2

Universidad Nacional Autónoma de México

Unidad Académica de los Ciclos Profesional
y de Posgrado del C. C. H.

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMEDICAS

OBTENCION DE ANTICUERPOS MONOCLONALES EN CONTRA DE TOXINAS DEL VENENO DEL ALACRAN *Centruroides noxius*.

T E S I S

Que para obtener el Título de
Licenciada en Investigación Biomédica Básica
P r e s e n t a

VERONICA FRANCES COLOMER GOULD

1984

Universidad Nacional Autónoma de México
UNAM
Biblioteca Central
Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

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.

ABREVIACIONES

ACF	Adyuvante Completo de Freund
AIF	Adyuvante Incompleto de Freund
BSA	Albúmina de suero de bovino
CNBr	Bromuro de cianógeno
C. noxius	*Centruroides noxius*
cpm	Cuentas por minuto
DID	Dobleinmunodifusión
DL_{50}	Dosis letal media
DMEM	Medio esencial de cultivo, Dulbeco modificado (Gibco)
FII	Fracción II del veneno del alacrán *Centruroides noxius*
HAT	Hipoxantina, adenina, timidina
HT	Hipoxantina, timidina
^{125}I	^{125}Iodo
IODOGEN	1,3,4,6 tetracloruro-3a,6a-difenilglicourilo
i.p.	Intraperitoneal
i.v.	Intravenoso
PBS	Solución salina amortiguada con fosfatos
PEG	Polietilenglicol
Proteína A	Proteína de superficie de *Staphilococus aureus*, con afinidad para la porción Fc de las inmunoglobulinas
p/v	Peso a volumen
PVC	Placas de 96 pozos de cloruro de polivinilo
RIE	Radioinmunoensayo
rpm	Revoluciones por minuto

SDS	Sulfato dodecil de sodio
TWEEN	Tween 80 (Arnend Drug and Chemical Co.)
v/v	Volumen a volumen

INDICE

I. RESUMEN 1

II. ANTECEDENTES 2

A. Hibridomas

1. Introducción

2. Fusión Celular: Agentes y Mecanismos

3. Métodos de Selección de Híbridos

4. Producción de Hibridomas

5. Aplicación de los Anticuerpos Monoclonales

B. Anticuerpos Monoclonales en contra de Toxinas de Alacrán 22

1. Introducción

a) Generalidades sobre alacranes (Centruroides):

i) Taxonomía y distribución geográfica

b) Picadura de alacrán:

i) Importancia clínica en México

ii) Sintomatología general y DL_{50}

c) Veneno de alacrán:

i) Importancia de su estudio

ii) Composición: toxinas

d) Veneno del aclacrán C. noxius

i) Composición: toxinas

2. Perspectivas

III. MATERIAL Y METODOS

A. Preparación de Toxoide 33

B. Montaje de Métodos de Detección de Hibridomas 33

1. Hemaglutinación

2. Radioinmunoensayo en Fase Sólida

a) Preparación de reactivos

i) Acoplamiento de FII a discos de celulosa
ii) Anticuerpos murinos a FII
iii) Obtención de inmunoglobulinas de ratón
iv) Producción y purificación de anticuerpos de conejo a inmunoglobulinas murinas
v) Iodación de anticuerpos de conejo a inmunoglobulinas de ratón (cloramina-T)

b) Procedimiento

C. Producción de Hibridomas 39

1. Hibridización

a) Preparación de reactivos

i) Células de bazo
ii) Células de mieloma
iii) Células alimentadoras

b) Procedimiento

2. Selección de Híbridos

3. Selección de Híbridomas

4. Clonación de los Híbridomas

IV. RESULTADOS

A. Optimización del RIE en Fase sólida 44

1. Acoplamiento de la FII a la Fase Sólida

2. Primer Anticuerpo: Anticuerpos de Ratón a FII

3. ^{125}I Segundo Anticuerpo: Anticuerpos de Conejo a Inmunoglobulinas de Ratón

4. Reacción Inespecífica

B. Optimización de la Producción de Híbridomas 49

1. Obtención de Anticuerpos Monoclonales

2. Eritrocitos de Carnero

C. Obtención de Anticuerpos Monoclonales a la Fracción II del Veneno del Alacrán *C. noxius* 50

V. DISCUSION

A. RIE en Fase sólida 55

B. Producción de Híbridos e Hibridomas 52

VI. CONCLUSION 57

VII. BIBLIOGRAFIA 85

RESUMEN

Los objetivos en este trabajo son el montaje de un ensayo para la detección de anticuerpos monoclonales a la fracción II del veneno del alacrán Centruroides noxius y la preparación de hibridomas con especificidad para este mismo antígeno.

Se montó un radioinmunoensayo en fase sólida con una sensibilidad hasta de 1 ng/ml. El montaje de la técnica de producción de hibridomas se desarrollo obteniendo anticuerpos monoclonales específicos para eritrocitos de carnero. Con algunas modificaciones a esta técnica se lograron preparar 5 hibridomas con especificidad para la fracción II del veneno del alacrán C. noxius.

II. ANTECEDENTES

A) Hibridomas

1. Introducción

Las inmunoglobulinas (o anticuerpos, si son antígeno específicas) son una gran familia de proteínas parecidas estructuralmente, secretadas por las células plasmáticas (etapa final de diferenciación del linfocito B). Normalmente estas células se diferencían y se restringen a la fabricación de inmunoglobulinas con una sola región V_L y V_H (variable de cadena ligera V_L y de cadena pesada V_H). En un solo organismo, pueden desarrollarse varios miles de pares V_L - V_H diferentes normalmente. Cada célula plasmática diferenciada puede llevar a cabo una limitada proliferación clonal. Por lo tanto, ni una sola forma molecular con un único par V_L -V_H se encuentra en suero normal en una concentración suficientemente alta como para permitir su aislamiento y caracterización estructural.

Al descubrir que el mieloma múltiple es un neoplasma de células productoras de anticuerpo y que cada tumor representa la proliferación de una sola clona de células formadoras de anticuerpo se empezaron a usar como paraproteínas de pacientes para estudiar la estructura del anticuerpo. La accesibilidad de un tumor análogo en ratón que podía ser inducido experimentalmente y transplantado indefinidamente permitió un abastecimiento ilimitado de inmunoglobulinas murinas homogéneas. Lo cual facilitó enormemente el análisis químico de las mismas (Potter, 1972).

Inicialmente era cuestionable la relevancia de mielomas y sus productos para el estudio de la respuesta inmune normal. Actualmente, se ha visto que muchas de las proteínas de mieloma no solamente reaccionan con una variedad de antígenos del medio ambiente sino que también son serológicamente idénticas a anticuerpos normales generados en contra de los mismos antígenos (Potter, 1978). Además, ha sido posible generar *in vivo* anticuerpos homogéneos en contra de ciertos antígenos, especialmente polisacáridos bacterianos (Krause, 1970; Haber, 1970). Las secuencias de aminoácidos de estos anticuerpos y de otros, han sido analizadas y las conclusiones de tales estudios concuerdan con estudios de proteínas de mieloma (Cebra *et al.*, 1974; Haber *et al.*, 1977). La síntesis y el ensamblaje de las moléculas de inmunoglobulinas en células de mieloma ocurre en forma similar en células plasmáticas normales (Scharff y Laskov, 1970; Kuehl, 1977; Williamson, 1971). La única diferencia reproducible que se ha encontrado entre células normales y malignas es la cinética de secreción. La cual parece ocurrir más rápidamente y en forma más ordenada en células normales que en células de mieloma (Helmreich *et al.*, 1961; Baumal y Scharff, 1973).

Las células de mieloma murino han sido extremadamente útiles en el estudio de la bioquímica de producción de inmunoglobulinas porque pueden clonarse y mantenerse como líneas de cultivo relativamente homogéneas y en continuo crecimiento, tanto *in vivo* como *in vitro*. (Peltengill y Sorenson, 1967; Horibala y Harris, 1970; Laskov y Scharff, 1970). Estas líneas celulares también proveen un modelo experimental para el estudio genético de células somáticas. Con relativa facilidad, se pueden --

obtener variantes celulares en la producción de inmunoglobulinas y en la estructura de las mismas. (Scharff 1974; Margulies et al., 1977). Inclusive pueden fusionarse células productoras de diferentes tipos de moléculas normales o variantes, para estudiar la interacción entre genes y productos génicos (Margulies et al., 1977; Milstein et al, 1977). El sistema de células de mieloma en cultivo es de hecho único, en cuanto a que las variantes celulares pueden volverse a inyectar en ratón, cientos de miligramos del producto génico (inmunoglobulinas) pueden purificarse del suero o del líquido de ascitis de los animales recipientes para finalmente inclusive secuenciar los anticuerpos (Adetugbo et al., 1977; Francus y Birshtein, 1978).

El sistema de mieloma ha sido desilusionante como fuente de anticuerpos monoclonales (antígeno específicos). No ha sido posible inmunizar animales y luego generar mielomas de ratón productores de anticuerpos en contra del antígeno inmunizante. De miles de tumores de mieloma murino inducidos, solamente unos cuantos producen inmunoglobulinas que reaccionan con antígenos conocidos (Potter, 1978). Estas paraproteínas antígeno-específicas han sido identificadas "por fuerza bruta" empleando una batería de antígenos potenciales (Cohn, 1967). Tal estrategia definitivamente no tiene la capacidad de proveer de una fuente de anticuerpos homogéneos en contra de una gran variedad de haptenos y de antígenos de interés.

En el pasado varios investigadores han intentado sobrepasar estos obstáculos, transformando poblaciones heterogéneas de células linfoides inmunizadas con una variedad de viruses. Este método solo ha --

tenido éxito con algunos antígenos, es decir, algunos experimentos han dado como resultado líneas celulares de crecimiento continuo y productores de anticuerpos en contra del antígeno inmunizante. Sin embargo, han habido algunos éxitos como el de Zurawski et al., (1978), en el que obtuvieron líneas celulares linfoblastoides humanas productoras de anticuerpo en contra de toxina tetánica. Aún así, la cantidad de anticuerpo producida por estas células es generalmente pequeña.

