sobrenadante y agregar 0.5 ml de la so - lución de PEG al 50% y agitar perfectamente con un tubo de vidrio durante - 90 seg. Agregar 0.5 ml del medio, agitar por 90 seg y agregar 1 ml del me - dio. Añadir sucesivamente volúmenes dobles de medio con intervalos de 90 - seg hasta completar un total de 8 ml. Centrifugar a 500 g por 10 min, reti - rar el sobrenadante y diluir las células con 5 ml de medio completo e incu -

bar por 2 h mezclando periódicamente con suavidad. Centrifugar, diluir en medio HAT y distribuir 10^4 - 10^5 células/pozo en placas de poliestireno de 96-pozos, conteniendo macrófagos obtenidos 1 día antes. Incubar a 37°C y atmósfera húmeda con 5% de CO_2 . Alimentar por cambio de la mitad del medio con medio fresco los días 5, 7, 10 y 11 después de la fusión.

3.10.3 Clonación en medio semi-sólido

Para este ensayo, tanto la solución de agar como el medio de cultivo para clonación deben de conservarse en un baño a 45°C.

MEDIO DE CULTIVO PARA CLONACION (200 ml)		
	ml	%
Suero de caballo	25	12.5
Suero fetal bovino	5	2.5
Piruvato de sodio	2	1
Aminoácidos no esenciales	2	1
HT	2	1
Glutamina	2	1
Medio DMEM 2x	80	40
Agar purificado de Merck al 1.48%	80	40

Colocar 10 ml del medio de clonación en cada caja de Petri de 15 x 100 y dejar solidificar a temperatura ambiente en una atmósfera con 5% de CO_2 . - Mientras tanto, tomar 200 μ l de suspensión con los hibridomas a clonar (20,000 - 200,000 células), diluir en 2 ml de medio HT y a partir de este tubo hacer una dilución 1:10 y 1:100 en 2 ml de medio cada una. Agregar a cada tubo 4 ml del medio de clonación e inmediatamente repartir en las cajas de Petri con el medio ya solidificado y homegeizar perfectamente mediante un movimiento de vaivén. Dejar solidificar a temperatura ambiente en una atmósfera con 5% de CO_2 . Incubar a 36°C en atmósfera húmeda con 5% de CO_2 .

3.10.4 Detección de hibridomas productores de anticuerpos in situ

a) Detección de inmunoglobulinas de ratón

Una vez que las clonas son perfectamente visibles al ojo (aproximadamente 15 días después de sembradas) se procede a detectar las clonas productoras de inmunoglobulinas de ratón, cubriendo el agar con una tercera capa - conteniendo un anticuerpo de conejo anti-ratón:

MEDIO USADO (a 45°C)	
Piruvato de sodio	1%
Aminoácidos no esenciales	1%
Estreptomicina	1%
HT	1%
Glutamina	1%
Suero de conejo anti-ratón	15%
Medio DMEM 2x	40
Agar al 1.48%	40

Antes de usar el suero de conejo anti-ratón hay que inactivarlo, titularlo y diluirlo en un volumen equivalente de suero de caballo para cultivo; centrifugar y esterilizar por filtración.

Agregar 5 ml del medio a cada caja, dejar solidificar e incubar. En - 24 h, las clonas productoras de anticuerpo presentarán un halo de precipitación alrededor de la misma.

b) Detección de anticuerpos anti-LHRH

Se recorta una tira de papel de nitrocelulosa del diámetro de una caja de Petri y se coloca dentro de una de ellas con 10 ml de una solución de - 3 µg/ml del conjugado de polilisina-LHRH en PBS pH 7.8. Dejar 1 noche a 4°C, retirar la solución y agregar 10 ml de ovoalbúmina al 1% en el mismo amortiguador por 4 h. Lavar 5 veces con PBS pH 7.8 + Tween 20, dejar secar y guardar a temperatura ambiente hasta su uso.

Una vez que las clonas son visibles, se cubren con 5 ml del medio para

clonación, sin suero de conejo anti-ratón. Se deja solidificar y se coloca el papel de nitrocelulosa estéril. Se deja incubando 1 noche; se retira, se lava y se coloca en una caja conteniendo 10 ml de una dilución 1:500 del conjugado RAM-POD en amortiguador para diluir usado en ELISA. Se deja a temperatura ambiente por 3 h en oscuridad, se lava 5 veces y se agregan 10 ml de una solución de 10 mg de diaminobencidina en 50 ml de Tris 0.1M pH 7.6 + 100 µl de hidróperóxido de urea (1mg/10 µl). Después de 10 min, lavar con agua destilada varias veces y dejar secar. Si hay presencia de anticuerpos anti-LHRH se observarán en el papel círculos de color café rojizo, cuya localización permite identificar las clonas productoras del anticuerpo.

3.10.5 Producción de líquido ascítico

Las células a inocular se siembran y se mantienen hasta un crecimiento óptimo de 4×10^5 células/ml aproximadamente. Se centrifugan, se lavan una vez con medio DMEM y se resuspenden en el mismo a una concentración de 10^7 células/ml. Se inoculan intraperitonealmente 200 µl de esta suspensión a ratones histocompatibles, inyectados 1 mes antes con pristán. Cuando los ratones presenten los síntomas del tumor, cosechar el líquido ascítico por punción en el abdomen, recolectándolo en un tubo y dejando 2 h a temperatura ambiente para que se forme el coágulo de fibrina. Centrifugar a 830 g por 10 min y guardar a -20°C . Repetir la operación cada tercer día hasta la muerte del animal.

Durante la preparación de los conjugados era necesario comprobar la unión de la hormona al ácido p-aminofenilacético y determinar la eficiencia de la reacción de acoplamiento a las proteínas acarreadoras, por lo que se hizo una cromatografía en capa fina para el primer caso y se introdujo un marcador radioactivo para el segundo.

Se corrió una cromatografía en capa fina del producto de reacción entre la LHRH y el ácido p-aminofenilacético usando el sistema butanol-acetato de etilo-agua-ácido acético (1:1:1:1) y como controles, LHRH y ácido p-aminofenilacético, revelando por la técnica de Pauly. El producto de reacción presentó un Rf de 0.6-0.76, mientras que el ácido p-aminofenilacético presentó un Rf de 0.75-0.86 y la LHRH presentó 2 manchas que presentaron un Rf de 0.57 y 0.87. Este último resultado no se esperaba, por lo que se rasparon las 2 manchas, se extrajeron y se sometieron a una nueva cromatografía en el sistema cloroformo-metanol-amoniaco (5:3:1) y se observó que la mancha de Rf 0.57 presentó un Rf igual al de un control de LHRH y la mancha de Rf 0.87 presentó uno diferente, por lo que se concluyó que ésta era un producto de degradación de la molécula de LHRH a causa de los solventes del primer sistema. Así, los resultados concordaron con los reportados en la literatura (57) al presentar el producto de reacción entre la LHRH y el ácido p-aminofenilacético, un Rf mayor al presentado por la LHRH pura.

Para medir la eficiencia de la reacción se introdujo un marcador radioactivo; éste consistió en LHRH- I^{125} , el cual se introdujo desde el principio de la reacción, partiendo de la hipótesis de que se comportaría de la misma manera que la LHRH no marcada. Los resultados obtenidos se muestran en la tabla #2. Podemos observar que la albúmina y la polilisina presentaron aproximadamente la misma proporción de moléculas de LHRH unidas aún cuando el peso molecular de la primera es casi el doble a la polilisina. Esto se explica debido a que el acoplamiento se hace a través de los residuos lisil de las proteínas(58) y la polilisina es un polipéptido constituido únicamente por residuos lisina. Por otro lado, la tiroglobulina presentó una cantidad de moléculas de LHRH unida a ella mucho mayor a la albúmina, lo cual se explica por el hecho de que la primera es una proteína de peso molecular 10 veces mayor que la albúmina y tiene, por lo tanto, un número mayor de sitios aceptores.

PROTEINA ACOPLANTE	cpm antes de dializar	cpm después de dializar	% LHRH unido	moles LHRH por mol prot.
Tiroglobulina PM=670,000	5,477	1,487	27.45	60
Albúmina PM= 66,000	5,755	1,396	24.25	8
Polilisina PM= 35,000	5,418	1,157	21.35	7

Tabla # 2: Características de los conjugados de LHRH con proteínas a-carreadoras.

2. DESARROLLO DE UN ELISA PARA LA DETECCION DE ANTICUERPOS anti-LHRH

Para detectar anticuerpos secretados por hibridomas se requiere de técnicas que ofrezcan alta sensibilidad, rapidez y la facilidad de manejar un gran número de muestras, por lo que el ELISA fué la técnica de elección. El principio de este método se encuentra ilustrado en la figura # 8.

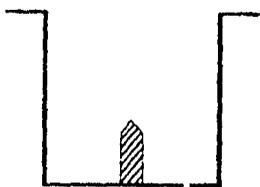
Debido a que el método se iba a usar en la detección de anticuerpos, el primer paso consistió en acoplar el antígeno a la fase sólida. Por tal fin, se realizó un conjugado de polilisina-LHRH ya que se pudo comprobar que la hormona nativa presenta una baja capacidad de acoplamiento a la fase sólida (datos no presentados). Se usó en el ELISA un conjugado diferente a los usados para inmunizar a los ratones con el fin de poder eliminar la detección de anticuerpos contra las proteínas acarreadoras en los sueros de los ratones, o los anticuerpos producidos por algunos hibridomas. De esta manera, los anticuerpos que se detectaron eran aquellos dirigidos únicamente contra la LHRH. La revelación de éstos se hizo con un anticuerpo de conejo anti-IgG de ratón acoplado a peroxidasa.

2.1 OBTENCION Y CARACTERIZACION DE UN CONJUGADO RAM-POD

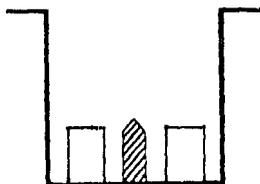
2.1.1 Purificación del anticuerpo

El suero de conejo anti-IgG de ratón fué ultracentrifugado para eliminar los lípidos y posteriormente fué precipitado con sulfato de amonio para el aislamiento del anticuerpo. Posteriormente se sometió a una cromatografía de intercambio iónico para la obtención de las IgG purificadas. Para comprobar la pureza de las inmunoglobulinas, se sometió a una electroforesis desnaturante, la cual se observa en la figura # 9 y posteriormente se comprobó su actividad como anticuerpo al resultar positiva una inmunodifusión de la misma contra suero normal de ratón.

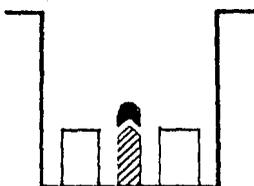
Una vez que el anticuerpo fué aislado y purificado se sometió a una absorción con suero de caballo en una columna de afinidad con el fin de eliminar anticuerpos inespecíficos contra éste y que posteriormente pudieran interferir en los ensayos de ELISA. Se purificó y se concentró 2 veces por precipitación con sulfato de amonio.



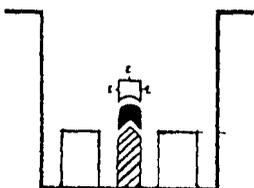
1. Antígeno adsorbido a la fase sólida



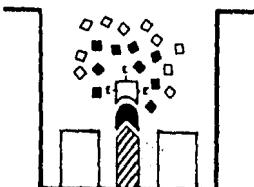
2. Proteína adsorbida a los sitios no ocupados por el antígeno



3. Unión del anticuerpo presente en la muestra con el antígeno.



4. Adición de un segundo anticuerpo acoplado con una enzima



5. Adición del sustrato

FIGURA # 8: Fundamento del método de ELISA para la detección de anticuerpos.

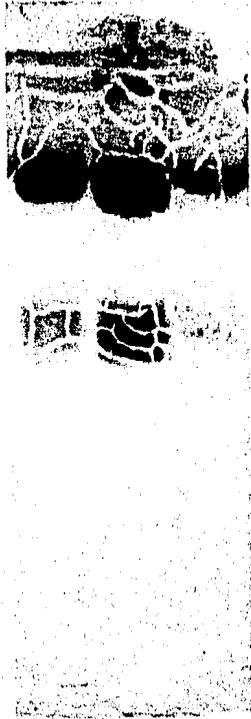


FIGURA # 9: Electroforesis en gel de acrilamida-SDS (15% de acrilamida) en presencia de β -mercaptoetanol de la IgG de conejo anti-IgG de ratón purificada por cromatografía de intercambio iónico, la cual se observa en el carril central.

2.1.2 Obtención del conjugado RAM-POD

Se obtuvo un conjugado de anticuerpos de conejo anti-IgG de ratón-Peroxidasa (RAM-POD) para usarlo posteriormente como sistema revelador en los ensayos de ELISA. Una vez obtenido y diluido a 200 µg/ml se tituló para determinar la concentración óptima necesaria del mismo para los ensayos posteriores. Por tal motivo se realizó un ELISA que consistió en acoplar a la fase sólida cantidades variables de IgG de ratón y haciendo reaccionar directamente con distintas diluciones del conjugado: 5, 2, 1, 0.5, 0.2 y 0.1 µg/ml y revelando con el sustrato cromogénico. La figura # 10 muestra las curvas obtenidas al usar diferentes diluciones del conjugado obtenido. Las diluciones superiores a 0.5 µg/ml presentaron densidades ópticas muy por arriba del límite de lectura del aparato usado, por lo que no fué posible graficar. Sin embargo, las diluciones de 0.2 y 0.1 µg/ml muestran curvas de titulación dentro de los límites de lectura y sensibilidad deseados; la curva correspondiente a 0.1 µg/ml muestra un desplazamiento hacia abajo debido a la dilución tan grande de conjugado. Por esto, se escogió la dilución de 0.2 µg/ml como aquella para usarse en ensayos posteriores que requirieran de su uso.

2.2 OBTENCION DE OVOALBUMINA

Al realizar un ELISA es necesario saturar los sitios de la fase sólida no ocupados por el antígeno con el fin de eliminar una posible fijación inespecífica de inmunoglobulinas, y por ende, lecturas falsas positivas. Para saturar estos sitios es necesaria una proteína que no sea capaz de interferir en el ensayo; por tal motivo se utilizó la ovoalbúmina, ya que además, es relativamente fácil de obtener en grandes cantidades desde su fuente natural por medio de precipitación con sulfato de sodio (59). La figura # 11 muestra una electroforesis desnaturante del producto final obtenido en la que se observa casi en su totalidad ovoalbúmina, aunque se observan 2 bandas de otras proteínas que no se pudieron eliminar en el aislamiento. No obstante, la ovoalbúmina fué usada en los ensayos de ELISA sin que se presentara ningún tipo de reacción cruzada.