Se hicieron estudios sobre la fusión de líneas celulares de mieloma murino, con el objeto de conocer más sobre la regulación de la expresión de los genes de inmunoglobulinas. La mayoría de los intentos iniciales de fusionar células de mieloma, utilizaban virus Sendai inactivado como fusógeno para aumentar la baja frecuencia espontánea de obtención de híbridos mieloma-mieloma. Esto no funcionó posiblemente porque la mayoría, sino todas, las células de mieloma murino no contienen receptores para el virus Sendai. Sin embargo, Cotton y Milstein (1973) fueron capaces de obtener híbridos entre células de mieloma de ratón y de rata utilizando virus Sendai. Estos híbridos seguían produciendo cadenas pesadas y ligeras de ratón y cadenas ligeras de rata. Subsecuentemente Köhler y Milstein (1975), fueron capaces de aumentar la frecuencia de fusión entre células de mieloma murino mutante (marcado por medio de una droga) y de demostrar la formación de híbridos heterocariontes. La frecuencia espontánea de híbridos era de alrededor de 1 en 10^6 o 10^7 células y no se incrementó significativamente al agregar el virus Sendai, lisolecitina u otros agentes que se habían demostrado, aumentaban la frecuencia de fusión entre otros tipos celulares. Sin em-

bargo se obtuvieron híbridos suficientes para analizar la expresión de - los genes de inmunoglobulinas. Estos experimentos son relevantes para - entender el éxito de la técnica de hibridoma, y han demostrado que (1): Pueden formarse híbridos entre células de mielomas murinos diferentes; - (2): La expresión de cadenas polipeptídicas de inmunoglobulinas es codominante en los híbridos, es decir, los híbridos continúan sintetizando - todas las cadenas de inmunoglobulinas originalmente producidas por ambas células padres. La observación crucial que hay que recalcar es que la - codominancia de la expresión inmunoglobulínica en los híbridos es independiente de la clase o subclase a la cual pertenezca la inmunoglobulina producida por los mielomas padres (Milstein et al., 1977). Aún más, no hay síntesis de nuevas inmunoglobulinas (Milstein y Köhler, 1977) ni de cadenas híbridas pero sí la hay de moléculas de inmunoglobulinas híbridas; es decir, moléculas formadas por cadenas pesadas y/o ligeras sintetizadas por una célula padre y la otra cadena por la otra célula padre - (Margulies et al; 1977). Estas observaciones condujeron a la conclusión de que la expresión de los genes de inmunoglobulinas es, condominante, - indicando entonces que no están involucrados represores y/o activadores solubles en la regulación de la expresión de los genes de inmunoglobulinas en células de mieloma. Esto se comprueba más aún, al fusionar una - variante de mieloma no productora con una línea productora de inmunoglobulinas y al no encontrar una inhibición en la producción de las mismas. El híbrido sintetiza la inmunoglobulina del único padre productor (Köhler et al.; 1976). Finalmente los experimentos mencionados han demostrado (3): Que el total del número de cromosomas en los híbridos es menor a - la suma del complemento paterno, indicando una pérdida cromosomal. Esto

suele estar asociado a la pérdida de expresión de una o más cadenas polipeptídicas de inmunoglobulinas.

2. Fusión Celular: Agentes y Mecanismos

Al inicio se observó que el mantener suspensiones celulares mixtas a bajas temperaturas (del orden de 4°C) por una cuantas horas, podría por sí mismo contribuir a una mayor fusión entre las células; sin embargo, en ocasiones el daño celular alcanzaba a ser letal.

El método prácticado enseguida fue el de promover una fusión celular utilizando virus, (Harris et al., 1965). Este tipo de fusión es una respuesta citopática o citotóxica común a infecciones por una gran variedad de virus (Poste, 1973). Se han descubierto dos tipos de virus inductores de este evento. El primer tipo, denominado "fusión desde adentro" (fusion from within" (FF WI)), se caracteriza por iniciarse en etapas posteriores al ciclo de replicación viral y con dosis moderadas de virus. Para lograr la realización de este tipo de fusión, es necesaria tanto la replicación viral intracelular como la síntesis de macromoléculas nuevas, virus específicas. El segundo tipo, llamado "fusión desde afuera" (Fusion from without" (FFWO), ocurre independientemente de la replicación del virus y se induce igualmente con virus infectantes (previamente irradiados) como no infectantes; "FFWO" no requiere de la síntesis de material viral o de la célula huésped. Este tipo de fusión se realiza mucho más rápidamente (horas) que el primero (días).

El estudio del mecanismo de fusión celular inducido por virus se ha basado en el evento tipo FFWO, por su rapidez y sencillez. Los

paramixovirus (Sendai, NDV y SV5) han sido los mejor estudiados. En su envoltura lipídica se han encontrado dos glicoproteínas principales, una de mayor peso molecular (69 000 - 76 000) con actividad de neuraminidasa y de hemaglutinación, denominada glicoproteína "HN" (Scheid et al., 1972; Scheid y Choppin, 1973, y 1975; Tozawa et al., 1973; Nagai y Kleuk, -- 1977) y otra glicoproteína de bajo peso molecular (53 000 - 56 000) llamada glicoproteína F (de Fusión) ausente de actividades de neuraminidasa y hemaglutinación e involucrada en fusión celular y en hemólisis. En -- 1977, Scheid y Choppin demostraron que la glicoproteína F esta compuesta de dos polipéptidos unidos por enlaces disulfuro, denominados F_1 y F_2 de pesos moleculares 49,000 a 56,000 y de menos de 10,000 a 16,000, respec-- tivamente.

El empleo de virus Sendai para fusionar células presenta desventajas teóricas y prácticas (Lucy, 1977). Hoy día se utilizan agentes químicos. El manejo de los segundos es mucho más sencillo que el del -- virus, logrando hacer de la fusión celular un sistema de trabajo de fá-- cil montaje tanto para científicos como para clínicos.

Para el logro de una fusión celular se necesitaba una alteración reversible de la estabilidad termodinámica de membranas plasmáticas adyacentes, de tal forma que la estabilidad inherente se reduzca lo suficiente como para permitir una interacción membranal y la fusión, pero sin que la perturbación seatan grande que ocurra una desintegración membra-- nal. Aparentemente no hay una explicación única al mecanismo de fusión membranal. Utilizando varios compuestos químicos se ha concluido que -- durante la fusión celular ocurren cambios significativos e interesantes

en los lípidos y proteínas de membrana plaémica, en seguida se mencionan algunos de estos compuestos químicos.

Ahkong y colaboradores (1973) encontraron alrededor de treinta substancias liposolubles inductoras de la formación de células multinucleadas. Los ácidos grasos fusogénicos más eficientes resultaron ser los insaturados y de cadena más larga (por ejemplo, el glicerol mono-oleato, C_{18}). Proponiendose entonces, que los ácidos grasos al ser de mayor longitud tienen un mayor alcance dentro de las membranas plasmáticas adyacentes logrando consecuentemente un aumento membranal de la proporción de cadenas de hidrocarburos en estado relativamente líquido. Es decir, el papel del glicerol mono-oleato es el de un "fluidizador" de membranas. Krosower y colaboradores (1975) observaron que el "agente movilizador de membranas" A_2C promueve la fusión de eritrocitos de pollo concluyendo -- que algunos aumentos en la fluidez membranal local favorecen la fusión - celular. Con ayuda de estudios hechos con lisofosfatidilcolina, Lucy (1964 y 1968) propuso la existencia de un equilibrio dinámico entre una organización de lípidos membranales en micelas globulares y en una estructura de una capa bimolecular. Las células involucradas en una fusión necesitan tener una relativamente alta proporción de sus moléculas de fosfolípidos en conformación micelar.

Es interesante mencionar que la viabilidad celular de los -- hibridos inducidos por virus Sendai es mayor a la producida por agentes químicos y se ha encontrado una posible explicación para ello. En el -- primer caso se trata de una fusión localizada, es decir, limitada a la - región de la membrana plasmática a la cual este adherido el virus o a la

"vecindad" inmediata al virus. Esta localización puede ser responsable en parte, de la habilidad viral para fusionar células sin causar un daño membranal difuso, como ocurre con substancias químicas. Por lo que se propuso intentar localizar la fusión con agentes químicos por medio de liposomas, por ejemplo. En 1972, Ahkong y colaboradores realizaron este experimento, encontrando efectivamente una mayor viabilidad celular de los híbridos, es decir, una formación de policariontes estables conteniendo organelos menos dañados.

Las propiedades fusogénicas no estan limitadas a substancias liposolubles, se han encontrado también agentes químicos fusogénicos hidrosolubles, como son los polioles (manitol, etilenglicol y sacarosa). Entre los mas importantes esta el polímero, poli (etilenglicol) PEG (Maggio et al., 1976; Wallin et al., 1974); dado que es relativamente poco tóxico, origina una excepcionalmente alta incidencia de fusión celular y una amplia gama de células son suceptibles a ser fusionadas por este agente. Además, por medio de PEG se han logrado fusiones celulares intra e interespecie (Anné et al., 1976; Schaeffer et al., 1976).

Davidson y colegas (1976) encontraron que para todas las preparaciones de PEG con pesos moleculares entre 4 000 y 6 000, el pico de mayor frecuencia de hibridización celular ocurre con concentración de PEG de 50 a 55%. Se ha visto que entre mayor es el peso molecular del PEG empleado, mayor es la cantidad de híbridos obtenidos; aunque por otro lado también aumenta la toxicidad celular y la dificultad de manipulación del polímero (dado que es mas viscoso). Recomendamos entonces, el PEG de peso molecular 4 000. (Fazekas, 1980).

Interesantemente se ha observado una preferente fusión entre "puntas" de procesos celulares elongados (Pontecorvo et al., 1977). Esto podría explicar el por qué en monocapas celulares dispersas tratadas con PEG la proporción de células binucleadas y multinucleadas, encontrada tiende a ser mayor que en cultivos confluentes.

El mecanismo de fusión de fusógenos hidrosolubles en general y de PEG en particular no ha sido dilucidado, parece ser muy complejo. - Maggio y colaboradores (1976) sugirieron una inducción por estas substancias, de cambios estructurales en la fase acuosa ("bulk fase water") adyacente a la superficie membranal (Tanfard, 1961). Esto puede, consecuentemente, orientar e hidratar los grupos ("cabezas") polares de los fosfolípidos de membrana, alterar la permeabilidad membranal y modificar la -- orientación espacial y la agregación de las proteínas membranales.

La alteración de la permeabilidad celular por agentes químicos da lugar a un "hinchamiento celular" Este fenómeno puede ser por sí mismo trascedental para la fusión celular (Power, 1970). Dado que, por un ejemplo en protoplastos parece importante la existencia de una suficiente "profundidad citoplásmica" en el punto de contacto de cada una de las células en fusión, antes de llevarse a cabo este evento. (Power y Cocking, 1971). Alternativamente, el inchamiento celular puede estar, asociado a una exposición de fosfolípidos endógenos y/o lípidos agregados a ciertos sitios de la superficie celular, posiblemente involucrando un desplazamiento lateral de glicoproteínas de membrana. (Ahkong et al., 1973).

El requerimiento de altas concentraciones de PEG para inducir la fusión de eritrocitos de pollo, causa un encogimiento de las mismas. Esto probablemente refleja un desplazamiento de moléculas de agua de las células por este soluto tan altamente hidrofílico. (Pontecorvo, 1977). Se ha encontrado también que eritrocitos aglutinados y encogidos por el efecto del mismo compuesto no se fusionan "in situ", requieren de la eliminación del exceso de PEG. Quizá el PEG actua como barrera intercelular (Maggio *et al.*, 1976).

Por otro lado se le han atribuido al ión Ca^{++} funciones importantes durante la fusión celular, entre los cuales estan: (1) El facilitamiento de la fusión al acercar las células involucradas. (2) El reestablecimiento post-fusión de la membrana celular, dado que es capaz de disminuir la lisis celular por virus, por ejemplo. (3) La inhibición de la actividad de la enzima ATPasa Na^+/K^+ dependiente, que se encuentra asociada a membrana; dando lugar a la pérdida de K^+ citoplásmico (Dunn, 1974) y a la entrada de agua extracelular, como fue postulado para la reacción acrosómica Ca^{2+} dependiente (Yanagimachi y Usui, 1974). (4) La separación de fase en los fosfolípidos de membrana y la agregación de proteínas intramembranales de la superficie citoplásmica, cargadas negativamente (por ejemplo, spectrina).

Es importante recalcar este último inciso postulado ya por varios laboratorios. Poste y Allison (1973) proponen que la fusión quizá se lleve a cabo por medio de la interdigitación de las proteínas membranales agregadas. Aunque las observaciones por microscopía electrónica sugieren que la fusión celular procede por la entremezcla de los lípidos

membranales después del surgimiento en la bicapa lipídica de áreas libres de proteínas, debidas a la agregación de proteínas membranales - Ahkong et al., 1975; Lucy, 1977).

3. Métodos de Selección de Híbridos

Los métodos utilizados para seleccionar híbridos de poblaciones celulares formadas por una mezcla de células fusionadas y células padres, pueden separarse en dos categorías generales: (a) métodos - basados en características de crecimiento y de morfología celular, es -- decir; basados en aspectos del fenotipo celular como son velocidad de -- crecimiento, inhibición por contacto intercelular, adhesión a vidrio o a plástico y sobrevivencia en cultivo "in vitro"; (b) métodos bioquímicos como son mutantes auxotróficas (Kao y Puck, 1974), toxicidad por drogas a saber, resistencia a ouabaina (Mayhew, 1972) y a 8 azoguanina (Littlefield, 1964).

Frecuentemente se utilizan combinaciones de ambos métodos - como es el caso de, el llamado "sistema de selección HAT" descrito por -- Littlefield (1964). (El medio HAT esta compuesto del medio de cultivo - convencional suplementado con hipoxantina (H), aminopterina (A), y timidina (T)). Se pueden obtener líneas celulares condicionalmente letales y droga-resistentes, que pueden crecer en el medio de cultivo convencional pero no en HAT (ó en medios análogos a éste). Por ejemplo, células resistentes a purinas análogas de hipoxantina y guanina (6-mercaptopurina, 6-thioguanina, 8-azoguanina, ó 8-azahipoxantina) son comunmente deficientes de la enzima hipoxantina; guanina fosforibosiltransferasa --

(HPGRT asa), la cual convierte hipoxantina o guanina en inosina 5'-monofosfato o en guanosina 5'-monofosfato. Son por lo tanto incapaces de utilizar la hipoxantina del medio HAT. (Szybalska y Szybalski, 1962). Similarmente células resistentes a análogos de timidina tales como bromodeosoxiuridina (BrdU) carecen de timidinacinasa (TC) por lo que son incapaces de utilizar la timidina del medio HAT.

Ambos tipos de líneas celulares droga-resistentes son capaces de crecer en el medio de cultivo convencional por medio de las vías primarias de síntesis de timidilato y de purinas. Sin embargo, esta vía es bloqueada por inhibidores de folato reductasa tal como la aminopterina. Por lo tanto, en medio HAT HGFRT asa y TC se vuelven enzimas esenciales para el crecimiento de estas células. Como la ausencia de actividad enzimática es recesiva a su propia presencia, híbridos celulares entre células HGFRTasa$^-$ TC$^+$ y HGPRT asa$^+$ TC$^-$ deben ser fenotípicamente HG PRT asa$^+$ TC$^+$ y por lo tanto son viables. El sistema de selección HAT también pueden utilizarse con una célula padre HGFRTasa$^-$ o TC$^-$ y otra célula. Este tipo de semi-selección ha sido descrita por Davidson (1965), en el cual el padre droga-resistente se cruza con una célula que se replica lentamente, es deficiente en cuanto a la formación de colonias (p. ejem. cultivos celulares primarios) o inclusive es incapaz de crecer "in vitro". (p. ejem. linfocitos). Esta semi-selección es utilizada frecuentemente porque evita la necesidad de tener marcadores genéticos en ambos tipos de células padres.

4. Producción de Híbridomas

Todos los resultados descritos en secciones anteriores dieron información útil y fundamental, aunque realmente alcanzaron amplio significado cuando Kohler y Milstein (1975) fusionaron células en cultivo de mieloma murino con células normales de bazo de un ratón inmunizado. Demostraron asimismo que algunos de los híbridos resultantes producían anticuerpos homogéneos en contra del antígeno inmunizante.

Basta con contar con un antígeno suficientemente inmunogénico y una técnica altamente sensible para detectar los anticuerpos específicos para casi poder garantizar la obtención de un hibridoma.

Independientemente del antígeno en contra del cual se produzcan los híbridomas, los anticuerpos monoclonales están y seguirán resolviendo muchos problemas presentes al utilizar antisueros (o anticuerpos policlonales), causados básicamente por los factores que determinan la especificidad de la respuesta inmune como son:

a) Diferencias genéticas entre la especie de origen del antígeno y la especie del recipiente.

b) Diferencias en las respuestas inmunes entre individuos de la misma especie, reguladas por factores genéticos y no genéticos poco conocidos.

   Ambos problemas, (a y b) hacen imposible poder reproducir la misma combinación de anticuerpos específicos en un animal nuevo.

c) La purificación del antígeno es esencial para no tener títulos muy bajos de anticuerpos de interés, dado que aún cantidades --

aparentemente insignificantes de impurezas, pueden dar como resultado cantidades significativas de anticuerpos no deseados. - Con frecuencia además, es imposible o muy laborioso purificar - totalmente el antígeno (Golding, 1980).

Además los hibridomas crecen continuamente en cultivo, "inmortalizando" un anticuerpo particular y formando tumores al inyectarlos en ratones singénicos. Una alta concentración de anticuerpos homogéneos (mg/ml) se presenta en el suero y en el líquido de ascitis de los ratones recipientes.

Como podría anticiparse por estudios realizados con híbridos mieloma-mieloma, varios problemas técnicos deben resolverse antes de poder desarrollar el amplio potencial de la tecnología de hibridomas.

Entre las restricciones encontradas para la producción de -- hibridomas a varios niveles, es importante mencionar las siguientes: - (Potter, 1977):

1) Restricciones celulares

a) Filogenéticas

Entre más cercanas filogenéticamente sean las células padres (mieloma y bazo) que se deseen fusionar, mayor será la proporción de células híbridas producidas. Se han logrado condiciones óptimas usando ambas células padres murinas -- (Kohler et al., 1976; 1977) así como fusionando células de bazo de ratón con líneas celulares de rata. En cambio al fusionar un mieloma murino con células B de conejo, se han

encontrado híbridos capaces de secretar cadenas ligeras de conejo pero nunca cadenas de inmunoglobulinas completas. Al fusionar células de ratón con linfocitos humanos o de rana, se produjeron aún menos híbridos, mismos que no presentaron secreción estable alguna de inmunoglobulinas (Hengartner, 1978). La ausencia de expresión de inmunoglobulinas de conejo, de ser humano o de rana, parece ser debida a una pérdida preferencial de cromosomas no-murinos.

b) Ontogénicas

Se ha visto, que al fusionar líneas tumorales cercanas ontogenéticamente con la célula normal, los híbridos resultantes son capaces de expresar la función especializada de las células normales (Kohler, 1977; Godoby, 1977). Esto parece ser una restricción bastante fuerte dado que las células de mieloma aparentemente se fusionan mucho mejor con células secretoras de anticuerpos que con células B en otros estadíos de diferenciación. Las siguientes reglas deben considerarse para optimizar el rescate de las funciones deseadas, en una función: 1) debe enriquecerse la población de células normales (por estimulación antigénica, por ejmplo). 2) Debe escogerse la célula padre tumoral en tal forma que exista la mayor cercanía ontogénica y filogénica posible con la célula normal especializada.

2) Restricciones moleculares

Los primeros híbridos fueron obtenidos al fusionar células de mieloma (X63-Ag8), de ratones Balb/c, derivados de la línea celular MOPC 21 (Potter, 1972) que secreta IgG_1(K) de especificidad desconocida. Los híbridos resultantes no solo expresan las cadenas pesadas y ligeras de las células de bazo, sino también las cadenas de inmunoglobulinas de mieloma (antígeno inespecíficas). Así mismo se han detectado híbridos que sintetizan moléculas híbridas de anticuerpo, pero nunca que sinteticen cadenas híbridas.

Para superar estas limitaciones moleculares se proponen dos mecanismos: 1) Aprovechar la selección espontánea de clonas que expresen cadenas antígeno-específicas, selección dada por la frecuente pérdida de cadenas con especificidad desconocida (provenientes del mieloma). (Kohler, 1976) y 2) utilizar un mieloma mutante que no sintetice cadena alguna de inmunoglobulina y que por lo tanto al fusionarlas con células B normales, sólo se sinteticen las moléculas con afinidad por un antígeno. Como se hace actualmente (Tabla I).