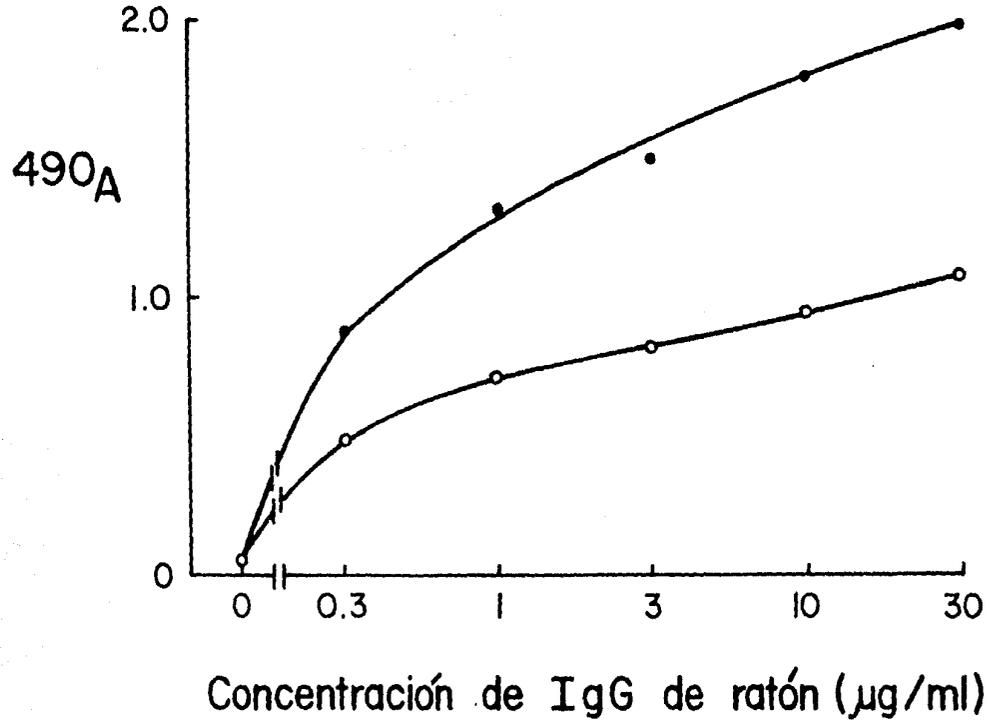


FIGURA # 10: Titulación del conjugado RAM-POD. Se adsorbieron a la fase sólida diferentes concentraciones de IgG de ratón y se revelaron con diversas diluciones del conjugado. Las diluciones de 0.5, 1, 2 y 5 µg de conjugado/ml presentaron valores de densidad óptica por arriba de los límites de lectura del aparato usado. (●) 0.2 µg/ml, (○) 0.1 µg/ml.

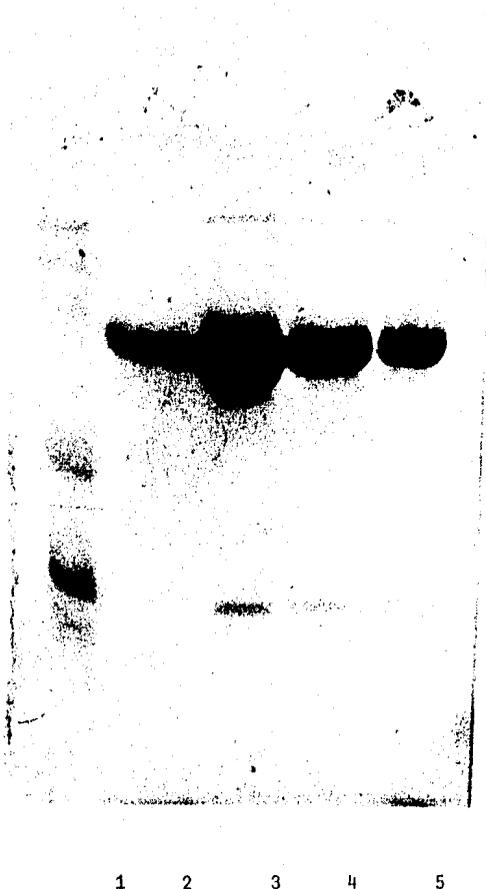


FIGURA # 11: Electroforesis en gel de acrilamida-SDS (15% de acrilamida) en presencia de β -mercaptoetanol de la ovoalbúmina obtenida. Carril # 1:- Marcadores de peso molecular: lisozima (14,300), β -lactoglobulina (18,400), tripsinógeno (24,000), pepsina (34,700), ovoalbúmina --- (45,000), albúmina sérica bovina (66,000), de abajo hacia arriba. Carril # 2: Ovoalbúmina comercial (Sigma). Carril # 3, 4 y 5: Diferentes concentraciones de la ovoalbúmina obtenida.

2.3 OPTIMIZACION DEL ELISA

La optimización de la técnica de ELISA para detectar los anticuerpos anti-LHRH consistió en determinar la cantidad del conjugado de polilisina - LHRH necesaria para obtener una curva de titulación lo suficientemente sensible para detectar los anticuerpos y que a la vez, se encontrara dentro de los límites de lectura del aparato ($4^{90}A < 2.0$). Se probaron cantidades de 30, 10, 3, 1 y 0.3 μg del conjugado/ml en los pozos de la fase sólida, frente a un suero de ratón anti-LHRH. Como se puede observar en la figura # 12, a medida que la concentración del antígeno colocado en la placa disminuye, la curva de titulación se desplaza hacia abajo y por lo tanto, la cantidad de anticuerpo detectada es cada vez menor. Con una concentración de 3 $\mu\text{g}/\text{ml}$ se observa una curva dentro de los límites de lectura del aparato y se llega a la sensibilidad máxima del ensayo, por lo que fué la cantidad de antígeno elegida para usarse posteriormente en la titulación de los anticuerpos anti-LHRH.

Se observa que el suero normal de ratón usado como control presentó un ruido de fondo muy bajo. Sin embargo, al usar el suero inmune frente a la fase sólida que no contenía LHRH, se observó un ruido de fondo muy alto. Esto se debió a que el suero inmune utilizado había sido obtenido de un ratón sensibilizado con un conjugado de albúmina-LHRH y la proteína saturante utilizada en este ensayo era albúmina, por lo que en realidad se estaban detectando también anticuerpos anti-albúmina. Por este motivo se utilizó otra proteína saturante, y se montó a la vez, una prueba de inhibición para determinar la especificidad de los anticuerpos. Esta prueba se montó preincubando diluciones de la hormona desde 0.004 hasta 400 ng/ml con una dilución 1:1000 de un suero anti-albúmina-LHRH e incubando posteriormente esta mezcla en pozos cubiertos con el conjugado de polilisina-LHRH y saturados con albúmina u ovoalbúmina. La figura # 13 muestra una gráfica en la que se observa una clara inhibición en el desarrollo de color provocada por la neutralización de los anticuerpos con el antígeno libre antes de desarrollar el ELISA. Se puede observar que concentraciones mayores a 4 ng de LHRH/ml provocan una marcada inhibición en el reconocimiento del anticuerpo hacia el conjugado acoplado a la placa.

Las proteínas saturantes usadas influyen notablemente en el ensayo. Se observa que en presencia de albúmina, la curva de inhibición se desplaza un poco hacia arriba, lo cual se debe a la detección de anticuerpos anti-albúmina, por lo que su uso fué descartado posteriormente utilizando en su lugar la ovoalbúmina, ya que la concentración de albúmina utilizada en la solu

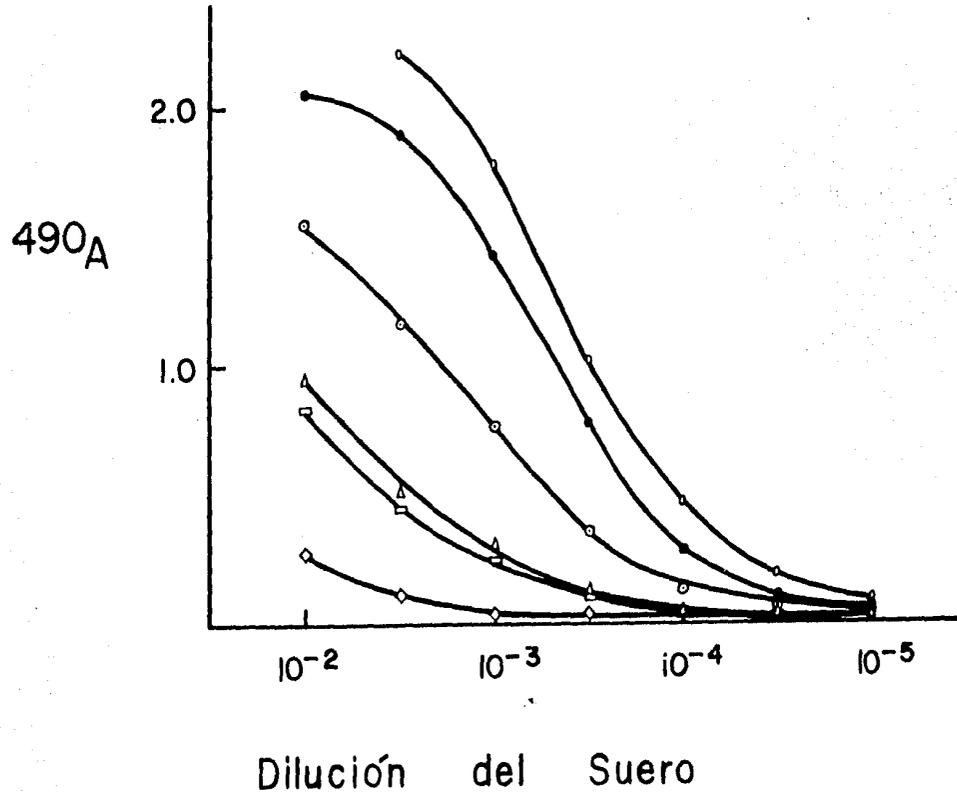


FIGURA # 12: Optimización del ELISA. La fase sólida fué cubierta con diferentes concentraciones de polilisina-LHRH, saturada con albúmina sérica bovina y se incubó con diversas diluciones de un suero de ratón anti-Albúmina-LHRH. Se reveló con el conjugado RAM-POD. Concentraciones de polilisina-LHRH usadas: (○) 30 y 10 µg/ml. (●) 3 µg/ml. (◐) 1 µg/ml. (▲) 0.3 µg/ml. (◻) 0 µg/ml. (◊) suero normal de ratón.

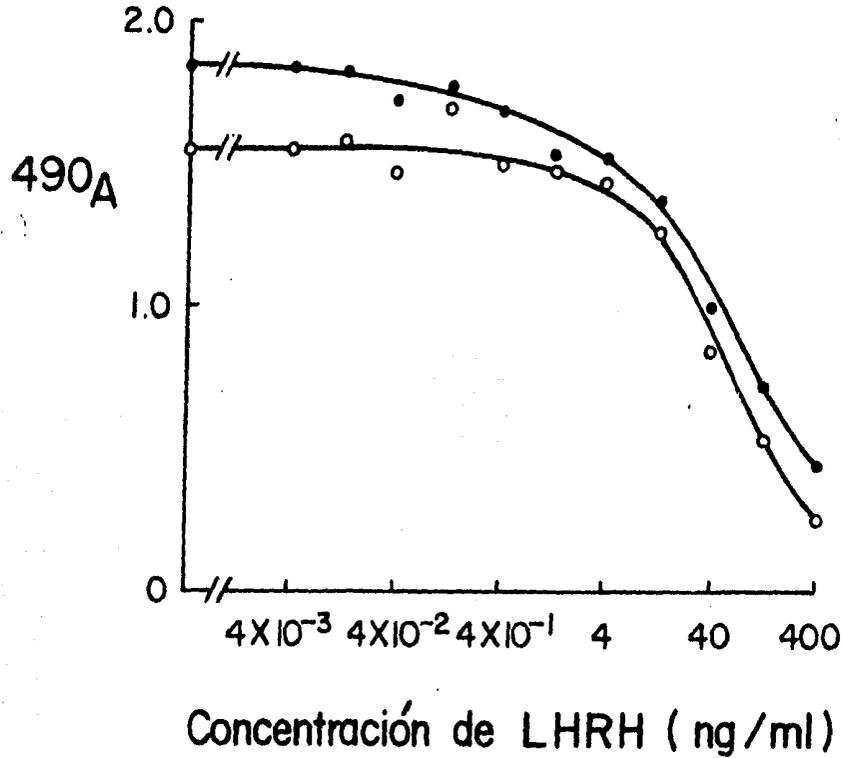


FIGURA # 13: Prueba de inhibición por ELISA de un suero de ratón anti-Albúmina-LHRH. El anticuerpo se incubó con diferentes diluciones de LHRH y posteriormente se desarrolló el ELISA sobre la fase sólida, cubierta con Polilisina-LHRH y saturado con ovalbúmina (○) o -albúmina sérica bovina (●). Los anticuerpos unidos se revelaron con el conjugado RAM-POD.

ción para diluir el anticuerpo no parece ser suficiente para inhibir completamente la reacción de los anticuerpos anti-albúmina.

3. INMUNIZACION DE LOS RATONES Y TITULACION
DE LOS SUEROS POR ELISA

La inmunización de los ratones se llevó a cabo de acuerdo al esquema - presentado en la sección de Material y Métodos, y los ratones usados se distribuyeron de la siguiente manera:

CONJUGADO INOCULADO: ALBUMINA-LHRH

Balb/c			Balb/k			C57Bl/6		
Número	Sexo	Título	Número	Sexo	Título	Número	Sexo	Título
17	M	<< 100	21	M	800	25	M	<< 100
18	M	<< 100	22	M	<< 100	26	M	<< 100
19	H	3,000	23	H	<< 100	27	H	<< 100
20	H	<< 100	24	H	7,000	28	H	<< 100

CONJUGADO INOCULADO: TIROGLOBULINA-LHRH

Balb/c			Balb/k			C57Bl/6		
Número	Sexo	Título	Número	Sexo	Título	Número	Sexo	Título
37	H	500	40	H	800	43	H	1,000
38	H	1,000	41	H	1,500	44	H	3,000
39	H	1,500	42	H	3,000			

Tabla # 2: Títulos de los sueros de los ratones después de la 4a. in -
munización

Después de la tercera y cuarta inmunización, los ratones se sangraron - y los sueros se titularon por ELISA. La tabla # 2 muestra el título del sue -
ro de cada ratón después de la cuarta inmunización (el título obtenido des -
pués de la tercera inmunización fué ligeramente mas bajo que el presentado -

después de la cuarta). Las figuras # 14 y 15 muestran las gráficas obtenidas de esta titulación.

Definiendo el título en este ensayo como el inverso de la dilución del suero que presente una densidad óptica de 1, se puede observar que la mayoría de los ratones inoculados con el conjugado de albúmina dieron una respuesta poco reproducible. Un ratón macho de la cepa Balb/c y uno de la Balb k presentaron un título >1,000 y un ratón hembra de ésta última cepa presentó un título de 800. Todos los demás ratones de estas 2 cepas presentaron un título <<100. Todos los ratones de la cepa C57Bl/6 dieron una mala respuesta al antígeno (título <<100). Contrariamente a estos resultados, los ratones inoculados con el conjugado de tiroglobulina presentaron casi todos un título superior a 1,000. Todas las cepas dieron lugar a una buena respuesta inmune, observándose los mejores títulos dentro de las cepas Balb/k y C57Bl/6. Estos resultados nos podrían indicar que el conjugado con tiroglobulina es mas inmunogénico que el de albúmina. No obstante, para cada conjugado se eligió el ratón con el título mas elevado para llevar a cabo la fusión posteriormente; para el conjugado de albúmina se eligió el ratón # 20 y para la tiroglobulina el ratón # 42.

4. ELECCION DEL PORCENTAJE OPTIMO DE SUEROS PARA CULTIVO DE HIBRIDOMAS

Un lote de suero ya sea de caballo o fetal bovino destinado para uso en cultivo de células debe de reunir 2 requisitos muy importantes: 1) estar libre de contaminación por micoplasmas y, 2) favorecer el crecimiento de las células de manera óptima.

El suero de caballo usado fué obtenido directamente del Instituto Nacional de Higiene, SSA. Se centrifugó, se esterilizó por filtración y se realizó la prueba de detección de micoplasmas, resultando negativa. Posteriormente, se llevó a cabo la determinación del porcentaje óptimo de suero fetal bovino-suero de caballo utilizado en el medio de cultivo que permitiera un desarrollo óptimo de las células de mieloma Sp2/0, midiendo la velocidad de crecimiento de éstas por medio de incorporación de timidina tritiada. Los resultados del ensayo se muestran en la tabla # 3.