TABLA I

LINEAS CELULARES UTILIZADAS EN LA PRODUCCION DE HIBRIDOMAS

Línea celular	Inmunoglobulina producida	Referencia
P3-X63 Ag8	1'	Kohler, 1975
45.6T61.7	2^{b},	Yelton *et al.*, 1978
N51/1-Ag4.1	(no secretada)	Kohler, 1976
P3X63 Ag8U1	(no secretada)	Yelton *et al.*, 1978
Sp2/0-Ag14	Ninguna	Shulman *et al.*, 1978
X63-Ag8.653	Ninguna	Kearney *et al.*, 1979
Y3-Ag1.2.3 (mieloma de rata)	(rata)	Gafre *et al.*, 1979

5. Aplicaciones de los Anticuerpos Monoclonales Antígeno Específicos

Los hibridomas son atractivos reactivos por proveer una fuente bien definida de anticuerpos. En algunos casos un anticuerpo monoclonal puede ser utilizado al igual que un antisuero convencional. Pero -- las diferencias fundamentales entre ambos reactivos hace arriesgado el - suponer que se pueda automáticamente sustituir el uno por el otro.

El antisuero convencional es una mezcla compleja de anticuerpos de diferentes clases y afinidades en contra de varios determinantes antigénicos. Debido a la naturaleza compleja y a la dinámica de la respuesta inmune, como se dijo anteriormente, ningún antisuero es igual a - otro aunque provengan del mismo animal. Estas diferencias están refleja

das tanto en el título de anticuerpos como en la habilidad de los anti-- cuerpos de llevar a cabo ciertas funciones como son: la fijación de complemento, la precipitación y la aglutinación de antígenos. Los antisueros contienen tantos anticuerpos diferentes que estas actividades se presentan siempre en mayor o menor grado. Sin embargo, los anticuerpos monoclonales pueden no realizar todas estas funciones. Por ejemplo, en el caso de una precipitación por anticuerpos monoclonales es particularmente difícil, dado que dependen de un entrecruzamiento de antígenos para formar las "mallas" insolubles. Este problema puede resolverse mezclando - anticuerpos monoclonales con especificidades para diferentes determinantes antigénicos y asi producir, un reactivo artificial y bien definido de anticuerpos policlonales.

Es importante recalcar que los anticuerpos monoclonales no - son necesariamente monoespecíficos. Pueden reaccionar con el determinante antigénico de interés y también con otros determinantes con caracte-- rísticas estructurales similares. Tales reacciones cruzadas pueden eliminarse del antisuero pero al intentar adsorber los anticuerpos monoclonales, simplemente se elimina todas las moléculas de inmunoglobulinas ya que todas son iguales en cuanto a su afinidad por un determinante. Si - una reacción cruzada es inconveniente deberá producirse otro anticuerpo monoclonal. Aunque por otro lado, la observación de una reacción de este tipo demuestra determinantes compartidos que indican similitudes es-- tructurales. Esta habilidad de examinar las reacciones cruzadas que normalmente son adsorbidas del antisuero convencional, es una de las características mas poderosas del anticuerpo monoclonal. Dichas especificida

des compartidas pueden haber sido altamente conservadas por su importancia estructural y podrían además, revelar relaciones funcionales y evolutivas entre macromoléculas.

Resulta interesante que cuando algunos investigadores empezaron a examinar la unión de múltiples anticuerpos a un mismo antígeno, ocurría un fenómeno interesante. En algunos casos la unión de un anticuerpo a un sitio antigénico incrementaba o disminuía la unión de un segundo anticuerpo a otro sitio, posiblemente debido a un cambio conformacional inducido por el primer anticuerpo monoclonal. Parece entonces que los anticuerpos son capaces de influir en la antigenicidad de sus blancos. No está claro, si este fenómeno tiene algún significado fisiológico (Howard et al., 1979; Howard et al., 1978).

La producción de híbridomas se ha aplicado a una gran variedad de antígenos, a saber: (1) virus y otros agentes infecciosos, (2) antígenos de histocompatibilidad, (3) antígenos tumorales y de diferenciación, (4) determinantes antigénicos únicos en una amplia variedad de proteínas, ácidos nucleicos y azúcares. (Kennett, 1980).

La tecnología de híbridomas ha provisto también un nuevo acercamiento al estudio de las células formadoras de anticuerpo de células B normales, con el fin de examinar el repertorio de anticuerpos producidos en la respuesta a un estímulo antigénico.

B. Anticuerpos Monoclonales en contra de Toxinas del Veneno del Alacrán *Centruroides noxius* (*C. noxius*)

1. Introducción

a) Generalidades sobre alacranes (*Centruoides*):

i) Taxonomía y distribución geográfica

Los alacranes son artrópodos pertenecientes al orden *Scorpionida*. Las Especies peligrosas al ser humano pertenecen a la familia *Buthidae* -- (Shulov y Levy, 1978).

La distribución geográfica de las especies dañinas es como - sigue: a) los alacranes del género *Andróctonus*, *Leiurus*, *Buthus*, -- *Buthotus* y *Heterometrus* se localizan en el Norte de Africa, en Oriente y en India; b) los del género *Centruroides* se hallan en la parte Sur de Estados Unidos de Norteamérica y en el Norte de México; c) los del género *Tityus* se encuentran en Brasil y Trinidad Tobago (Bücherl, 1971; -- Galozet, 1971).

En México se han descrito principalmente seis especies del - género *Centruroides* (con sus respectivas subespecies), a saber: -- 1) *C. sculpturatus*, 2) *C. infamatus*, (*C.i. infamatus* y *C.i. ornatus*), 3) *C. elegans*, (*C.e. insularis* y *C. E. elegans*, 4) *C. limpidus* (*C.l. limpidus* y *C. l. tecomanus*), 5) *C. suffusus* (*C.s. chiaravigli* y *C. s. suffusus*), 6) *C. noxius*.

Este trabajo se desarrolla utilizando una fracción del - veneno del alacrán *C. noxius* por lo que se hablará en más detalle sobre esta especie de *Centruroides*.

Los alacranes C. noxius se encuentran distribuídos geográficamente en el estado de Nayarit y en el sureste de Sinaloa.

b) Picadura de Alacrán

i) Importancia clínica en México

En México la mortalidad por causa de picadura de alacrán es importante. Los datos estadísticos son reducidos, se reportan tazas medias anuales de defunciones de 700 personas (Bravo-Becherelle y Mazzoti, 1961), de las cuales el 93.5% son niños menores de nueve años, siendo mayor el porcentaje entre menor edad tiene la víctima.

Sin haber datos estadísticos, es de conocimiento común la disminución de la mortalidad por efecto del veneno de alacrán, por medio del antídoto para picadura de alacrán. Este antídoto se obtiene de la sangre de caballos inmunizados por ocho meses con veneno de alacrán. En otras palabras, la preparación es muy laboriosa debido a la baja capacidad antigénica del veneno, (Del Pozo, 1962). Además es importante mencionar la presencia frecuente en la víctima de efectos secundarios a la aplicación de este antídoto. Entre estos efectos se encuentra la reacción anafilática al suero de caballo.

ii) Sintomatología general y DL_{50}

La toxicidad del veneno de alacrán varía dependiendo del estado general de la víctima (edad, peso, salud) y de la especie de alacrán involucrada (Hoffmann, 1938).

El cuadro clínico debido a una picadura de alacrán, se presenta regularmente como sigue: hiperestesia y dolor local intenso, entumecimiento de lengua y garganta, hiperirritabilidad seguida de angustia, salivación y diaforesis, lagrimeo, midriasis, exoftalmia, fotofobia y distensión gástrica, pulso arrítmico, alta presión arterial, seguido de los signos opuestos, baja presión arterial, convulsiones y contracción muscular, parálisis flácida, problemas respiratorios y/finalmente la muerte que ocurre por una parálisis respiratoria. Todo este cuadro clínico se presenta en cuestion de unos cuantos minutos hasta varias horas (Flores, 1963; Balazet, 1971; Zlatkin, 1978).

Esta información sobre los efectos tóxicos del veneno de alacrán se ha corroborado en laboratorios, emplean principalmente ratones como sistema de trabajo. Además se ha encontrado similarmente que la toxicidad varía dependiendo entre otras de la ruta de administración para edad (peso), el estado general de salud y de la cepa de ratón utilizada.

Por otro lado la especie de alacrán del cual se obtenga el veneno causa un daño letal a diferentes concentraciones de veneno. Brevemente, se ha encontrado que la dosis letal media (DL_{50}) de los venenos de alacrán es de un mínimo de 0.25 y de un máximo de 1.25 mg por kilogramo de peso corporal de ratón. Los venenos mas tóxicos provienen de los alacranes Leiurus quinquestriatus (africano) y Centruroides noxius (mexicano). Los alacranes latinoamericanos en particular presentan una DL_{50} entre 5 y 27 ug por veinte gramos de peso corporal murino.

c) Veneno de alacrán

i) Importancia del su estudio del veneno de alacrán

El complejo efecto tóxico del veneno de alacrán, su importancia clínica y la existencia, de un importante e inclusive necesario el - estudio de estos venenos.

Desde hace muchos años se han realizado estudios sobre venenos de alacrán y el interés por ello ha sido altamente recompensado. -- Mediante el aislamiento, la caracterización y el análisis de los efectos fisiológicos de estas sustancias tóxicas se esta empezando a dilucidar - la dinámica entre su estructura y su función. Estan comenzando ya, a - ser herramientas útiles en neurología dada su especificidad por el sistema nervioso. Posteriormente lo serán también para el estudio filogénico y taxonómico de los venenos de alacranes intra e interespecie. En lo futuro estos estudios proveerán la información necesaria para generar nuevos agentes terapéuticos.

ii) Composición del veneno de alacrán: toxinas

Introducción

Desde 1960 (Miranda) se han llevado a cabo análisis bioquímicos sobre los venenos de alacrán. (Revisión Dent, 1983). No es sino -- hasta recientemente que se ha logrado un mejor conocimiento de los venenos de alacrán, gracias a las nuevas técnicas de purificación de proteínas.

Hoy día la purificación de estos venenos se lleva a cabo por metodologías similares. Se menciona en detalle la empleada para el veneno del alacrán C. noxius (Dent, 1983) dado que es de interés para este trabajo. El procedimiento de purificación consiste brevemente en lo siguiente:

Se obtiene el veneno por estimulación eléctrica, se centrifuga el producto, se cromatografía el material hidrofílico en filtración en gel (Sephadex G50). Las fracciones tóxicas (de mayor interés) se determinan administrando ratones y buscando los efectos tóxicos. La(s) fracción(es) tóxica(s) se purifican en seguida por intercambio iónico en columnas de carboximetilcelulosa o de aminex A-S (Possani et al., 1981c). Se verifica la pureza de las toxinas por electroforesis en geles de acrilamida y por secuencia de aminoácidos de la porción N-terminal.

La estructura primaria de las toxinas se estudia por secuencia de aminoácidos (p.ej. Rochat y col., 1979, Possani et al., 1981b). La estructura secundaria y terciaria aunque hay escasos trabajos sobre ello, se analiza por dicroismo circular y resonancia magnética (Watters y col., 1981).(Fontecilla-Camps y col., 1980). La estabilidad de estas moléculas se determina por ter[illegible]desnaturalización y por dispersión óptica rotatoria (p. ej. Possani y col., 1981c; Watt y col., 1964).

Para conocer el sitio activo de las toxinas hasta el momento se realizan modificaciones químicas como son: reducción de los puentes disulfuro, carboxilación y acetilación de grupos amino y buscando alteraciones en la actividad de las toxinas (Sampieri y Habersetzer Rockat, 1975; Chichepartiche y Lazdunski, 1970).

La determinación de puentes de disulfuro se conoce utilizando enzimas proteolíticas: tripsina, quimiotripsina, papaína y termolisina (p. ej., Kopeyan y col., 1974).

iii) Composición

El veneno de C. noxius está compuesto por dos fracciones una tóxica y la otra carente de toxicidad. La primera contiene proteínas, polipéptidos y en menor proporción, sales inorgánicas, lípidos, aminoácidos libres y nucleótidos. La segunda es hidrofóbica y presenta mucoproteínas principalmente.

Entre las proteínas se encuentran las enzimas del tipo hialuronidasa (Alagón y Possani, 1981), Fosfolipasa A y B y de proteasa - (Mohamed y col., 1969), succinato deshidrogenasa (Selvajan y col., 1975) así como proteolítica y de fosfodiesterasa (Master y col., 1963).

Los polipéptidos o proteínas de bajo peso molecular forman la porción más importante del veneno. Son denominadas Toxinas por su actividad neurotóxica tanto en invertebrados como en vertebrados. Entre los animales afectados por diferentes toxinas del veneno del mismo o de diferente especie de alacrán se encuentran los siguientes:

a) Mamíferos: (Goméz y Diniz, 1966); Rochat y col., 1970; García 1976; Possani y col., 1978, 1980(1 y 2), 1977, 1981 (3); Dent y col., 1980, Alagón y col., 1978).

b) Aves (pollos) (McInstoch y Watt, 1973).

c) Insectos (Zlotkin y col., 1971; Babin y col. 1974),

d) Crustácesos (Zlotkin y col., 1972)

Las toxinas de veneno de alacrán son básicas de peso molecular alrededor de 7000 daltones con propiedades fisicoquímicas parecidas entre si. Son compactas y termoestables, conservan su toxicidad al renaturalizarse (Watt y col., 1964; Possani y col., 1981a). Se conocen alrededor de cien toxinas de diferentes especies de alacranes. Estudios sobre estructuras primarias de la región N-terminal de al menos 38 toxinas y de la estructura completa de cuando menos 21, muestran lo siguiente:

a) Estan compuestos por un mínimo de 36 y un máximo de 70 residuos de aminoácidos.

b) Presentan un alto contenido de tirosina, lisina y cisteína.

c) Tienen en general cuatro puentes disulfuro que probablemente sea lo que les da la propiedad de estabilidad mencionada.

d) Existe una homología del 50% en la secuencia de aminoácidos de la porción N-terminal de diferentes especies de alacrán. (Dent, -- 1983).

El encontrar una gran similitud en la estructura primaria de estas toxinas podría sugerir una relevancia en el sitio activo de las mismas (Zlotkin y col., 1971).

d) Veneno del alacrán C. noxius

i) Composición: toxinas

El veneno del alacrán C. noxius presenta una DL_{50} de 0.26 mg por Kg de peso corporal de ratón. Este alacrán se caracteriza por poseer el veneno de menor DL_{50} en México y por ser de acción rápida e intensa --

(Hoffmann y Vargas, 1935; Hoffman, 1938). Es estable, recupera su estructura tridimensional así como su toxicidad después de hervirse por cinco minutos (Possani y col., 1981).

Este veneno presenta las características generales mencionadas anteriormente. Y en forma particular contiene proteínas con actividad del tipo hialuronidasa (Dent y col., 1980).

El veneno soluble se ha caracterizado por cromatografía de de filtración en gel en columnas de Sephadex G-50 seguida por dos pasos de separación por intercambio iónico en diferentes sistemas de amortiguadores. Se obtienen tres fracciones: La fracción I presenta actividad de hialuronidasa, la fracción II es tóxica para mamíferos y la fracción III no lo es. Estudios posteriores demuestran la presencia en este veneno de 15 toxinas, 9 de ellas específicas para mamíferos y una para crustáceos (Dent, 1983).

Las toxinas mas estudiadas son: II.9.2.2, II-10, II-11, II-13, II-14 (Possani y col. 1980; Dent y col., 1980). La toxina II.11 denominada Noxiustoxina presenta: como secuencia de aminoácidos de la porción N-terminal, Tre-Ile-Ile-Asn-Val, en el análisis de su estructura secundaria y terciaria 11% de su estructura alfa hélica y 22% de su estructura beta hélice (Walters y col., 1981).

El mecanismo de acción conocido de algunas de estas toxinas es como sigue:

II-6 Causa parálisis reversible en crustáceos

II-11 Actua sobre el canal de potasio de axones de calamar, inhibiéndolo en forma reversible e independiente de voltaje. - (Carbone, 1982).

II-10 Bloquea selectiva y reversiblemente el influjo rápido de sodio en axon gigante de calamar. (Carbone y col., 1982).

Por otro lado, la fracción II completa (F-II) se ha logrado destoxificar con glutaraldehido (Possani et al., 1981d). Conejos -- inmunizados con el toxoide sobreviven a la inyección de veneno equivalente a 50 veces su valor de DL_{50}.

Ratones tratados con cinco veces la DL_{50} de FII acoplado a - anticuerpos de conejo anti-toxoide, puros sobrevivieron. Por lo que -- Possani y colaboradores sugieren la posibilidad futura de emplear esta anatóxica como vacuna en contra del veneno de alacrán, dado que interesantemente también se encontró reacción cruzada entre los anticuerpos - anti-toxoide y el veneno de otras especies de alacrán. Aunque la obtención de veneno es laboriosa por lo que quizá se necesite modificar péptidos sintéticos de estas toxinas.

2. Perspectivas de los anticuerpos monoclonales a toxinas de alacrán

Hoy día gracias a avances tecnológicos mencionados se ha podido llegar a conocer la composición del veneno de alacrán, a purificar las toxinas y a caracterizar su estructura primaria, secundaria y terciaria. Indirectamente también se ha logrado empezar a estudiar el sitio activo de estas moléculas, es decir, no se ha purificado esta porción de las toxinas pero por medio de modificaciones químicas o con la ayuda de anticuerpos policlonales se ha bloqueado la toxicidad de estas moléculas. Como es evidente esto ha sido productos de estudios laboriosos y aún así siguen incompletos, no se conocen con exactitud este o estos sitios.

Por otro lado los anticuerpos monoclonales tienen precisamente la propiedad de interaccionar con un solo determinante antigénico. Y esto es exactamente el tipo de herramienta requerida para lograr estudios menos laboriosos y mas completos sobre el sitio de acción de toxinas. El objetivo de este trabajo es precisamente fabricar hibridomas productores de anticuerpos específicos para toxinas de alacrán, en particular del alacrán Centruroides noxius. Una vez teniendo estos hibridomas y por ende estos anticuerpos monoespecíficos podrán acoplarse a Sepharosa y utilizarse como columnas de afinidad, con ellas se podrá purificar la(s) toxina(s) de alacrán en un solo paso. Esta misma columna podrá utilizarse para determinar homologías en determinantes antigénicos de otras toxinas del veneno del mismo alacrán o de alacranes de diferente especie o inclusive de otros organismos, lo cual dará mayor información sobre la taxonomía de las mismos. Los anticuerpos monoclonales generados podrán emplearse como herramientas en el estudio de la interacción de las dife-

rentes toxinas con células nerviosas realizando estudios de competencia, y así logrando conocer si el determinante antigénico reconocido por cada anticuerpo monoespecífico es importante o no para el efecto tóxico -- sobre la célula blanco. En otras palabras, se podrá conocer con fineza el sitio de acción de las toxinas. Y sobretodo una vez encontrado el o los determinantes antigénicos estructurales de este tan perseguido sitio de acción, podrá purificarse, secuenciarse y con relativa facilidad sintetizarse este (o estos) péptido(s) con el objetivo de intentar generar - una vacuna sintética en contra de la picadura de alacrán. La cual disminuirá considerablemente los efectos secundarios causados al administrar el antídoto anti-picadura de alacrán, empleado actualmente. Por otro -- lado se podrá tener en grandes cantidades sin necesidad de depender de - la limitada fuente de veneno de alacrán, como ocurriría al emplear un -- toxoide.

MATERIAL Y METODOS

Se enumeran los procedimientos seguidos para el montaje de las técnicas de detección de hibridomas y para la producción de hibridomas (Fig. 1).

A. Preparación de Toxoide

La fracción II del veneno del alacrán *C. noxius* fue purificada por Dent y col., por el método reportado (Dent, 1980). La polimerización de esta fracción se lleva a cabo en la forma reportada (Possani, 1981d). Esta reacción consiste brevemente en lo siguiente: se incuban 4 mg/ml de la fracción II por cuatro horas a 37°C con agitación continua, en una solución 0.0263 M de glutaraldehido. La reacción se detiene añadiendo 5 ml de glicinamida-HCl 0.2 M. Por DID se determinó el anticuerpo anti-F II y anti-veneno total en el suero de los animales.

B. Montaje de Métodos de Detección de Hibridomas

Una variedad de ensayos rápidos, sencillos y sensibles han sido desarrollados para detectar hibridomas (Kenneet *et al.*, 1980). En este trabajo se emplea la hemaglutinación para detectar hibridomas en contra de eritrocitos de carnero y el radioinmunoensayo en fase sólida para revelar hibridomas con especificidad para la fracción II del veneno del alacrán *C. noxius*.

1. Hemaglutinación

Técnica reportada por Kenett (1980). Brevemente, consiste en lo siguiente: se incuban por una o dos horas 100 µl del sobrenadante

de cada pozo con híbridos en crecimiento con 50 µl de eritrocitos de carnero frescos al 1% en PBS (v/v). Se buscan visualmente mallas de hemaglutinación formadas por la presencia de anticuerpos anti-eritrocitos, o en su defecto se buscan botones de eritrocitos sedimentados por la ausencia de anticuerpos antígeno específicos.