Como se puede observar, una concentración de 15 y 10% de una mezcla de suero de caballo-suero fetal bovino (75:25) son las que permitieron el crecimiento óptimo de las células. Por el contrario, al utilizar únicamente suero de caballo, el crecimiento celular disminuyó un poco. No se probaron con

490 A

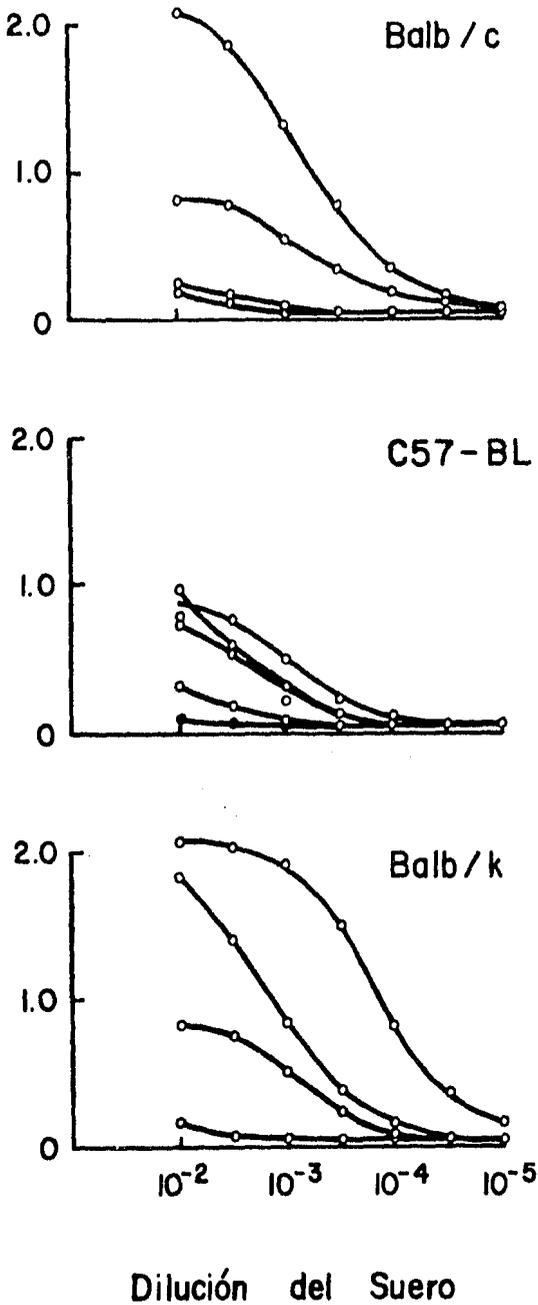


FIGURA # 14: Titulación de los sueros de ratón inmunizados con Albúmina-LHRH por ELISA para la cuantificación de anticuerpos anti-LHRH, después de la 4a inmunización. (•) Suero normal de ratón.

490 A

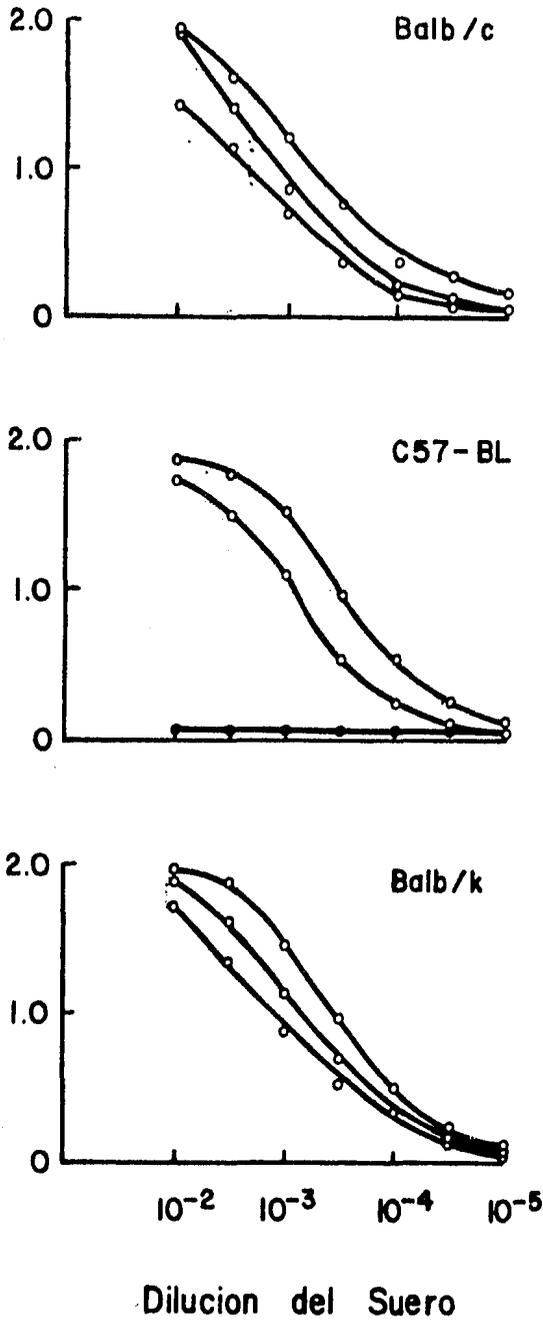


FIGURA # 15: Titulación de los sueros de ratón inmunizados con Tiroglobulina-LHRH por ELISA para la cuantificación de anticuerpos anti-LHRH, después de la 4a inmunización. () Suero normal de ratón.

% de Suero Final	Suero de Caballo	Suero Fetal Bovino	Incorporación de ^3H -Timidina (cpm)		
			día 1	día 2	día 3
10	100	0	8000±502	31542±1080	100891±3600
10	75	25	7148±243	32951±1400	118238±2800
15	100	0	5766±34	28491±1864	87937±2037
15	75	25	7259±411	35795±2090	125532±4500
15	100	0	865±302	130±125	332±180
Control sin células					

Tabla # 3. Crecimiento de las células en función de los sueros utilizados. Los resultados son promedio de triplicados \pm D.S.

centraciones mayores de suero debido a su efecto tóxico a altas concentraciones. No obstante, se eligió la concentración de 15% de la mezcla 75:25 de suero de caballo-suero fetal bovino para usarse posteriormente para el crecimiento de la línea de mieloma usada y para la obtención de los hibridomas.

5. MONTAJE DE LA CLONACION EN AGAR SEMISOLIDO

De una manera semejante al ensayo anterior, se optimizó una técnica de clonación en agar semisólido, probando agar de diversas marcas, así como el porcentaje de suero requerido en cada una de éstas. Los parámetros a probar fueron:

1. Agar
 - a) agar purificado (Merck)
 - b) agarosa (Sigma)
 - c) agarosa (Bio-Rad)
2. Concentración
 - a) capa inferior: 0.6% y 0.45%
 - b) capa superior: 0.4% y 0.3%
3. Suero de caballo-suero fetal bovino (75:25)
 - a) 10% final
 - b) 15% final

Los resultados de este ensayo se muestran en la tabla # 4. Se hizo la prueba sembrando 10,000, 1,000 o 100 células de mieloma de la línea Sp2/0 - por caja, para cada prueba, utilizando un total de 30 cajas de Petri. Después de 10 días se revisaron las cajas y los resultados se evaluaron tomando

AGAR	% AGAR		% SUIRO	CELULAS SEMBRADAS	CLONAS OBSERVADAS	TAMAÑO
	INFERIOR	SUPERIOR				
Merck	0.6	0.4	15	10,000	>300	+++
				1,000	190	+++
				100	30	+++
			10	10,000	>300	+++
				1,000	190	+++
				100	30	+++
Agarosa Sigma	0.6	0.4	15	10,000	ND	+
				1,000	-	-
				100	-	-
			10	10,000	ND	+
				1,000	-	-
				100	-	-
Agarosa Sigma	0.45	0.3	15	10,000	>300	+++
				1,000	278	+++
				100	30	+++
			10	10,000	>300	+++
				1,000	107	+++
				100	30	+++
Agarosa Bio-Rad	0.6	0.4	15	10,000	-	-
				1,000	-	-
				100	-	-
			10	10,000	-	-
				1,000	-	-
				100	-	-
Agarosa Bio-Rad	0.45	0.3	15	10,000	ND	+
				1,000	-	-
				100	-	-
			10	10,000	-	-
				1,000	-	-
				100	-	-

Tabla # 4. Optimización del método de clonación en medio semisólido. -
Influencia del tipo de agar, la concentración de células y de suero.
ND: No determinado. El número de clonas fué muy bajo a comparación de las
células sembradas. Tamaño: +++ Grande + Pequeñas.

en cuenta el tamaño de las clonas, así como el número.

El agar de Merck (0.6% - 0.45%) y la agarosa de Sigma (.045% - 0.3%), ambos con un 15% de suero, fueron los que dieron resultados más satisfactorios. Las clonas crecidas en la agarosa de Bio-Rad presentaron un número y un tamaño disminuido, por lo que su uso posterior se descartó. Se eligió el agar de Merck para usarlo en la clonación de los hibridomas que posteriormente se obtuvieron.

6. FUSION CELULAR Y CLONACION DE LOS HIBRIDOMAS

Se realizó la fusión entre células de la línea de mieloma no productora de inmunoglobulinas Sp2/0Ag-14 (42) y células de bazo de ratones sensibilizados a la LHRH. Como se mencionó en puntos anteriores, se utilizaron los bazos de los ratones que presentaron un mayor título de anticuerpos contra cada uno de los conjugados usados. Ambos ratones fueron de la cepa Balb/k.- Se realizaron un total de 2 experimentos de fusión celular. En el primero de ellos se usó la mitad de las células de bazo de cada ratón y las células restantes se congelaron para llevar a cabo con ellas una segunda fusión, dependiendo de los resultados obtenidos en la primera.

En la literatura se reportó que el peso molecular del polietilenglicol usado como agente fusionante, así como su pureza, pueden influir en el número de hibridomas obtenidos (40,60). Por este motivo se probaron 2 tipos de PEG disponibles en nuestro laboratorio, uno de peso molecular 3,350 (Sigma) y otro de peso molecular 4,000 (Merck).

Se fusionaron 5×10^6 células de mieloma con 20×10^6 células de bazo (relación 1:4), sembrando después de la fusión 150,000 y 30,000 células de bazo por pozo en placas de poliestireno de 96 en el medio selectivo HAT. En la segunda fusión, se sembraron 50,000 células de bazo por pozo. En los días 5, 6 y 7 posteriores a la fusión se reemplazó la mitad del medio por medio fresco con el fin de eliminar por dilución los posibles anticuerpos que hubieran podido aparecer en el medio de cultivo producidos por linfocitos B no fusionados que aún sobrevivieran.

Cuando hubo un buen crecimiento celular, aproximadamente 15 días después de la fusión, se llevó a cabo un ELISA para detectar aquellos pozos en los que hubiera presencia de anticuerpos anti-LHRH. Los resultados de este ELISA se muestran en la tabla # 5. Como se puede observar, la mayoría de los pozos presentaron una densidad óptica menor a 0.3, considerándose estos valores como ruido de fondo del ensayo y, por lo tanto, negativos. Conside-

	Inmunógeno	ALBUMINA-LHRH		TIROGLOBULINA-LHRH		TIROG.-LHRH
	Cel/pozo	150,000	30,000	150,000	30,000	50,000
490 ^o A	0 - 0.1	511	503	550	538	1,147
	0.1 - 0.2	59	70	23	29	-
	0.2 - 0.3	6	3	1	7	-
	0.3 - 0.4	-	-	1	-	2
	0.7 - 0.8	-	-	-	-	1*
	0.8 - 0.9	-	-	-	-	1
	1.2 - 1.3	-	-	-	1*	-
	1.3 - 1.4	-	-	-	-	1*
	1.7 - 1.8	-	-	-	1*	-
	>2	-	-	1*	-	-

Tabla # 5. Valores de densidad óptica y número de pozos en la detección de los pozos con clonas secretoras de anticuerpos anti-LHRH. * Indica los pozos en los cuales, la presencia de anticuerpos anti-LHRH se confirmó por medio de un experimento de inhibición.

ramos como positivos aquellos pozos que presentaran una densidad óptica superior a 0.3. Para identificar aquellos pozos que tuvieran anticuerpos específicos contra la LHRH se les realizó una prueba de inhibición, encontrando que únicamente aquellos valores superiores a 0.7 podían ser considerados como positivos, aunque se puede observar que el pozo que presentó un valor de 0.8-0.9 no contenía anticuerpos anti-LHRH.

Paralelamente a esto, se llevó a cabo la revisión de todas las cajas para obtener el número exacto de pozos con crecimiento. Así, estos resultados, junto con los arriba mencionados fueron tratados de acuerdo a la distribución de Poisson:

$$P(n) = \frac{m^n e^{-m}}{n!}$$

en la cual:

P(n): porcentaje de pozos con n clonas

m: promedio del número de clonas por pozo. Este valor se obtiene experimentalmente desde el % de pozos donde no aparecen hibridomas, ya que:

$$P(0) = e^{-m} \quad \text{y} \quad m = -\ln P(0)$$

Los resultados así evaluados se observan en la tabla # 6.

Se puede observar que el número de clonas por pozo es aproximadamente proporcional al número de células sembradas. Así, al sembrar 150,000 células/pozo se obtuvo un promedio entre 1.1 y 1.8 clonas/pozo y al sembrar 30,000 células, el promedio varió de 0.22 a 0.44 clonas/pozo. Para poder comparar estos resultados en función de la eficiencia de fusión, se corrigieron los valores a número de clonas por cada 10^6 células de bazo. Podemos observar que la eficiencia de fusión fué muy parecida en la primera fusión, independientemente del conjugado utilizado para la inmunización, y habiendo una variación en el número de clonas fusionadas/ 10^6 células de bazo de 5.6 a 12. Sin embargo, estas variaciones no son significativas, ya que se encuentran dentro del error experimental. En la segunda fusión de las células sensibilizadas con el conjugado de tiroglobulina, la eficiencia de fusión subió ya que se obtuvo un valor de 26 hibridomas/ 10^6 linfocitos. Esto es de esperarse, ya que la eficiencia entre experimentos de fusión diferentes puede ser variable, ya que las células de mieloma podrían no encontrarse exactamente en la misma fase de crecimiento. Además, en esta fusión se utilizó un medio mas enriquecido (RPMI 1640) para lavar las células y para diluir el polietilenglicol, lo cual podría haber influido en la eficiencia de fusión. Por otra parte, los resultados obtenidos de acuerdo al tipo de PEG usado, no demuestran una diferencia significativa.