2. Radioinmunoensayo en Fase Sólida

El radioinmunoensayo en fase sólida (RIE) fue montado en nuestro laboratorio. Primero se hablará sobre la preparación de los reactivos requeridos y enseguida sobre el método por el cual se realizó el ensayo.

i) Acoplamiento de la fracción II del veneno de *C. noxius* a discos de celulosa activados con el bromuro de cianógeno (CNBr).

La activación de discos de papel con CNBR (Ceska y Lunwist, 1972; Parikh *et al.* 1974) se prepara como sigue: Se perforan discos de 6 mm de diámetro, aproximadamente 2.4 mg por disco, de papel filtro Whatman No. 1. Un gramo de discos se resuspende en 10 ml de hidróxido de sodio (NaOH) 3N, por 15 minutos a temperatura ambiente. Después de un lavado intensivo con agua y por filtración, los discos se resuspenden en 60 ml de una solución de carbonato de sodio 0.1 M, a la que se le agrega una solución de CNBr (2g) en 2 ml de acetonitrilo. Después de 10 minutos a temperatura ambiente, la suspensión se filtra y se lava intensamente con agua. Los discos activados se resuspenden en 20 ml de la fracción II del veneno del alacrán (0.02 - 0.05 mg/ml) en un amortiguador de borato de sodio 25 mM, pH = 9.0, la mezcla se deja agitando len-

lamente toda la noche, a temperatura ambiente. Después de lavar con el mismo amortiguador de borato de sodio, los discos de papel se resuspenden en 20 ml de glicina, 5 mM en el amortiguador de boratos y se agita por 45 minutos. Finalmente los discos se recuperan lavándolos con PBS, 0.1 mg/ml de albúmina bovina. Se almacenan en el mismo amortiguador a 4°C hasta ser utilizados.

ii) Purificación de anticuerpos murinos en contra de la fracción II del veneno del alacrán C. noxius

Se obtuvo el suero de la sangre de los ratones Balb/c utilizados para la obtención de células de bazo inmunes. Del suero inmune se purificaron los anticuerpos anti-Fracción II por medio del inmunosorbente Sefarosa Cl-4B-Fracción II, (Fig. 4) mismo que se preparó acoplando el veneno a la resina tras de ser ésta activada con bromuro de cianógeno.

La técnica del acoplamiento de proteínas a Sefarosa Cl-4B por medio del bromuro de cianógeno, consiste en lo siguiente: 1) se diluyen 20 ml de resina en 20 ml de agua destilada y se ajusta el pH a 11 con NaOH 5M; 2) se agregan 5 gr de CNBr, agitando y manteniendo el pH cercano a 11 con Na OH 5M; 3) una vez estable el pH, se lava intensamente la Sefarosa con una solución de bicarbonato de sodio 0.1N, pH 9.0; 4) Se agregan 6.8 mg de fracción II y se incuba toda la noche a 4°C con agitación lenta. 5) Finalmente, se añade glicinamida-HCl 0.2M y se incuba por una hora agitando lentamente. 6) Se monta la columna y se lava primero con una solución cloruro de sodio 1M y después se equilibra el inmunoabsorbente con el amortiguador de elución (Figura 4). Se guar-

da la columna a 4°C con azida de sodio al 0.02%.

iii) Obtención de inmunoglobulinas de ratón

Se sangran cuando menos 30 ratones, se obtiene el suero y se precipita la fracción inmunoglobulínica con sulfato de amonio a una concentración final del 40% (v/v). Luego se purifican las inmunoglobulinas por alguno de los siguientes métodos:

(1) Por intercambio iónico en una columna de DEAE-celulosa (figura 11); para eliminar el contaminante de albúmina detectado por electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS (Figura 13), se realiza una cromatografía en filtración en gel utilizando una columna de Sefacril S-200 (Figura 12). Se verifica la pureza de estas proteínas por electroforesis (Figura 13). Este método recupera no solo inmunoglobulina de subclase G (IgG) sino de la subclase M (IgM).

(2) Por cromatografía de afinidad en una columna de Sefarosa-proteína A (Figura 14). Este método recupera casi exclusivamente IgG, IgG_{2a} e IgG_{2b}.

iv) Producción y purificación de anticuerpos de conejo en contra de inmunoglobulinas de ratón

Se inmunizan subcutáneamente conejos, cada quince días con 300 µg de las inmunoglobulinas puras de ratón, primero en adyuvante completo de Freund (ACF) y los refuerzos subsecuentes aislando el antígeno

en adyuvante incompleto de Freund (AIF). Cada semana se extraen 20 ml de sangre de estos conejos, se obtiene el suero y se determina por doblein-- munodifusión la presencia de anticuerpos específicos (Fig. 16a). Se purifican estos anticuerpos por cromatografía de afinidad en Sefarosa Cl-4B - (20 ml) a la cual previamente se le acoplan 8 mg de las inmunoglobulinas de ratón puras (método descrito para Sefarosa-FII), (Fig. 15). Finalmente se verifica la presencia de actividad en los anticuerpos puros por dobleinmunodifusión (Fig. 16b).

v) Iodinación de los anticuerpos de conejo anti-inmunoglobulinas de ratón por el método de Cloramina T

Los anticuerpos puros de conejo anti-inmunoglobulinas de ra-- tón se iodan siguiendo el método de Hunter y Greenwood (1962). En forma resumida, se mezclan 100 µg de proteína en PBS pH 7.4 con 1 mCi del radio isótopo ^{125}I (neutralizado con 0.1N HCl) y con 20 µl de cloramina T - (1 mg/ml). Se incuba a temperatura ambiente 2 a 4 minutos. Se añaden en seguida 20 ul de metabisulfito de sodio (2 mg/ml) y se deja la reacción - sin agitar por 2 minutos a temperatura ambiente; finalmente, se añaden -- 20 ul de una solución de ioduro de potasio de 5×10^{-5}M. El iodo libre y las proteínas iodinadas se separan por filtración en gel en una columna - de Sephadex-G25, (Fig. 17). La actividad específica resultante fue de - 4.4×10^{6} cpm por ug de proteína.

b) Procedimiento del RIE en fase sólida (discos de celulosa)

Se probaron diferentes condiciones experimentales (ver resultados). Las condiciones óptimas obtenidas y por lo tanto empleadas para

el ensayo de los sobrenadantes de los híbridos en cultivo son las siguientes:

(1) De utilizarse placas de polivinilo (PVC) de policarbonato, se incuban con 100 µl de FII (100 µg/ml) por 12 hr 4°C.

(2) Se incuban por una hora a 37°C, cada disco de celulosa-FII con un mililitro de BSA (albúmina bovina) al 1% en PBS (p/v). Enseguida, se lavan los discos dos o tres veces con PBS complementado -- con BSA al 0.1% y TWEEN 80 al 0.05%.

(3) Se agregan 50 µl de anticuerpos policlonales (10 000, 1000, 100, 10 µg/ml) como control positivo o 50 µl de sobrenadante del hibrido en cultivo.

(4) Se incuba de 15 a 30 minutos a 37°C agitando lentamente. Al utilizar placas de PVC o policarbonato se incuba por 2 horas a temperatura ambiente ó 4 horas a 4°C. Se lava diez veces con PBS conteniendo 0.1% BSA y 0.05% TWEEN 80.

(5) Se añaden 50 µl por pozo de ^{125}I anticuerpos de conejo anti-inmunoglobulinas de ratón. (20 000 cpm). Se incuba una hora a 37°C con agitación lenta. Al utilizar placas se incuba 12 hrs a 4°C. Se elimina el exceso de anticuerpo, lavando con el amortiguador - mencionado en el paso anterior.

(6) Se cuentan los discos de papel en un contador γ , por un minuto cada muestra (cpm). Al emplear placas se corta cada pozo y se - mide de la misma manera o se realiza autoradiografía de toda la placa simultáneamente.

C. Producción de Hibridomas

1. Hibridización

En nuestro laboratorio así como en otros (Melchers, 1978) se han explorado varios parámetros técnicos con el fin de incrementar el número de híbridos producidos por fusión celular. Entre los parámetros ensayados incluímos: 1) Diferentes esquemas de inmunización (Kennett, 1980); e hiperinmunización (Stahli, 1980); 2) Varias líneas celulares de mielomas murinos (Ver Tabla I), 3) Diferentes proporciones de células de bazo a células de mieloma (1:1, 2:1, 5:1 y 10:1) recomendadas por el Dr. Fazekas (1980), 5) Polietilenglicol de varios pesos moleculares, 1000, 1500 y 4000 y de diferentes concentraciones, 35% y 50% en DMEM (v/v); 6) Dos diferentes protocolos de fusión: el de Kohler (1975) y el de Kennett (1980). Muchas combinaciones de estas variables logran una buena producción de hibridomas pero ninguna parece ser notoriamente superior a las demás. Aunque parece importante para mejorar la reproducibilidad del experimento seleccionar un lote de PEG y de suero fetal bovino que logren una buena eficiencia de producción de híbridos. La barrera de incremento del número de híbridos obtenidos parece estar a nivel biológico más que a nivel técnico.

a) Preparación de reactivos

i) Celulas de bazo

Las células de bazo se extraen de ratones BALB/c inmunizados con eritrocitos de carnero o con toxoide de la fracción II del veneno del alacrán C. noxius. El esquema de inmunización ciertamente depende

del antígeno empleado. En el caso de eritrocitos de carnero se inyectan ratones BALB/c interaperitonealmente (i.p.) con 200 µl de una solución de eritrocitos al 1% (v/v) en PBS. Dos semanas después y luego tres diás antes de llevar a cabo la fusión, se da un refuerzo con la misma cantidad de antígeno. La inmunización de ratones con toxoide se realiza inyectando i.p. con 200 µg del antígeno aislado en 200 µl de adyuvante completo de Freund (ACF). Dos semanas más tarde la misma cantidad de antígeno en adyuvante incompleto de Freund (AIC) y dos refuerzos (i.p.) más cada quince días con el antígeno disuelto en PBS. La última inmunización se da a 3 ó 4 días antes del día de la fusión. Stahli (1980) recomienda el utilizar una hiperinmunización, es decir, inmunizar intraperitonealmente o hasta intravenosamente los días seis, cinco y cuatro antes de la fusión. En nuestro laboratorio no se encontró una mejoría en nuestros resultados por lo que seguimos empleando el primer método mencionado.

ii) Células de mieloma

Se decidió utilizar células SP-2/0 Ag-14, dado que no sintetizan inmunoglobulinas (Shulman, et al., 1978). Las células de mieloma múrino SP-2/0 Ag-14 se cultivan a una concentración de 2×10^5 células por mililitro, alimentándolas cada tercer día. Una semana antes de la fusión se alimentan diariamente. El día de la fusión se lavan 10^7 células totales, dos veces en medio DMEM.

iii) Células alimentadoras

Los timocitos de ratón BALB/c parecen dar buenos resultados. Se sangran diez ratones BALB/c de 4 a 6 semanas de edad y se les extrae

el timo. Se disgregan los timos y se lavan las células dos veces con -- medio DMEM, centrifugando a 100 G por 10 min. Finalmente se ajustan a - una concentración de 2 x 10^6 células por mililitro con medio DMEM suplementado con HAT.

b) Procedimiento de la hibridización

Se siguió el protocolo descrito por el Dr. Kennett (1980). En el cual brevemente, se realiza lo siguiente: 1) Se centrifugan juntas y a baja velocidad (800 rpm) las células Sp-2 con las células de bazo, (en una proporción de 1 a 10). 2) Se agrega gota a gota y lentamente, en el transcurso de un minuto, un mililitro de PEG de peso molecular 1000 y al 50%, en medio DMEM. 3) Se incuba la mezcla celular tratada, con agitación lenta en un baño maría a 37°C. 4) Se diluye lentamente - esta mezcla celular con un medio DMEM agregando un mililitro en el primer minuto, cuantro mililitros en el segundo y otros cuatro en el tercer minuto. 5) Se centrifugan las células a 50 G durante un minuto. 6) -- Se resuspende el sedimento y se le agrega medio de cultivo HAT. El medio HAT se prepara complementando el medio DMEM con 13.6 µg/ml de hipoxantina, 7.6 µg/ml de Timidina y 0.18 µg/ml de aminopterina. 7) Se --- siembran las células en placas de cultivo, colocando 2 ml por pozo de la mezcla celular en placas de 24 pozos o bien 200 µl por pozo en placas de 96 pozos. Con las segundas se logró un mejor crecimiento e inclusive dado el menor número de células por pozo, la competencia celular por el sustrato y posible pérdida de híbridos deseados fue menor.

2. Selección de Híbridos

Las células híbridas se seleccionan añadiendo medio HAT como se mencionó en la introducción. Las células de mieloma mueren a los 3 ó 5 días de realizar la fusión celular. Las células B no fusionadas no -- crecen.

Siete a diez días después de la fusión, si se observan clo-- nas celulares bajo el microscopio invertido (Figura 22), se alimentan -- con medio HAT conteniendo timocitos frescos (2×10^6 células/ml).

3. Selección de Hibridomas

Cuando se observe un crecimiento celular de las clonas tal - que se acidifique el medio de cultivo (aproximadamente 14 a 18 días post-fusión), se analizan los sobrenadantes. Es decir, se toma una muestra de 50 µl de cada pozo con suficiente crecimiento celular y se determina la - presencia de anticuerpos específicos al antígeno deseado. En el caso particular de este trabajo, se utilizó la hemaglutinación y el RIE para de-- tectar anticuerpos monoclonales anti-eritrocitos de carnero y anti-FII -- respectivamente.

Es importante realizar la selección lo más rápidamente posi-- ble para evitar el sobrecrecimiento de híbridos no deseados y una posible elección de estos, perdiendo los deseados. También debe cambiarse el me- dio de cultivo; para eliminar la posibilidad de tener en el sobrenadante celular anticuerpos específicos al antígeno de interés, secretado por cé- lulas B no fusionadas. Por último es recomendable tomar la muestra una - vez que se acidifique el medio de cultivo, es decir, una vez que haya un

buen crecimiento celular y probablemente una mayor concentración de anticuerpos monoclonales.

4. Clonación Celular

La clonación celular se lleva a cabo en agar suave (Civin y Banquerigo, 1983) o por dilución limitada (Kennett, 1980). En este trabajo en particular se utilizó el segundo método. Este consiste brevemente en lo siguiente: se realiza una dilución limitada de la suspensión de híbridos "positivos" sembrando placas de 96 pozos con 10, 5, 2.5 ó 1 célula por pozo en diferentes placas con medio HT. El medio HT corresponde al medio HAT sin aminopterina.

Una vez que crezcan las clonas originarias de pozos "positivos" se reseleccionan. Es decir se determina de nuevo la presencia de anticuerpos específicos al antígeno deseado, para asegurar que sean tanto estables como deseables. Es frecuente el surgimiento de variantes celulares debidas probablemente a una segregación cromosomal (Kohler, 1980; Williams, 1977).

RESULTADOS

A. Optimización del RIE en Fase Sólida

Se seleccionó el radioinmunoensayo para detectar los anti-- cuerpos monoclonales a la Fracción II, por ser un método reportado que ofrece simultáneamente especificidad, sensibilidad, precisión y fácil -- manejo para la microdeterminación de proteínas específicas en mezclas -- no fraccionadas.

Se montó primero el RIE en fase sólida antes de fabricar los hibridomas deseados. Enseguida, se presentan los resultados obtenidos - al variar las condiciones de reacción de cada uno de los componentes del ensayo con el objeto de optimizar el RIE en fase sólida.

1. Acoplamiento de la Fracción II del Veneno del Alacrán *C. noxius* a la Fase Sólida

Inicialmente se monto el RIE acoplando la FII a placas de -- polivinilo (PVC) por simple incubación. Dada la elaborada preparación - del antígeno, probar concentraciones menores, buscando evidentemente el no reducir la sensibilidad del mismo. Como se observa en la figura 2 -- concentraciones de la FII de 0.78 µg/ml bastan para saturar la fase sólida, el número de cpm retenidas por pozo es el mismo que al utilizar concentraciones de antígeno de hasta 1000 µg/ml.

Por razones aún desconocidas el RIE en placas de PVC dejó de funcionar, los controles positivo (suero inmune) y negativos (suero nor-

nal y ausencia de suero alguno) presentaron prácticamente el mismo número de cpm retenidas por pozo. Después de verificar la presencia de actividad en el primer y en el segundo anticuerpo se concluyó que el problema se encontraba en el acoplamiento de la FII a la fase sólida (datos no presentados) Un acercamiento a esta posibilidad se logró incubando FII iodada (Fig. 3) a placas de PVC. Efectivamente el acoplamiento era insignificante (datos no presentados). Se intentó incrementar este acoplamiento con las siguientes modificaciones:

a) Deshidratando el antígeno sobre la fase sólida.

b) Disminuyendo el pH del amortiguador, solvente del antígeno buscando aumentar los enlaces iónicos de éste con la fase sólida.

c) Se bajó la fuerza iónica de los amortiguadores empleados para eliminar el exceso de FII de la placa, temiendo el estar desplazando proteína ya acoplada a la fase sólida.

d) E inclusive se utilizó FII recien purificada para descartar la posibilidad de estar trabajando con proteínas dañadas con propiedades fisicoquímicas diferentes a las originales.

Por otro lado existía la posibilidad de una variación en las propiedades de las placas mismas, de un lote a otro. Se utilizaron entonces placas de policarbonato, las cuales se describe poseen una superficie particularmente homogénea y constante de placa a placa. Ninguna de estas modificaciones lograron siquiera reproducir el acoplamiento de FII a placas de PVC obtenido originalmente.

Para evitar estos problemas se decidió utilizar un método de acoplamiento mas estable y conocido en nuestro laboratorio. Se eligieron discos de celulosa activados por bromuro de cianógeno. Por este método se había logrado repetidamente un buen acoplamiento de la fracción II a Sefarosa 4B-Cl. (Fig. 4). A continuación se presentan los resultados obtenidos con esta nueva fase sólida. Se presentan también los resultados obtenidos originalmente con placas de PVC dado que proveen información sobre los demás componentes del RIE.

2. Primer Anticuerpo: Anticuerpos de Ratón anti-FII

Para montar el RIE se utilizaron anticuerpos policlonales anti-FII (antisueros) obtenidos de ratones hiperinmunizados con toxoide. Se demostró la presencia de estos anticuerpos por dobleinmunodifusión (Fig. 5). En placas de PVC se encuentra que hasta un título del suero inmune de 1 a 1280 se observa 10 veces mayor acoplamiento de cpm que con suero normal (control negativo) y la reacción inespecífica total del ensayo fue depreciable. Resultados determinados por autoradiografía (Fig. 6) y en forma cuantitativa utilizando un contador de radiaciones (Fig. 7).

Para lograr un conocimiento más exacto de la sensibilidad del RIE se utilizaron anticuerpos policlonales anti-FII puros (Fig. 4). Como muestra la figura 8, utilizando placas de PVC se tiene una sensibilidad de 10 µg/ml. En cambio en discos de celulosa se obtiene una sensibilidad diez veces mayor, de 1 µg/ml. (Fig. 9).

Con la intención de incrementar la sensibilidad del ensayo - se realizaron tiempos de incubación del antígeno acoplado a discos de celulosa con los anticuerpos anti-FII puros (Fig. 10). Como se observa -- los resultados fueron casi idénticos, es decir, la sensibilidad continuo siendo de 1 µg/ml.

3. ^{125}I Segundo Anticuerpo: Anticuerpos de Conejo Anti-Inmunoglobulinas de Ratón, Iodados

Como herramienta de detección del complejo antígeno-anticuerpo mencionado anteriormente se utilizaron anticuerpos de conejo específicos para inmunoglobulinas de ratón, purificadas (Figuras 11 a 16) e iodinados (Figura 17). Se iodinaron estas proteínas por el método de Cloramina-T, en lugar de IODOGEN (metodología no presentada) dado que se -- obtuvo una actividad específica de 4.4×10^6 y 2.6×10^6 cpm por µg de - proteína, respectivamente

Como se observa en las figuras 2, 6, 7 y 8 tan solo el 20% - de las cpm de ^{125}I segundo anticuerpo, añadidas permanecían en las placas de PVC al final del ensayo. Por ello parecía evidente que se estaba utilizando un gran exceso del segundo anticuerpo. La figura 18 muestra los resultados de aplicar menores concentraciones de éste. A medida que se disminuyen la concentración de cpm agregadas bajan también el número de cpm remanentes en la fase sólida al final del ensayo; acoplándose -- siempre y únicamente alrededor de 15 al 20% de las cuentas totales. Por ende, para determinar si se estaba saturando lo suficiente el sistema --

era necesario probar concentraciones mayores del segundo anticuerpo, pero sobretodo agitar la fase sólida durante la incubación.