Se detectaron un total de 5 pozos que contenían células secretoras de anticuerpos anti-LHRH. En la primera fusión se detectaron 3, los cuales fueron derivados de las células de bazo inmunizadas con el conjugado de tiroglobulina y por esta razón se utilizaron únicamente estas células en la segunda fusión. Así, podemos observar que el número de pozos positivos fué muy similar en ambas fusiones, siendo el número promedio de clonas secretoras de anticuerpo anti-LHRH por pozo muy bajo (0.002-0.0034) y el porcentaje de clonas secretoras de anticuerpo específico fué bajo también (0.15-0.20%). Podemos pensar que el número de clonas sensibilizadas al hapteno es muy baja, ya que aún con un buen número de células híbridas obtenidas, el porcentaje de hibridomas secretoras de anticuerpo específico fué bajo. Por otra parte, va

Inmunógeno	ALBUMINA-LHRH				TIROGLOBULINA-LHRH (1a fus.) (2a fus.)				
	150,000		30,000		150,000		30,000		50,000
Cels. de Bazo/Pozo	PEG 4000	PEG 3350	PEG 4000	PEG 3350	PEG 4000	PEG 3350	PEG 4000	PEG 3350	PEG 3350
# Pozos Sembrados	288	288	288	288	288	288	288	288	1176
# Pozos con Crecimiento	210	192	56	76	210	244	47	94	873
# Clonas/Pozo (Promedio)	1.3	1.1	0.22	0.31	1.3	1.8	0.17	0.4	1.3
P(0)	27	33	80	73	38	33	83	67	25
P(1)	35	36	17	22	35	29	14	26	35
P(>1)	38	31	3	5	27	38	3	7	40
# Clonas/10 ⁶ Células de Bazo	8.6	7.3	7.3	10.6	8.6	12	5.6	10	26
# Pozos con Ac. anti-LHRH observados	-	-	-	-	1	1	-	1	2
# Clonas específicas por Pozo	-	-	-	-	0.0035	0.0035	-	0.0035	0.002
P*(0)	-	-	-	-	99.6	99.6	-	99.6	99.8
P*(1)	-	-	-	-	0.34	0.34	-	0.34	0.199
P*(>1)	-	-	-	-	0.06	0.06	-	0.06	0.001
# Clonas Productoras/ 10 ⁶ Cels. Bazo	-	-	-	-	0.023	0.023	-	0.116	0.04
% Clonas Secretoras de Ac. específico	-	-	-	-	0.26	0.19	-	1.16	0.15

99

Tabla # 6. Resultados de los experimentos de fusión. P(0), P(1) y P(>1) representan los porcentajes de pozos conteniendo respectivamente 0, 1 y >1 clona (determinado según la dist. de Poisson). P*(0), P*(1) y P*(>1) representan los porcentajes conteniendo respectivamente 0, 1 y >1 clona productora de anticuerpo anti-LHRH.

le la pena mencionar que se detectó un porcentaje mucho mas alto de pozos - que contenían anticuerpos contra la proteína acarreadora correspondiente (da - tos no presentados).

Ahora bien, de 0.40% de los pozos que contienen anticuerpos anti-LHRH, el 0.34% (85%) contienen una sola clona productora y el 0.06% (15%) contie - nen mas de 1 clona productora, lo que nos indica que la probabilidad que ha - ya mas de 1 clona productora en los 3 pozos positivos de la primera fusión - es baja. En el caso de la segunda fusión, solamente 0.20% de los pozos fue - ron positivos, y esta probabilidad es todavía mas baja.

Si nos referimos a las clonas totales, independientemente de la produc - ción de anticuerpo específico, observamos que en el caso de los pozos sembra - dos con 150,000 células en la primera fusión, y en el caso de la segunda tam - bién, dentro del 62-67% de los pozos que contienen hibridomas, aproximadamen - te la mitad contienen mas de una clona. En consecuencia, hay una probabili - dad de $\pm 50\%$ de que los pozos con clonas productoras de anticuerpos anti-LHRH contengan también otra clona no específica. Por esta razón, se necesita lle - var a cabo una clonación, para poder separar la clona productora del anti - cuerpo deseado de las demás.

Los pozos que contenían células productoras de anticuerpo anti-LHRH - fueron expandidas y sometidas a clonación en medio semisólido. Lamentable - mente, en este paso, una de las clonas obtenidas en la primera fusión se per - dió por problemas de contaminación; no obstante, las otras 2 clonas se deno - minaron BKL 1 y BKL2 y las 2 obtenidas en la segunda fusión BKL 5 y BKL 6.

Se revelaron las clonas productoras de IgG de ratón in situ por medio - de un segundo anticuerpo (conejo anti-ratón), observándose las clonas positi - vas como se muestra en la figura # 16a. Por medio de este ensayo, se detec - tan únicamente las clonas productoras de inmunoglobulina de ratón, sin cono - cer su especificidad, por lo cual, las clonas aisladas se someten a una prue - ba de ELISA. La clona BKL 1 presentó un alto porcentaje de subclonas positi - vas a la detección de la inmunoglobulina y posteriormente confirmadas como - anticuerpos anti-LHRH, mientras que la clona BKL 2 presentó un alto porcenta - de de células positivas la primera vez, pero una baja proporción de éstas fueron específicas para LHRH. Las subclonas productoras del anticuerpo deseado se - expandieron y de éstas, las que presentaron el crecimiento mas rápido y la - mayor producción de anticuerpo fueron inyectadas en ratones F1 (Balb/c x - Balb/k) para la obtención de líquido ascítico, y fueron sometidas a una se - gunda clonación, en la cual, un alto porcentaje de las clonas fueron anti - LHRH, ya que en la primera clonación ya se habían seleccionado. De esta ma - nera se demostró que ambas clonas eran estables para la producción del anti -



FIGURA # 16a

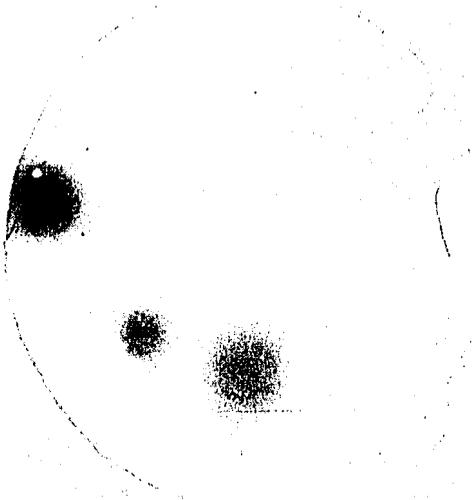


FIGURA # 16b

FIGURA # 16: Clonación de hibridomas productoras de anticuerpos anti-LHRH. a) Detección de clonas productoras de inmunoglobulina de ratón in situ con un segundo anticuerpo (conejo anti-ratón). Las clonas positivas se observan con un halo de precipitación alrededor de ella. b) Detección de clonas productoras de anticuerpos anti-LHRH in situ. Las manchas indican la presencia de anticuerpos específicos y permiten la localización de las clonas.

cuerpo.

Las clonas BKL 5 y BKL 6 fueron sometidas de igual manera a una clonación en medio semisólido. Debido a que la detección de anticuerpos se hace por medio de un segundo anticuerpo, no se detectan únicamente las clonas productoras de anticuerpos anti-LHRH, sino todas las clonas productoras de inmunoglobulina de ratón. Por esto, se decidió montar una prueba de detección de anticuerpos específicos, la cual se describe en la sección de Material y Métodos. La figura # 16b muestra el papel de nitrocelulosa después de haber sido revelado con el sustrato cromogénico el cual permite la localización de las clonas productoras de anticuerpo anti-LHRH. La clona BKL 6 dió lugar a un bajo porcentaje de células productoras del anticuerpo deseado, pero se aumentó al realizar la segunda clonación. La clona BKL 5 presentó un alto porcentaje en la primera clonación, el cual aumentó en la segunda. Ambas clonas se inyectaron en ratones para obtener líquido ascítico con una alta concentración de anticuerpos. De igual manera todas las clonas se crecieron en medio de cultivo, el cual fué separado de las células para la obtención de anti - cuerpo.

7. CARACTERIZACION DE LOS ANTICUERPOS MONOCLONALES

7.1 CARACTERIZACION DE LOS LIQUIDOS ASCITICOS

Tanto los líquidos ascíticos como los medios de cultivo con anticuerpos fueron titulados por ELISA, con el fin de poder comparar su concentración. Como se puede observar en la figura # 17, que muestra la titulación de uno de los anticuerpos, el título de los líquidos ascíticos es muy superior a los obtenidos por los sobrenadantes de cultivo, ya que el título de los primeros va de 10^4 a 5×10^4 y de los sobrenadantes de 3×10^2 a 10^3 .

Por otro lado, se montó una electroforesis en gel de acrilamida con el fin de poder detectar los anticuerpos monoclonales en líquido ascítico y poder compararlos de acuerdo a su concentración. En un principio se usó un sistema que consistió en un gel separador de pH 8.9 y un gel concentrador de pH 7.2 (61) pero la separación de proteínas no fué suficiente para distinguir los anticuerpos monoclonales, como se puede observar en la figura # 18, por lo que se modificó el pH del gel concentrador a 8.2 sin obtenerse un mejor resultado. Posteriormente, se probó un gel a pH 8.9 sin gel concentrador y se logró una mejor separación de las proteínas (figura # 19), observándose que los anticuerpos monoclonales migraron en la zona correspondiente a las -

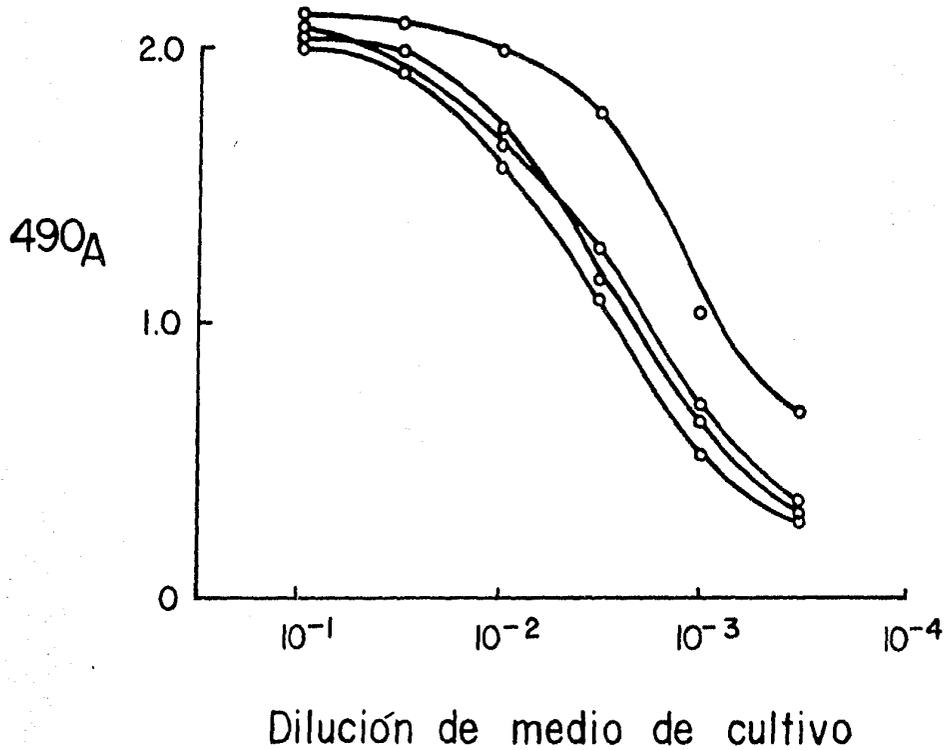


FIGURA # 17a: Titulación de anticuerpos anti-LHRH por ELISA en sobrenadantes de diferentes cultivos de la clona BK1, 2.

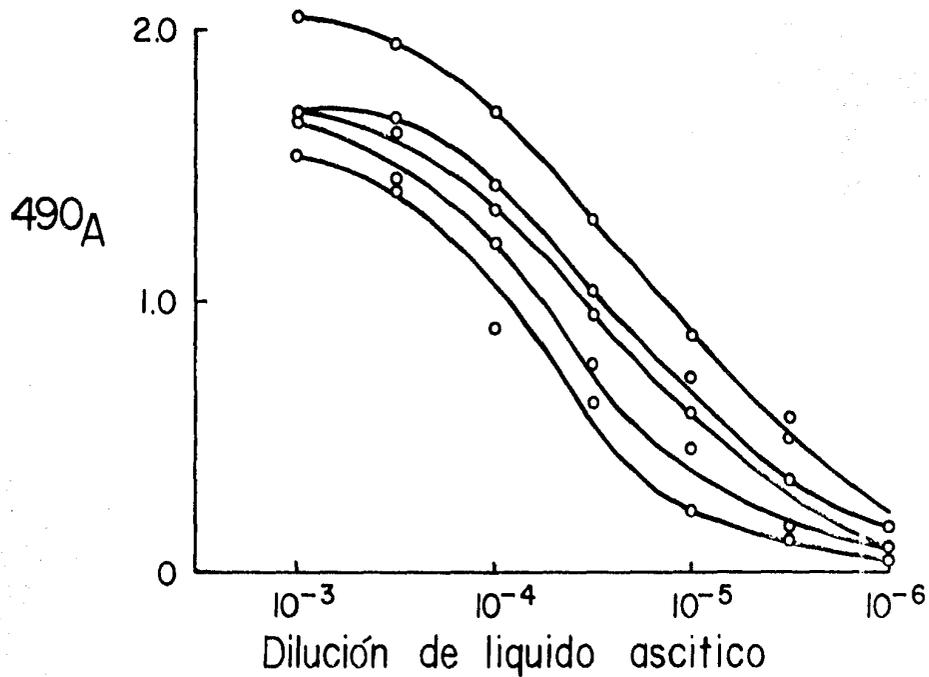


FIGURA # 17b: Titulación de anticuerpos anti-LHRH por ELISA en diferentes muestras de líquido ascítico de ratones inoculados con la clona BKL 2.

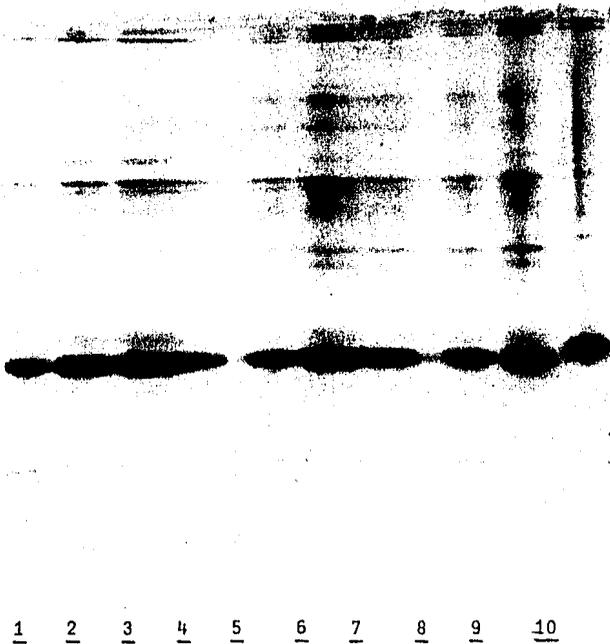


FIGURA #18: Electroforesis en gel de acrilamida (7.5%) de líquidos ascíticos con anticuerpos anti-LHRH. Gel concentrador: pH 7.2; gel separador: pH 8.9.

- Carriles 1-3: Líquido ascítico de la línea de mieloma X63. (1, 2 y 4 μ l)
- Carriles 4-6: Líquido ascítico de la clona BKL 1. "
- Carriles 7-9: Líquido ascítico de la clona BKL 2. "
- Carril 10: Medio de cultivo con anticuerpos anti-LHRH de la clona BKL 1.

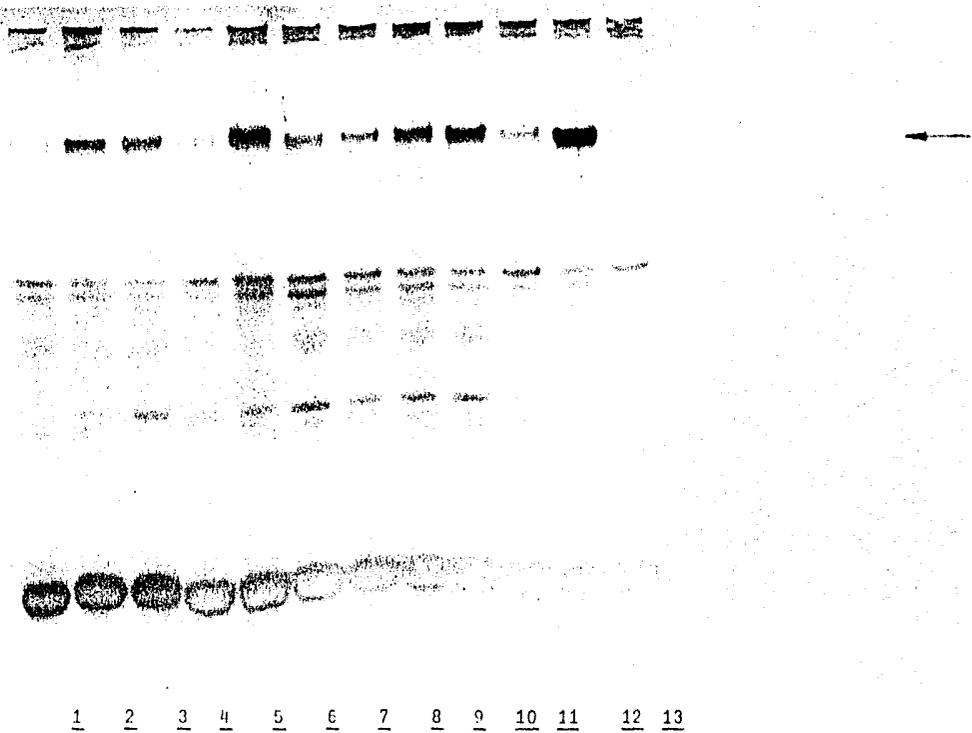


FIGURA # 19a: Electroforesis en gel de acrilamida (7.5%) pH 8.9 de algunos líquidos ascíticos. Carriles # 1-5: BKL 1. Carriles # 6-10: BKL 2. Carril # 11: anticuerpo monoclonal anti E. histolytica. Carril # 12: X 63. Carril # 14: IgG de ratón purificada. La flecha indica el lugar de migración de los anticuerpos monoclonales.

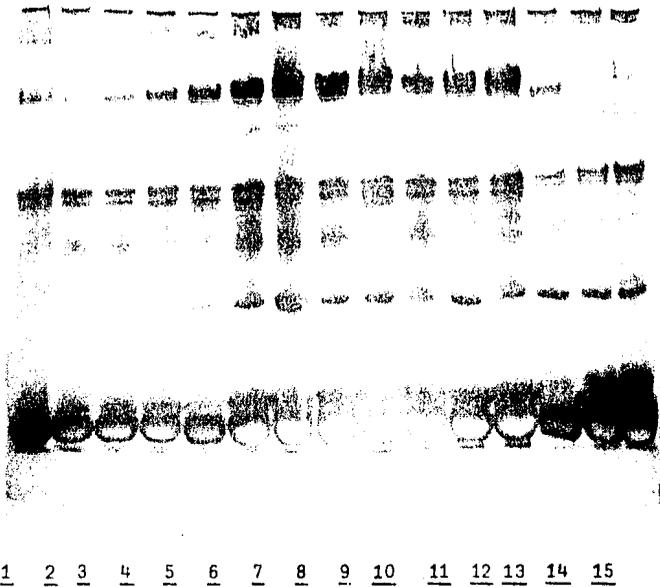


FIGURA # 19b

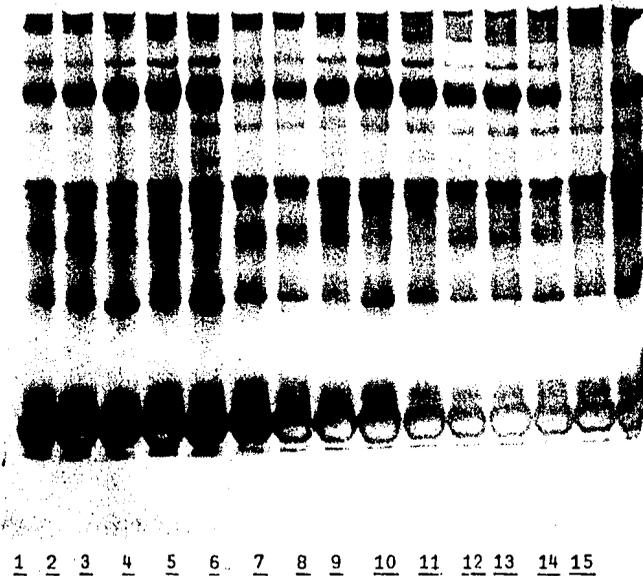


FIGURA # 19c

FIGURAS # 19b y 19c: Electroforesis en gel de acrilamida (7.5%) - pH 8.9 de los líquidos ascíticos. b) Carriles # 1-12: BKL 5. Carriles # 13-15: BKL 1. c) Carriles # 1-13: BKL 6. Carriles # 14 y 15: BKL 1.

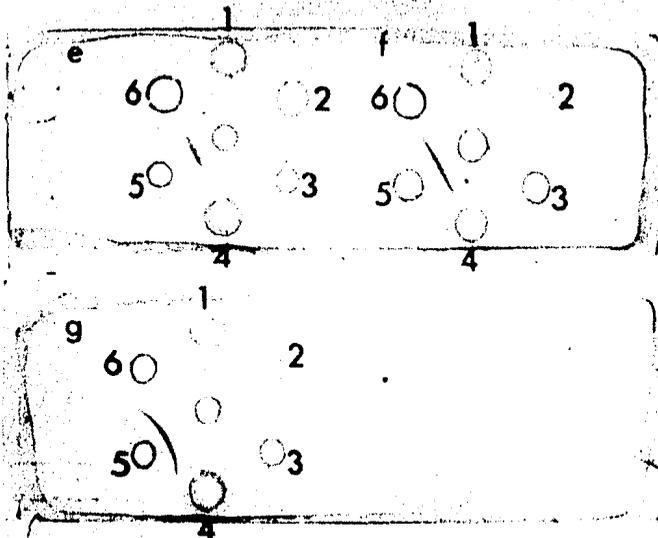
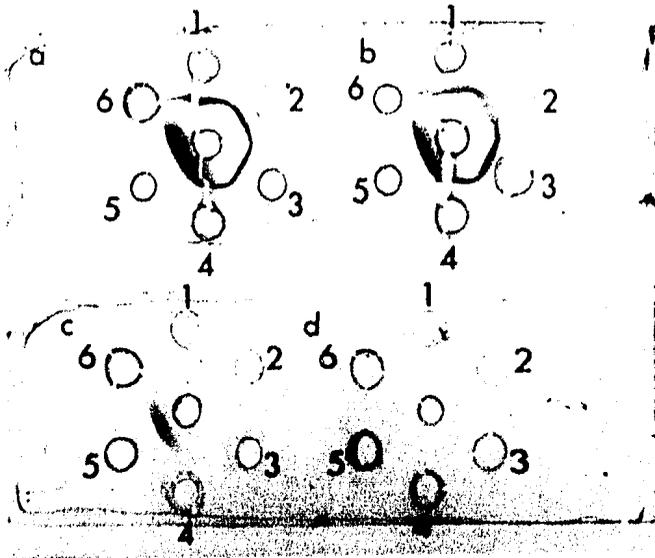


FIGURA # 20: Determinación de la clase de los anticuerpos monoclonales por inmunodifusión. Los pozos # 1, 2, 3, 4 contienen medio de cultivo concentrado con los anticuerpos BKL 1, 2, 5 y 6 respectivamente. Pozo # 5: suero normal de ratón. Pozo # 6: suero de caballo. Los pozos centrales con tienen los sueros: A) anti IgG. B) anti-IgG₁. C) anti-IgG₂. D) anti-IgG_{2a}. E) anti-IgG_{2b}. F) anti-IgA. G) anti-IgM.

Estos péptidos (UCB bioproducts, Bélgica) fueron cuantificados por análisis de aminoácidos y su pureza fué checada por cromatografía en capa fina.

En un principio se realizaron los ensayos de competencia utilizando sobrenadantes de medio de cultivo por la técnica de ELISA debido a su sencillez y a la facilidad de manejar un gran número de muestras. Los resultados de estos ensayos se muestran en las figuras # 21 y 22. Sin embargo, se observaron en el ensayo variaciones significativas en las unidades de absorbancia de un mismo control en diferentes placas y al tratar de reproducir los ensayos, encontramos diferencias en la mayoría de las curvas de inhibición. Esto se explicó por el hecho de que el grado de acoplamiento del antígeno en una placa podría ser diferente al presentado en otra. Esto podría implicar cierta variabilidad en los grados de inhibición causadas por los diversos péptidos hacia un mismo antígeno en diferentes experimentos y, de hecho, fué lo que se observó. Se ha reportado en la literatura cierto grado de desprendimiento del antígeno de la fase sólida, el cual es variable entre placas de poliestireno diferentes (62) por lo que es probable que esto haya también contribuido a obtener estos resultados. Por lo tanto, este ensayo no pudo ser usado de manera cuantitativa, pero interpretado cualitativamente se pudo observar que la parte 4-10 de la hormona era la reconocida por los anticuerpos y en un menor grado, la parte 1-3. Estos ensayos también nos indicaron que los anticuerpos sí podían reconocer LHRH- I^{125} , ya que la molécula de I^{125} se encuentra en el aminoácido # 5, el cual no es necesario para el reconocimiento de los anticuerpos.

Para obtener resultados cuantitativamente más exactos se usó el radioinmunoensayo para la caracterización de los anticuerpos, ya que es una técnica estandarizada y con una alta sensibilidad.

En primer lugar, se obtuvo la hormona marcada radioactivamente con I^{125} por el método de la cloramina T. La hormona marcada se purificó en una columna de exclusión molecular, obteniéndose principalmente hormona con un solo átomo de I^{125} , según las características de elución presentadas y de acuerdo a lo reportado en la literatura (63). Posteriormente se determinó la inmunoreactividad de la hormona marcada por reacción con un gran exceso de un anticuerpo policlonal, encontrándose un 80% de inmunoreactividad.

Los anticuerpos monoclonales presenten en el medio de cultivo de las 4 clonas se titularon para obtener la dilución que presentara la mitad del porcentaje de unión con la hormona marcada y en este mismo ensayo, se determinó la inmunoreactividad de esta última con los anticuerpos monoclonales, obteniéndose un 70%. Posteriormente, se realizaron los ensayos de competencia con los péptidos mencionados con anterioridad y las gráficas resultantes se-

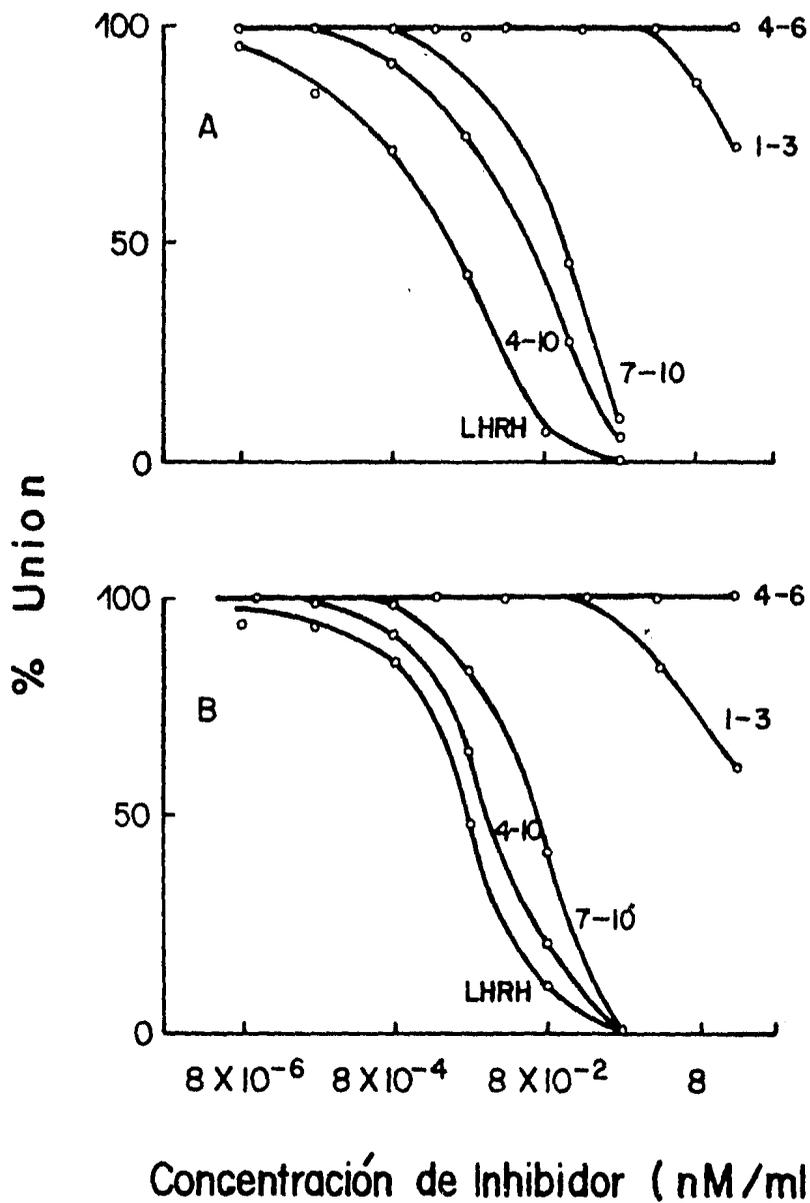
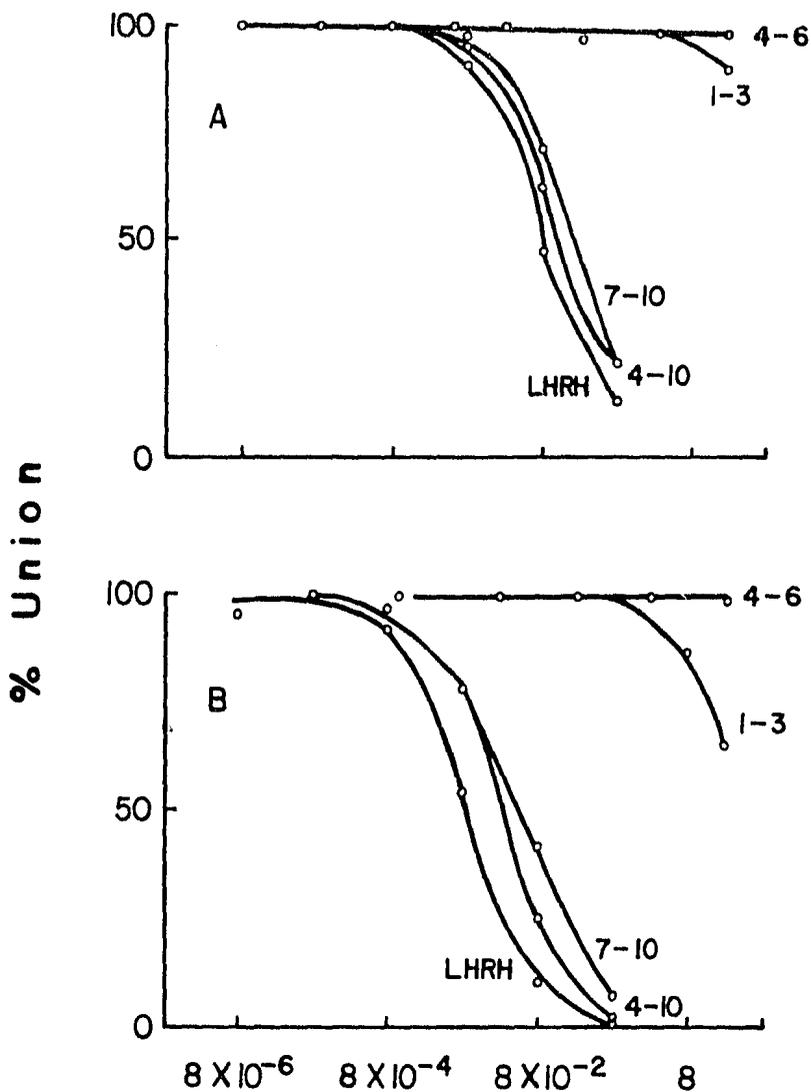


FIGURA / 21: Ensayo de competencia por ELISA. Se probó la inhibición producida por LHRH, 4-10 LHRH, 7-10 LHRH, 1-3 LHRH, 4-6 LHRH y LHRH-OH sobre la fijación de los anticuerpos a la fase sólida cubierta con Polilisina-LHRH. Gráfica superior: Anticuerpo BKL 1 (dilución final 1:500). Gráfica inferior: Anticuerpo BKL 2 (dilución final 1:2,000).



Concentración de Inhibidor (nM/ml)

FIGURA # 22: Ensayo de competencia por ELISA. Se probó la inhibición producida por LHRH, 4-10 LHRH, 7-10 LHRH, 1-3 LHRH, 4-6 LHRH y LHRH-OH sobre la fijación de los anticuerpos a la fase sólida cubierta con - Polilisina-LHRH. Gráfica superior: Anticuerpo BKL 5 (dilución final 1:200). Gráfica inferior: Anticuerpo BKL 6 (dilución final 1:500).

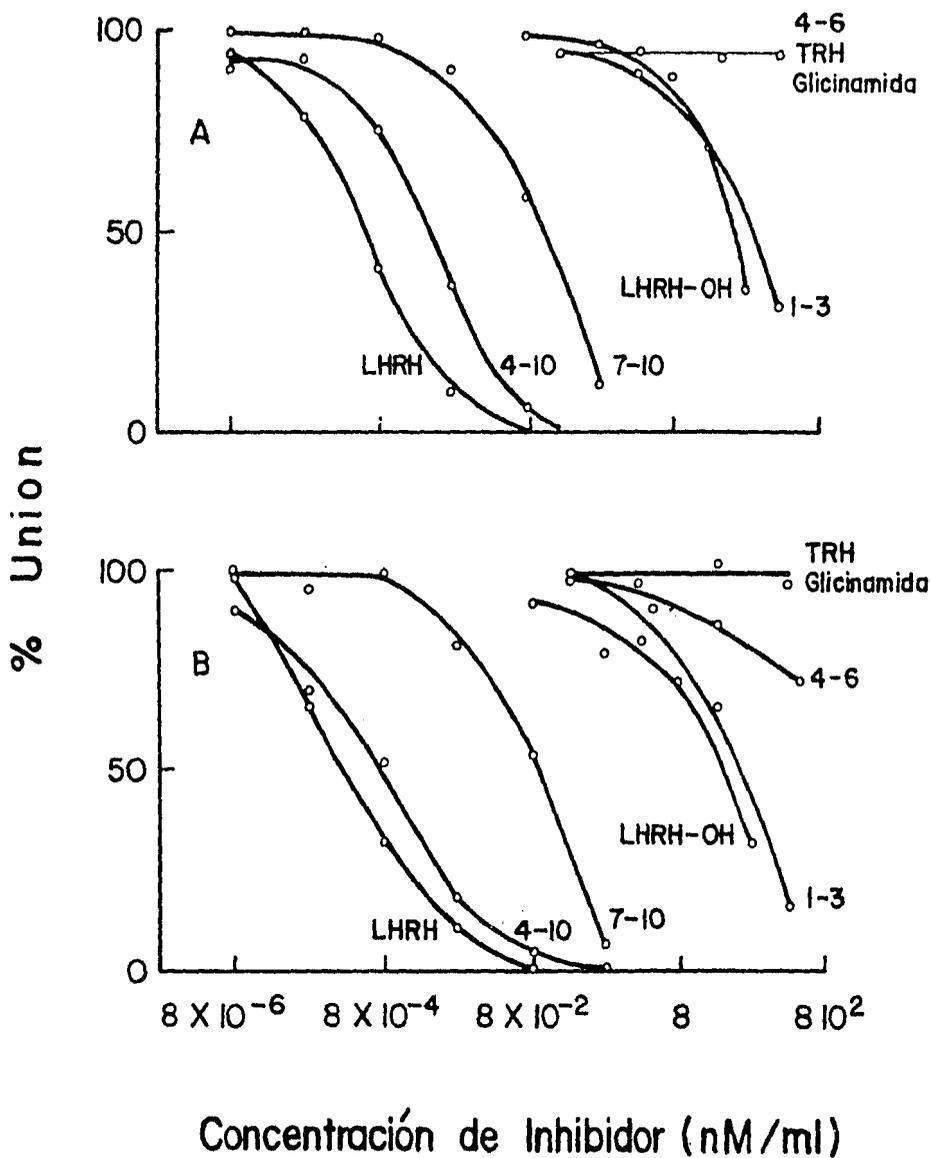


FIGURA # 23: Ensayo de competencia por RIA. Se determinó la inhibición producida por LHRH, 4-10 LHRH, 7-10 LHRH, 1-3 LHRH, 4-6 LHRH, LHRH-OH, TRH y Glicinamida sobre la unión de LHRH-¹²⁵I a los anticuerpos monoclonales. Gráfica superior: anticuerpo BKL 1 (dilución final 1:500). Gráfica inferior: anticuerpo BKL 2 (dilución final 1:2,000).

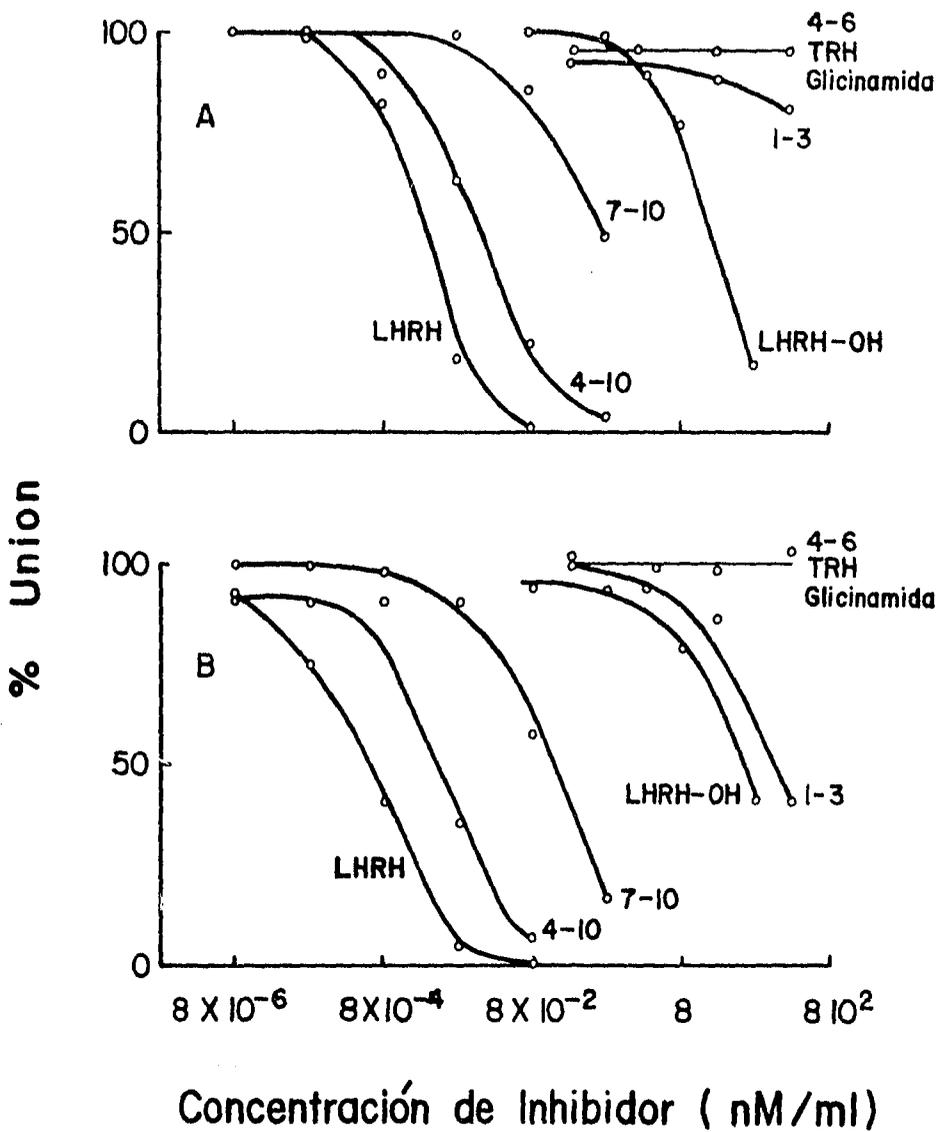


FIGURA # 24: Ensayo de competencia por RIA. Se determinó la inhibición producida por LHRH, 4-10 LHRH, 7-10 LHRH, 1-3 LHRH, 4-6 LHRH, LHRH-OH, TRH y Glicinamida sobre la unión de LHRH- I^{125} a los anticuerpos monoclonales. Gráfica superior: anticuerpo BKL 5 (dilución final 1:200). - Gráfica inferior: anticuerpo BKL 6 (dilución final 1:500).

demuestran en las figuras # 23 y 24. Podemos observar que el péptido 4-10 muestra una alta competencia con la hormona marcada para los 4 anticuerpos y de una manera semejante, pero en menor grado, el péptido 7-10. Al usar el péptido deamidado, LHRH-OH cuya única diferencia con la LHRH radica en la sustitución de la función amida por la función carboxi las curvas de inhibición se muestran muy afectadas, ya que se requieren concentraciones excesivamente grandes del péptido para inhibir.

Esto nos indica que los anticuerpos se encuentran dirigidos hacia la parte carboxiterminal de la molécula de LHRH. Sin embargo, al usar glicinamida, o TRH (piroGlu-His-Pro-NH₂) como competidores, no son capaces de inhibir la unión. Por otro lado, el péptido 1-3 presentó una inhibición a concentraciones muy grandes. El péptido 4-6 no pudo provocar inhibición, a excepción del anticuerpo BKL 2 pero de manera no significativa.

Así, las gráficas de inhibición obtenidas demuestran que los 4 anticuerpos monoclonales son iguales en cuanto al determinante antigénico reconocido, sin embargo, existen diferencias en el grado de reconocimiento hacia el antígeno y hacia otros péptidos, por lo cual, de las gráficas obtenidas se determinaron las concentraciones necesarias de cada péptido para obtener un 50% de inhibición de la unión con la hormona marcado, lo cual se observa en la tabla # 7.

PEPTIDOS	BKL 1	BKL 2	BKL 5	BKL 6
LHRH	5×10^{-10}	2.25×10^{-10}	25×10^{-10}	4.5×10^{-10}
4-10 LHRH	3.74×10^{-9}	1.06×10^{-9}	17×10^{-9}	4.8×10^{-9}
7-10 LHRH	12×10^{-8}	9×10^{-8}	71×10^{-8}	11×10^{-8}
1-3 LHRH	8.8×10^{-5}	5.04×10^{-5}	$>>25 \times 10^{-5}$	$15,9 \times 10^{-5}$
LHRH-OH	45×10^{-5}	25×10^{-5}	2.2×10^{-5}	45×10^{-5}
4-6 LHRH	$>>2.5 \times 10^{-4}$	$>>2.5 \times 10^{-4}$	$>>2.5 \times 10^{-4}$	$>>2.5 \times 10^{-4}$

Tabla # 7: Concentraciones de los competidores necesarias para provocar 50% de inhibición de la fijación específica de LHRH-I¹²⁵ (M).

Si bien los 4 anticuerpos presentan diferentes valores, las diferencias no son significativas entre los anticuerpos 1, 2 y 6 ya que al repetir los experimentos encontramos que se encuentran dentro de los límites del error experimental. Los 3 anticuerpos presentan valores muy similares para todos los péptidos, los cuales son diferentes para el anticuerpo BKL5. Para éste, se requieren concentraciones 10 veces mayores para la LHRH y los péptidos 4-10 y 7-10 para obtener el mismo grado de inhibición, lo cual nos indica que su afinidad hacia la LHRH es menor a la presentada por los otros 3 anticuerpos. De esta manera, podemos decir que el anticuerpo BKL5 es diferente a los otros 3.

El porcentaje de reactividad cruzada hacia los diferentes péptidos usados se muestra en la tabla # 8. Podemos observar que únicamente el péptido 4-10 presenta un porcentaje de reacción cruzada alta (10-20%).

PEPTIDOS	BKL 1	BKL 2	BKL 5	BKL 6
4-10 LHRH	13.3	21.2	14.7	9.3
7-10 LHRH	4.1×10^{-1}	2.5×10^{-1}	3.4×10^{-1}	4×10^{-1}
1-3 LHRH	5.6×10^{-4}	4.4×10^{-4}	$<<10^{-5}$	2.8×10^{-4}
LHRH-OH	1.1×10^{-3}	9×10^{-4}	1.1×10^{-2}	10^{-3}
4-6 LHRH	$<<2 \times 10^{-6}$	$<<9 \times 10^{-7}$	$<<10^{-5}$	$<<1.8 \times 10^{-6}$

Tabla # 8. Reacción cruzada de los anticuerpos monoclonales con diferentes fragmentos de la LHRH. La reacción cruzada se define como el cociente $\frac{[LHRH]}{[inhibidor]} \times 100$, en donde [LHRH] y [Inhibidor] son las concentraciones respectivas de LHRH y de los inhibidores necesarias para provocar 50% de inhibición en la unión de LHRH-I¹²⁵ al anticuerpo.

7.4 ELECTROFOCALIZACION

Para obtener una prueba mas de identidad entre los anticuerpos 1, 2 y 6 y de la no identidad de éstos con el anticuerpo BKL 5, se llevó a cabo una electrofocalización de éstos. Esto implicaba el uso de anticuerpos purificados, lo cual se llevó a cabo por precipitación de los anticuerpos presen

tes en las muestras de líquido ascítico y su posterior purificación en una columna de intercambio iónico. El perfil de elución de la columna se muestra en la figura # 25, en el cual, el anticuerpo eluye como un primer pico - después de comenzar a aplicar el gradiente de NaCl. La figura # 26 muestra una electroforesis en gel de acrilamida de los 4 anticuerpos ya purificados, en la cual se observa un alto grado de pureza, pero ninguna diferencia de movilidad electroforética entre ellos.

Posteriormente se llevó a cabo la electrofocalización y los resultados se observan en la figura # 27. Podemos observar que los anticuerpos BKL 1, 2 y 6 presentaron un pI igual y el anticuerpo BKL 5 presentó un pI ligeramente mayor. De esta manera se confirmó que el anticuerpo BKL 5 es diferente - a los otros, los cuales parecen idénticos, confirmando los resultados de los ensayos de competencia con fragmentos de la molécula de LHRH.

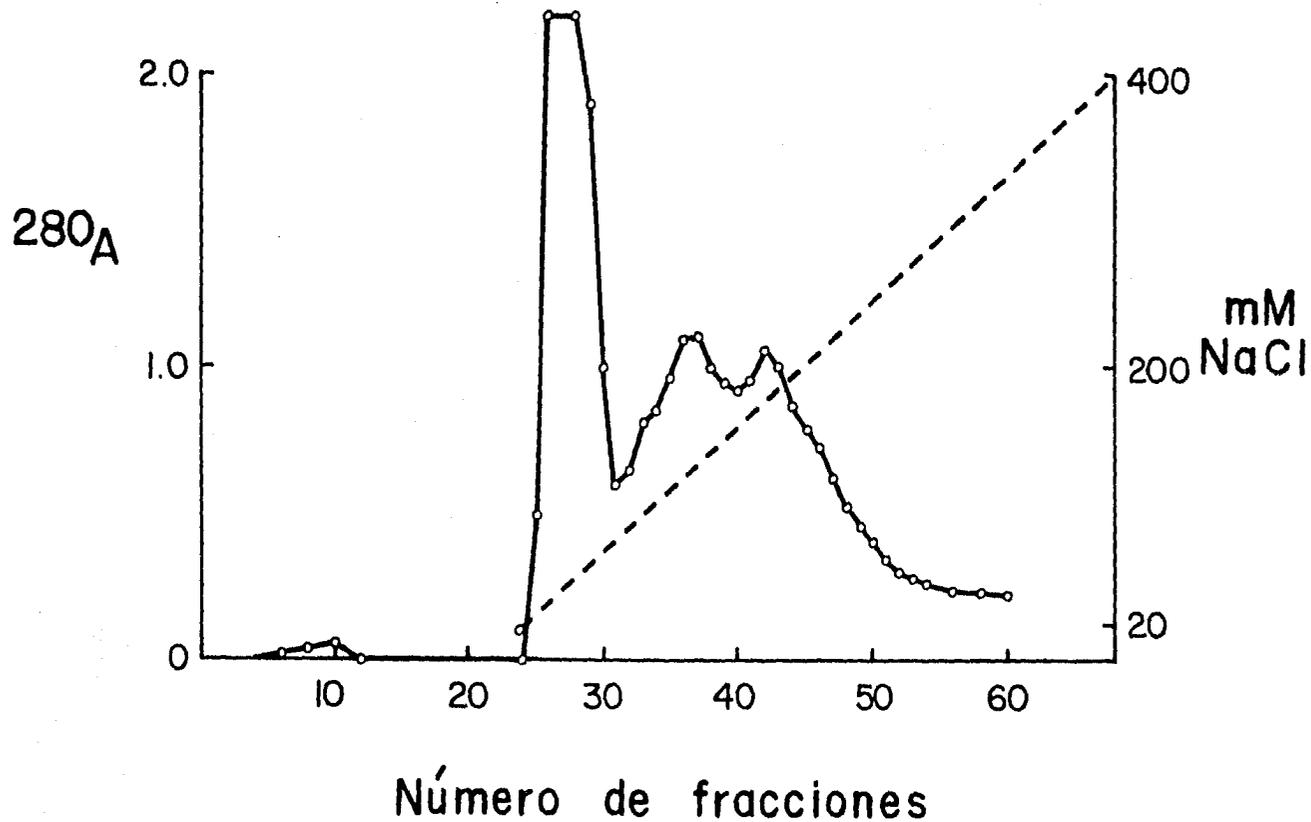
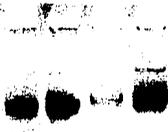


FIGURA # 25: Perfil de elución de la purificación del anticuerpo BKL 2 por cromatografía - de intercambio iónico en una columna de DEAE-Celulosa. El anticuerpo se aplicó a la columna equilibrada en Tris 20 mM + NaCl 20 mM a pH 7.8, y se eluyó con un gradiente de NaCl 20-400 mM. El flujo de la columna fué de 1-2 volúmenes de columna/hora durante 10 horas.



1 2 3 4

FIGURA # 26



1 2 3 4

FIGURA # 27

FIGURA # 26: Electroforesis en gel de acrilamida (7.5%) de los 4 - anticuerpos monoclonales después de haber sido purificados por cromatografía de intercambio iónico. Carril # 1: BKL 1. Carril # 2: BKL 2. Carril # 3: BKL 5. Carril # 4: BKL 6.

FIGURA # 27: Electrofocalización analítica en capa fina de gel de poliacrilamida (6.6%) pH 3-10. Carril # 1: BKL 1. Carril # 2: BKL 2. Carril # 3: BKL 5. Carril # 4: BKL 6.

V. DISCUSION DE RESULTADOS
Y CONCLUSIONES

1. PRODUCCION DE HIBRIDOMAS

La obtención de clonas de hibridomas productoras de anticuerpos monoclonales hacia un antígeno deseado es dependiente del número de linfocitos sensibilizados en el bazo del animal utilizado. Mientras éste número sea mayor, la probabilidad de obtener un hibridoma productor del anticuerpo deseado se incrementará. A su vez, el número de linfocitos sensibilizados depende de la respuesta inmune del animal hacia el antígeno particular, por lo cual, se trató de optimizar la respuesta inmune hacia LHRH antes de comenzar los experimentos de fusión, tomando en cuenta los diversos parámetros que influyen sobre ésta, como el tipo de antígeno (peso molecular, ser extraño al animal), su modo de presentación, el esquema de inmunización y las características genéticas del animal.

Para la obtención de anticuerpos monoclonales contra la LHRH, el primer paso fué la conjugación de ésta a proteínas acarreadoras. Esto se hizo debido a su bajo peso molecular y para que pudiera ser reconocida por los animales como antígeno, ya que esta hormona se encuentra presente en estos animales. Se usaron 2 proteínas acarreadoras, la albúmina sérica bovina y la tiroglobulina, con el fin de comparar la respuesta de los animales y con el mismo objetivo, se usaron 3 diferentes cepas de ratones.

Los conjugados utilizados provocaron diversas respuestas inmunes. Así, el conjugado con tiroglobulina provocó una respuesta bastante homogénea entre las 3 cepas utilizadas y entre los diferentes ratones de una misma cepa, a diferencia del conjugado de albúmina, que provocó una respuesta baja en la mayoría de los ratones de las diferentes cepas, lo cual concuerda con lo reportado en la literatura (64) y puede explicarse por el hecho de que la tiroglobulina es una proteína con un peso molecular 10 veces mayor al de la albúmina y contiene un mayor número de moléculas de LHRH unida a ella. Aún cuan

do el conjugado haya influido notablemente en la calidad de la respuesta inmune, el esquema de inmunización lo hizo igualmente ya que la hiperinmunización permitió una mejor estimulación de las células.

El porcentaje de hibridomas secretores de anticuerpos anti-LHRH fué bajo (0.2%). Estos resultados eran esperados puesto que el antígeno usado es un hapteno y la respuesta inmune obtenida es menor a la que se puede obtener hacia un antígeno grande como una proteína o una célula. Las células de bazo sensibilizadas con el conjugado de albúmina no dieron lugar a hibridoma productor alguno y las 4 clonas productoras de anticuerpos monoclonales obtenidas fueron derivadas de células de bazo sensibilizadas con el conjugado de tiroglobulina, lo cual nos indica que hubo una mayor cantidad de células sensibilizadas presentes en el bazo, aún cuando los 2 ratones utilizados presentaron un alto título de anticuerpos en ELISA. La única diferencia entre ambos consistió en la heterogeneidad de la respuesta inmune de los ratones inoculados con el conjugado de albúmina frente a la buena respuesta que presentaron los ratones inoculados con tiroglobulina.

En la fusión celular realizada se probaron 2 tipos de PEG. En nuestro trabajo, usamos un PEG de peso molecular 4,000 y uno de 3,350, los cuales no mostraron diferencias significativas en el porcentaje de hibridomas producidos.

De una manera similar, se probó la influencia de la utilización de células sensibilizadas congeladas sobre el rendimiento de hibridomas, no encontrándose diferencia alguna, ya que se obtuvo un porcentaje muy semejante al utilizar células de bazo recién obtenidas. Estos resultados son importantes ya que en un futuro, al tratar de realizar experimentos de fusión, se puede llevar a cabo una pequeña fusión con una parte de las células, y en base a los resultados obtenidos se procedería a fusionar o no las células congeladas posteriormente, ya que de esta manera se ahorraría tiempo, trabajo y material.

2. CARACTERIZACION DE LOS ANTICUERPOS

El uso de anticuerpos dirigidos contra la LHRH es de gran importancia dentro del campo de la neuroendocrinología, ya que a través de éstos es como se ha podido estudiar a esta hormona, ya sea para conocer su localización por inmunocitoquímica, para detectarla en diversos tejidos o para estudiar su biosíntesis. Desde el descubrimiento de su secuencia, se han obtenido y caracterizado una gran cantidad de sueros anti-LHRH (57,64,65,66,67) pero el ser de origen policlonal lleva ciertos riesgos de reactividad cruzada con una

gran variedad de péptidos o análogos de la hormona.

Los ensayos de competencia llevados a cabo por la técnica de radioinmunoensayo demostraron que los 4 anticuerpos se encuentran dirigidos hacia la parte carboxiterminal de la molécula, ya que el péptido 4-10 presentó una alta inhibición y, en un menor grado, el péptido 7-10. El residuo glicinamida es esencial para el reconocimiento de los anticuerpos, ya que al usar el péptido LHRH-OH, el porcentaje de reacción cruzada se ve disminuido notablemente, sin embargo, ni el aminoácido glicinamida por sí solo ni la hormona - TRH, cuyo último aminoácido es prolinamida, provocaron inhibición. Parece que el residuo glicinamida necesita formar parte de la LHRH y adoptar cierta conformación para ser reconocido. El hecho de que el péptido 1-3 sea capaz de provocar una ligera inhibición y de que el residuo 4-10 provoque una inhibición un poco menor que la observada con la LHRH, nos indica que en realidad los anticuerpos requieren de ambos extremos para reconocer de manera óptima la hormona. Se ha propuesto que la estructura tridimensional más estable de la molécula de LHRH en solución es aquella en la que sus extremos carboxi y amino terminales se encuentran en gran proximidad, adoptando una conformación semejante a una herradura, como se puede observar en la figura # 28 (68).

Ahora bien, como anteriormente se mencionó, se han descrito un gran número de sueros policlonales contra la hormona y la mayoría de ellos han sido perfectamente caracterizados. En estos estudios se ha visto que el sitio de acoplamiento de la hormona a la proteína acarreadora usada para inmunizar influye notablemente sobre la especificidad de los anticuerpos obtenidos, obteniéndose la respuesta dirigida hacia la parte más distal. Al conjugar en la parte carboxiterminal, los anticuerpos se dirigen principalmente hacia la parte amino terminal y viceversa (67), por lo cual nosotros esperábamos, al conjugarla en el aminoácido #5 una respuesta hacia los extremos. No obstante, en el caso de los anticuerpos policlonales descritos, aunque se observa que la mayoría de los péptidos que presentan una alta reacción cruzada forman parte de una región específica de la hormona, se observan reacciones cruzadas menores con péptidos que constituyen una región diferente de la hormona. Esto es de esperarse, ya que son sueros policlonales, constituidos por una gran variedad de anticuerpos.

Si bien los anticuerpos monoclonales son homogéneos, su especificidad es relativa. Podemos observar que los obtenidos por nosotros tienen cierto grado de reacción cruzada con algunos péptidos. Esto es de suma importancia al tratar de usarlos en la detección de la hormona en extractos hipotalámicos. Aun cuando no se sabe a ciencia cierta como se lleva a cabo la degrada

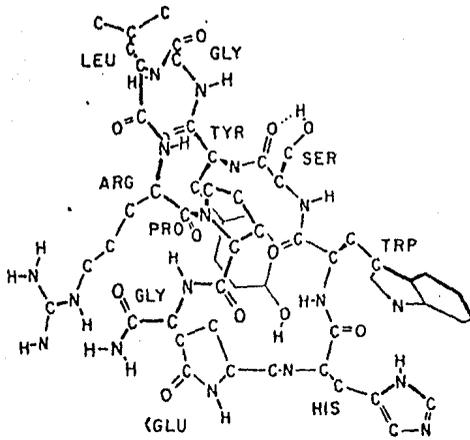
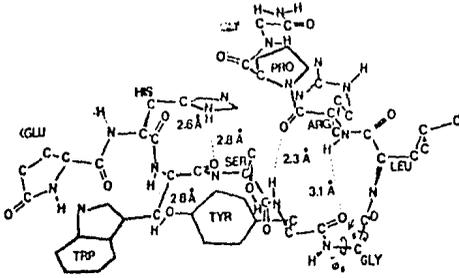


FIGURA # 28: Conformaciones energéticamente mas estables de la LHRH, propuestas por Momany, F.A. (68).

ción de la hormona, se ha visto in vitro, que ciertas enzimas presentes en el hipotálamo rompen el enlace 5-6 de la molécula dando como resultado los péptidos 1-5 y 6-10 (69,70). También se ha demostrado in vitro que la enzima convertidora de la angiotensina I (ACL) degrada a la hormona dando como resultado principalmente los péptidos 4-10 y 1-3 (71). Si esto se lleva a cabo in vivo y éstos péptidos se encuentran presentes, los anticuerpos darán una reacción cruzada con algunos de ellos, sobre todo el 4-10.

Se llevó a cabo una electrofocalización de los anticuerpos ya purificados. Esta es una técnica muy sensible que permite distinguir 2 proteínas que difieran entre 1 o 2 aminoácidos con cargas diferentes. Así, observamos que los anticuerpos BKL 1, 2 y 6 son iguales estructuralmente, o por lo menos, cargados de igual manera, ya que presentaron un punto de migración igual mientras que el anticuerpo BKL 5 es ligeramente diferente, ya que presentó un pI un poco mayor. Por esto, pensamos que la diferencia debe ser entre 1 o 2 aminoácidos.

Con el fin de conocer la cadena donde se encuentra la diferencia de cargas, el siguiente paso sería realizar una separación en 2 dimensiones, es to es, separar primero los anticuerpos disociados en cadenas pesadas y ligeras por una electrofocalización y posteriormente llevar a cabo una electroforesis en gel desnaturizante en presencia de SDS, lo cual nos daría una mayor información sobre la diferencia de los anticuerpos. Para obtener una prueba absoluta de la identidad entre los anticuerpos 1, 2 y 6 y para conocer la diferencia exacta con el anticuerpo 5 se necesitaría llevar a cabo la secuenciación de las cadenas. Cualquiera que sea ésta, pensamos que la diferencia del o de los aminoácidos se encuentran en o muy cerca del sitio activo del anticuerpo, ya que se observa afectado el reconocimiento hacia el antígeno.

Mientras este trabajo se estaba llevando a cabo aparecieron en la literatura reportes de 2 grupos que obtuvieron anticuerpos monoclonales contra la LHRH (72,73). Los resultados reportados son muy similares a los obtenidos por nosotros en cuanto a especificidad de los anticuerpos se refiere; ambos grupos reportan anticuerpos dirigidos hacia la parte carboxiterminal. No obstante, las diferencias radican tanto en la afinidad de los anticuerpos como en el número de clonas obtenidas. Knapp et al. (72) reportan 2 clonaproductoras obtenidas de 2 experimentos de fusión, los cuales secretan anticuerpos idénticos con una afinidad menor a la obtenida por nosotros, ya que ellos reportan una concentración de 12.04×10^{-10} M de LHRH para provocar un 50% de inhibición de la unión en radioinmunoensayo. Pensamos que ambos anticuerpos pudieron provenir de una misma célula fusionada, debido a que después

de realizar la fusión incubaron la mezcla por 4 días, congelaron y después distribuyeron en los pozos de cultivo. Pensamos que este tiempo es suficiente para que la célula fusionada se expandiera y diera como resultado las 2-clonas. Si bien nuestros anticuerpos son iguales, a excepción del 5, éstos se originaron de células diferentes, pero probablemente derivadas de la misma clona de linfocitos.

El otro grupo (73) que reportó la obtención de anticuerpos monoclonales hacia la hormona reporta un anticuerpo cuya afinidad es 300 veces mayor a la obtenida con nuestros anticuerpos, pero la especificidad es semejante.

En conclusión, en este trabajo fué posible obtener 4 clonas productoras de anticuerpos monoclonales contra LHRH, todos dirigidos hacia la parte carboxiterminal de la molécula. Estos anticuerpos, utilizados en diferentes técnicas inmunoquímicas como RIA, histoquímica, inmunoprecipitación de productos de traducción in vitro, y otras, permitirán obtener una mayor información sobre la biosíntesis, regulación y función de la LHRH.

VI. BIBLIOGRAFIA

1. Johnson, M. and Everett, B. (1983). ESSENTIAL REPRODUCTION. Blackwell Scientific Publications, Great Britain. Pags. 99-141.
2. Guillemin, R. (1980). Hypothalamic hormones: releasing and inhibiting factors. In: NEUROENDOCRINOLOGY. D.T. Krieger and J.C. Hughes eds. - Sinauer Associates, Inc., Massachusetts. Pags. 23-32.
3. Schally, A.V., Nair, R.M.G., Redding, T.W., Arimura, A. (1971). Isolation of the Luteinizing hormone and Follicle stimulating hormone-releasing hormone from porcine hypothalami. J. Biol. Chem. 246: 7230.
4. Knigge, K.M., Joseph, S.A. and Hoffman, G.F. (1978). Organization of LRF and SRIF-neurons in the endocrine hypothalamus. In: THE HYPOTHALAMUS. Reichlin, S., Baldessarini, R.J. and Martin, J.B. eds. Raven Press, New York Pags 46-67
5. Lee, J. and Laycock, J. (1978). ESSENTIAL ENDOCRINOLOGY. Oxford Univ. Press, Great Britain.
6. Adams, T.E., Nett, T.M. (1979). Interaction of GnRH with anterior pituitary. Role of divalent cations, microtubules and microfilaments in the GnRH activated gonadotrop. Biol. Reprod. 21: 1076.

7. Wayne Bardin, C. (1980). The neuroendocrinology of male reproduction. In: NEUROENDOCRINOLOGY. D.T. Krieger and J.C. Hughes, eds. Sinauer Associates, Inc., Massachusetts. Pags. 239-247.
8. Martin, J.B., Reichlin, S. and Brown C.M. (1977). CLINICAL NEUROENDOCRINOLOGY. F. Davis Co. Philadelphia, pags 96-109.
9. Yen C., S. (1980). Neuroendocrine regulation of the menstrual cycle. In: NEUROENDOCRINOLOGY. D.T. Krieger and J.C. Hughes, eds. Sinauer Associates, Inc., Massachusetts, pags. 259-271.
10. McEwen, B.S. (1980). The brain as a target organ of endocrine hormones. In: NEUROENDOCRINOLOGY. D.T. Krieger and J.C. Hughes, eds. Sinauer Associates, Inc. pags. 33-42.
11. Giguere, V., Lefebvre, F.A., and Labrie, F. (1981). Androgens decrease LHRH-binding sites in rat pituitary cells in cultures. Endocrinology 108: 350.
12. Guillemin, R. (1978). Peptides in the brain: the new endocrinology - of the neuron. Science 202: 390.
13. Dutlow, C.M. and Millar, R.P. (1981). rat testis immunoreactive - LHRH differs structurally from hypothalamic LHRH. Biochem. Biophys. Res. Commun. 101 (2): 486.
14. Clayton, R.N., Harwood, J.P. and Cat, K.J. (1979). Gonadotropin releasing hormone analogue binds to luteal cells and inhibits progesterone - production. Nature 282: 90.
15. Lee, J.N., Sepala, M. and Chard, T. (1981). Characterization of placental luteinizing hormone-releasing factor like material. Acta Endocrinol. 96: 394.
16. Kastin, A.J., Miller, L.H., Sandman, C.A., Schally, A.V. and Plotnikoff, N.P. (1977). CNS and pituitary effects of hypothalamic peptides and MSH. In: YOU DIN M.B.H. ESSAYS IN NEUROCHEMISTRY AND NEUROPHARMACOLOGY 1. London, pags. 139-176.

17. Jutisz, M., Connis, R. and Corbani, M. (1983). Biosynthesis of gonadotropin releasing hormone: present status. *Psychoneuroendocrinol.* 8 (3): 251.
18. Kurahashi, K. (1974). Biosynthesis of small peptides. *Ann. Rev. Biochem.* 43:445.
19. Marx, J.L. (1983). Synthesizing the opioid peptides. *Science* 220: 395.
20. Fawcett, C.P. and Beezley, E.A. (1974). Detection of a second form of luteinizing hormone releasing factor. *IRCS Med. Sci. Biochem.* 2: 1663.
21. Millar, R.P., Wegener, I. and Schally, A.V. (1981). Putative prohormonal luteinizing hormone releasing hormone. In: *NEUROPEPTIDES: BIOCHEMICAL AND PHYSIOLOGICAL STUDIES*. Churchill Livingstone, Great Britain, pages. 111-130.
22. Millar, R.P., Aehnelt, C. and Rossier, G. (1977). High molecular weight immunoreactive species of LHRH: possible precursor of the hormone. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 74 (2): 720.
23. McKelvy, J. and Epelbaun, J. (1978). Biosynthesis, packaging, transport and release of brain peptides. In: *THE HYPOTHALAMUS*. Reischlin, S. - Baldessarini, R.J. and Martin, J.B. ed. Raven Press, New York, pages. 195-212.
24. Curtis, A. and Fink, G. (1983). A high molecular weight precursor of LHRH from rat hypothalamus. *Endocrinology* 112: 390.
25. Cohen, S., Charli, J.L., Díaz de León, L., Millar, R.P., Arimura, A., Morrison, M.R. and Joseph-Bravo, P. (1985). Attempts to immunoprecipitate the LHRH precursor synthesized in cell free systems. Submitted: *Brain Res. Bull.*
26. Seeburg, P.H. and Adelman, J.P. (1984) Characterization of cDNA for precursor of human luteinizing hormone-releasing hormone. *Nature* 211: 666.
27. Phillips, H.S., Níkolics, K., Branton, D. and Seeburg, P.H. (1985). Immunocytochemical localization in rat brain of a prolactin-inhibiting sequence of Gonadotropin-releasing hormone prohormone. *Nature* 316: 542.

28. Nikolics, K., Mason, A.J., Azonyi, E., Ramachandran, J. and Seeburg, P. (1985). A prolactin-inhibiting factor within the precursor for human Gonadotropin-releasing hormone. *Nature* 316: 511.
29. Hood, L.E., Weissman, J.L., Wood, W.B. and Wilson, J.N. (1984). *IMMUNOLOGY*. The Benjamin/Cummings Publishing Company, Inc. USA, pags. 81-111.
30. Jeske, D.J. and Capra, J.D. (1984). Immunoglobulins: structure and function. In: *FUNDAMENTAL IMMUNOLOGY*. Paul, W.E. ed. Raven Press, New - York, pags. 131-166.
31. Gearhart, P.J. (1982). Generation of immunoglobulin variable gene - diversity. *Immunol. Today* 3(4): 107.
32. Robertson, M. (1982). Gene rearrangement and the generation of diversity. *Nature* 297: 184.
33. Honjo, T. (1982). The molecular mechanism of the immunoglobulin class switch. *Immunol. Today* 3(8): 214.
34. Yelton, D.E. and Scharff, M.D. (1981). Monoclonal antibodies: a powerful new tool in biology and medicine. *Ann. Rev. Biochem.* 50: 657.
35. Cohn, M. (1967). Natural history of the myeloma. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 32: 211.
36. Scharff, M.D., Roberts, S. and Thammana, P. (1981). Monoclonal antibodies. *J. Inf. Dis.* 243(3): 346.
37. Kohler, G. and Milstein, C. (1975). Continuous cultures of fused - cells secreting antibodies of predefined specificity. *Nature* 256: 495.
38. Goding, J.W. (1980). Antibody production by hybridomas. *J. Immunol. Meth.* 39: 287.
39. Sthali, C., Stachelin, T., Miggiano, V., Schmidt, J. and Haring, P. (1980). High frequencies of antigen-specific hybridomas: dependence of immunization parameters and prediction by spleen cells analysis. *J. Immunol. Meth.* 32: 297.

40. Fazekas de St. Groth, S. and Schneidegger, D. (1980). Production of monoclonal antibodies: strategy and tactics. *J. Immunol. Meth.* 35: 1.
41. Knutton, S. and Pasternak, C.A. (1979). The mechanism of cell-cell fusion. *Trends. Biochem. Sci.* 4:220.
42. Franssen, J.D., Hérlion, P. and Urbain, J. (1981). Selection of myeloma lines suitable for hybridoma. *Proc. of the Biological Fluids*, XXIX, 645.
43. Sinkovics, J.G. and Dressman, G.R. (1983). Monoclonal antibodies of hybridomas. *Rev. Inf. Dis.* 5 (1): 9.
44. Littlefield, J.W. (1964). Selection of hybrids from matings of fibroblasts in vitro and their presumed recombinants. *Science* 145: 709.
45. Lehninger, A. (1981). *BIOQUIMICA*. Ed. Omega, 2a. ed. España. pag. 749.
46. Milstein, C. (1982). Monoclonal antibodies from hybrid myelomas. *Proc. Roy. Soc. Lond.* 211: 393,
47. Soos, M. and Siddle, K. (1982). Characterization of monoclonal antibodies directed against human thyroid stimulating hormone. *J. Immunol. Meth.* 51: 57.
48. Ehrlich, P.H., Moyle, W.R., Moustafa, Z.A. and Canfield, R. (1982). Mixing 2 monoclonal antibodies yields enhanced affinity for antigen. *J. Immunol.* 128:(6): 2709.
49. Abrams, P.G., Knost, J.A. and Clarke, G. (1983). Determination of the optimal human cell lines for development of human hybridomas. *J. Immunol.* 131 (2): 1201.
50. Teng, N.H., Lam., K.S., Calvo Riera, F. and Kaplan, H.S. (1983). Construction and testing of mouse-human heteromyelomas for human monoclonal antibodies production. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80: 7308.
51. Sevier, E.D., David, G.S., Martinis, J., Desmond, W.J., Bartholomew, R.M. and Wang, R. (1981). Monoclonal antibodies in clinical immunology. *Clin. Chem.* 27 (11): 1797.

52. Springer, T. (1981). Monoclonal antibody analysis of complex biological systems. *J. Biol. Chem.* 256 (8): 3833.
53. Eisenbarth, G.S. (1981). Application of monoclonal antibody techniques to biochemical research. *Anal. Biochem.* 111: 1.
54. Stainer, N.A. and Lew, A.M. (1980). Whither monoclonal antibodies? *Immunology* 40: 287.
55. Levy, R., Miller, R.A. (1983). Biological and clinical implications of lymphocyte hybridomas: tumor therapy with monoclonal antibodies. *Ann. Rev. Med.* 34: 107.
56. Jackson, I., Baldessarini, R.J., Martin, J.B. (1978). Extrahypothalamic and phylogenetic distribution of hypothalamic peptides. In: *THE HYPOTHALAMUS*. Sc. Reichlin ed. Raven Press, N.Y. pages 217-232.
57. Koch, Y., Wilchek, M., Fridkin, M., Chobsieng, P., Zor, U. and Lindner, H.R. (1973). Production and characterization of an antiserum to synthetic gonadotropin-releasing hormone. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 55 (3): 616.
58. Bauminger, S. and Wilchek, M. (1980). The use of carbodiimides in the preparation of immunizing conjugates. *Meth. Enzymol.* 70: 151.
59. Kekwick, R.A. and Cannan, R.K. (1935). The hydrogen ion dissociation curve of the crystalline albumin of the hen's egg. *Biochem. J.* 30: 227.
60. Lane, R.D. Crissman, R.S. and Lachman, M.F. (1984). Comparisons of polyethylene glycols as fusogens for producing lymphocyte-myeloma hybrids. *J. Immunol. Meth.* 72: 71.
61. Reisner, A.H., Nemes, P. and Bucholz, C. (1975). The use of Coomassie Brilliant blue G250 Perchloric acid solution for staining in electrophoresis and isoelectric focusing on polyacrylamide gels. *Anal. Biochem.* 64: 509.
62. Lehtonen, O.P. and Viljanen, M.K. (1980). Antigen attachment in ELISA. *J. Immunol. Meth.* 34: 61.
63. Copeland, K.C., Aubert, M.L. Rivier, J. and Sizonenko, P.C. (1979).

Luteinizing hormone-releasing hormone: sequential versus conformational specificity of antiluteinizing hormone-releasing hormone sera. *Endocrinology* 104 (5): 1504.

64. Arimura, A., Sato, H., Kumasaka, T., Worobec, R.b., Debeljuk, L., Dunn, J. and Schally, A.V. (1973). Production of antiserum to LH-releasing hormone associated with gonadal atrophy in rabbits: development of radioimmunoassays for LHRH. *Endocrinology* 93 (5): 1092.

65. Nett, T.M., Akbar, A.M., Niswender, G.D. Hedbund, M.T. and White, W.F. (1973). A radioimmunoassay for gonadotropin-releasing hormone (Gn-RH) in serum. *J. Clin. End. and Med.* 36 (5): 880.

66. Arimura, A., Sato, H., Coy, D.H., Werobec, R., Schally, A.V., Yanaihara, N., Hashimoto, T., Yanaihara, C. and Sukura, N. (1975). The antigenic determinant of the luteinizing hormone-releasing hormone for 3 different antisera. *Acta Endocrinol.* 78: 222.

67. Fraser, H.M., Gunn, A., Jeffcoate, S. and Holland, D.T. (1974). Preparation of antisera to LHRH. *J. Endocrinol.* 61: ix.

68. Momany, F.A. (1976). Conformational energy analysis of the molecule luteinizing hormone-releasing hormone. I. Native decapeptide. *J. Am. Chem. Soc.* 98: 2990.

69. Davis, J.P., Krause, J.E. and McKelvy, J.F. (1982). LHRH peptidase activities in the female rat: characterization by an assay based on high performance liquid chromatography. *Anal. Biochem.* 125: 41.

70. Horsthemke, B. and Bauer, K. (1982). Substrate specificity of an adenohypophyseal endopeptidase capable of hydrolyzing LHRH: preferential cleavage of peptide bonds involving the carboxyl terminus of hydrophobic and basic aminoacids. *Biochem.* 21: 1033.

71. Skidgel, R.A., Erdos, E.G. (1985). Novel activity of human angiotensin I converting enzyme: release of the NH₂- and COOH- terminal tripeptides - from thw LHRH. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA,* 82: 1025.

72. Knapp, R.J. and Sternberger, L.A. (1984). High affinity monoclonal antibodies to luteinizing hormone-releasing hormone. *J. Neuroimmunol.* 6: 361.

73. Talwar, G.P., Gupta, S.K., Singh, V., Sahal, D., Iyer, K.S.N. and Singh, O. (1985). Bioeffective monoclonal antibody against the decapeptide gonadotrophin-releasing hormone: reacting determinant and action on ovulation and estrus suppression. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82: 1228.