Al tener que cambiar de fase sólida, por los problemas mencionados y escoger discos de celulosa en los que probablemente se tenía una mayor cantidad de antígeno acoplado y por tanto de primer anticuerpo, parecía importante probar concentraciones mayores del segundo anticuerpo. También se disminuyó el tiempo de incubación con el segundo anticuerpo (de 12 hrs a 4°C a 1 hr a 37°C) para evitar un incremento en la reacción inespecífica debido al aumento en la concentración de ésta proteína. Evidentemente se mantuvo una agitación constante a lo largo de toda la incubación. En la figura 19 se presentan los resultados. Al igual que en los experimentos mencionados en las secciones anteriores al disminuir la concentración de anticuerpos anti-FII disminuye el acoplamiento del segundo anticuerpo, lo cual corrobora la presencia en el segundo de actividad anti-inmunoglobulinas de ratón. Ahora el incremento de ocho veces la concentración de cpm aplicadas aumentaron cpm absolutas retenidas, pero la sensibilidad del ensayo permaneció igual de 1 μg/ml. La reacción inespecífica se mantuvo insignificante. Todo ello indica que el primer anticuerpo se encuentra en saturación y se estan acoplando entonces más de una molécula de segundo anticuerpo por anticuerpo anti-FII.

4. Reacción Inespecífica

La reacción inespecífica a lo largo del RIE se controla con albúmina bovina (BSA) y detergentes (TWEEN). Al inicio del empleo de discos de celulosa como fase sólida se tenía una reacción inespecífica -

le alrededor del 11% del número total de cpm para el primer anticuerpo y del 22% para el segundo. Aumentando el número de lavados con PBS conteniendo BSA y TWEEN y la concentración de éstos en el amortiguador se logró disminuir la reacción inespecífica a un 1% para el primer anticuerpo y a un 3% para el segundo (Figura 20).

B . Optimización de la Producción de Hibridomas: Obtención de anticuerpos Monoclonales a Eritrocitos

La producción de híbridomas en nuestro laboratorio era una novedad, por lo que se decidió primero obtener anticuerpos monoclonales en contra de eritrocitos de carnero. Híbridomas con esta especificidad han sido preparados en varios laboratorios (Kohler, 1975); por lo que sería un control para nuestras condiciones de trabajo.

Para detectar estos hibridomas se montó la técnica de hemaglutinación. Se encontró que a un título de 1: 8 x 10^3 del suero inmune murino se observa claramente una malla de hemaglutinación ausente al utilizar suero normal (Fig. 21).

Una vez establecida esta técnica se prosiguió a fabricar los híbridomas correspondientes. Después de inumerables intentos se lograron determinar las condiciones experimentales óptimas dadas a nuestras condiciones de trabajo. Durante la elaboración de esta enorme bateria de experimentos se emplearon diferentes líneas de mieloma, proporciones de células padres, pesos moleculares de PEG y diferentes protocolos de fusión -- (Detalles metodológicos no presentados).

Siguiendo el protocolo descrito en Material y Métodos se obtuvieron células híbridas. La figura 22 muestra como ejemplo, la fotografía de una clona celular híbrida. Por hemaglutinación se detectaron híbridomas antígeno específicas. En la figura 23, se observa la positividad de un hibridoma productos de anticuerpos de carnero.

C. Obtención de Anticuerpos Monoclonales a la Fracción II del Veneno del Alacrán *C. noxius*

Una vez montada la técnica de producción de híbridomas se prosiguió a preparar los híbridomas de interés. Aunque, evidentemente el esquema de inmunización de un antígeno particulado (los eritrocitos de carnero) es diferente al empleado para antígenos soluble (Fracción II). Por lo que se probaron diferentes esquemas de inmunización (Material y Métodos). Se seleccionó el protocolo que dió lugar al mayor título de anticuerpos posible (detalles no presentados).

Se realizó la hibridización entre células de bazo de ratones inmunizados con toxoide y células de mieloma SP-2, obteniendo aproximadamente 100 de 500 pozos con crecimiento celular. En la figura 24 se muestran los resultados del ensayo de los sobrenadantes de cada uno de los cien pozos por RIE en placa de PVC. Tres pozos resultaron "positivos". Se expandieron "in vitro" y después de colectar y concentrar los sobrenadantes se volvió a determinar la presencia de anticuerpos anti-FII. Aquí se utilizó cromatografía de afinidad en diferentes columnas de un mililitro de sefarosa - proteína A, se aplicaron las muestras, sus respectivos controles y enseguida se aplicó ^{125}I Fracción II. Los resultados de la

elución de estas columnas hicieron evidente la ausencia de anticuerpos - monoclonales anti-FII (Fig. 25).

La literatura reporta que bajo las mismas condiciones de fusión, incluyendo esquema de inmunización y cepa de ratón, en ocasiones - no se obtiene hibridoma alguno (Fazekas, 1980). Para ello todavía no - existe una explicación concluyente. Se decidió entonces realizar cuatro fusiones celulares idénticas y simultáneamente, pero en un 10% de la escala original. Además se sembraron diferentes concentraciones celulares por pozo, por miedo a estar colocando demasiadas células por pozo, por - ende causando una competencia celular por el sustrato y perdiendo entonces, células híbridas deseadas. En la figura 26 se observa que al emplear las células de bazo de los ratones número 1 y 4 no se obtuvo pozo positivo alguno. De los ratones 2 y 3 se obtuvieron tres pozos significativamente positivos. En la figura 27 se observa la positividad de otros dos pozos, los sobrenadantes, ensayados y mostrados en esta figura pertenecen a híbridos obtenidos en otras múltiples fusiones.

De los cinco pozos positivos detectados, dos presentaron una sola clona en lugar de aproximadamente diez como se menciona en la literatura. Por lo tanto se tienen hasta el momento dos híbridomas productores de anticuerpos monclonales anti- la fracción II del veneno del alacrán C. noxius.

DISCUSION

Como se mencionó en la introducción, para obtener un hibridoma es necesario tener un antígeno inmunogénico y una técnica de detección de anticuerpos específicos para este antígeno. En este trabajo se obtuvieron hibridomas secretores de anticuerpos anti-fracción II del veneno del alacrán C. noxius. No obstante habría sugerencias para mejorar la eficiencia de producción de híbridos e hibridomas y aumentar la sensibilidad del radioinmunoensayo en fase sólida.

A. Producción de Híbridomas

El bajo título de anticuerpos a FII observado por DID y RIE, comparado al alto título observado para eritrocitos de carnero y el limitado número de hibridomas sugiere la existencia de un reducido número de determinantes comunes entre el toxoide empleado para inmunizar y la FII. Por otro lado, se reporta en la literatura una inhibición de la toxicidad de la FII con anticuerpos anti-toxoide. Por ende, es posible que los determinantes antigénicos compartidos sean importantes componentes del sitio activo de las toxinas. Existe entonces la posibilidad de que los anticuerpos monoclonales obtenidos tengan afinidad para esta misma porción del polipéptido. Para sostener esta hipótesis es necesario eliminar otras posibles explicaciones a los resultados obtenidos:

1) Baja inmunogenicidad del toxoide. Debido a un encubrimiento de determinantes antigénicos por el adyuvante de Freund, como se reporta para el toxoide tetánico. Se sugiere inmunizar los ratones

con este antígeno precipitado con albúmina.

2) Baja suceptibilidad del recipiente al antígeno. Debido a problemas de salud del animal independientes del tratamiento con toxoide o causados por éste dada la presencia en él de glutaraldehido y/o de toxina no polimerizada o por características propias de la cepa de ratón utilizada (BALB/c). Se recomienda entonces: i) -- mantener animales no tratados junto con los experimentales, como control de la salud de los mismos. El haber obtenido un buen título de anticuerpos a eritrocitos de carnero, en el experimento - control, podría hablar de una inmunosupresión causada por el toxoide. Pero la también baja eficiencia de producción de híbridos para éste segundo antígeno diría lo contrario. Se sugiere realizar una fusión celular simultánea a la de interés, con células B comprometidas contra otro antígeno. Estudios preliminares utilizando BSA sugieren que el problema no es debido a la alteración de - la respuesta inmune por el toxoide (datos no presentados). Sería interesante sin embargo, corroborar estos resultados e incluso medir la proporción de linfocitos B ayudadores y supresores en sangre a lo largo de la inmunización del animal.

ii) Emplear diferentes cepas de ratón e incluso de rata o de conejo, sobretodo dado que se obtuvo un mayor título de anticuerpos en sangre de conejos inmunizados con toxoide que el reportado en este trabajo. (Possani *et al.*, 1981d).

3) Daño celular durante la fusión. Se ha reportado en la literatura la formación de productos tóxicos al autoclavar el PEG (Kadish y Wenc 1983).

Recientemente se ha logrado mejorar el rendimiento de producción de hibridomas al evitar o sobrepasar obstáculos inmunológicos de la siguiente manera: a) utilizando antígenos puros y/o eliminando determinantes inmunodominantes. En el caso particular de este trabajo, es posible que determinantes antigénicos presentes en el toxoide y ausentes en la fracción II sea inmunodominantes a los epítopes de interés. Por lo que se podría intentar dar el último refuerzo antigénico como Fracción II no modificada, posiblemente en forma de hapteno dada la baja capacidad inmunogénica de las toxinas.

b) Tolerizando o matando las clonas no deseadas (Fox et al., 1981). O purificando las clonas deseadas (Thiele et al., 1981).

c) Eliminando elementos supresores, por ejemplo transfiriendo las células a recipientes irradiados antes del último refuerzo antigénico (Fox et al., 1981).

En caso de no tener éxito en mejorar la eficiencia de producción de hibridomas se podría intentar obtener anticuerpos monoclonales en ausencia de PEG. Es decir, realizando fusiones celulares inducidas por medio de la formación de un complejo antígeno-anticuerpo entre ambas superficies celulares (Bankert et al., 1980); o transformando con virus células B, como se logró para el toxoide tetánico (Koznor y Roder, 1981).

Por otro lado, hoy día se realizan inmunizaciones "in vitro" eliminando por completo los problemas mencionados. Estas presentan la ventaja de ser rápidas (4 - 5 días), utilizan menos cantidad de antígeno y se pueden controlar mejor diferentes variables del experimento (Luben y Mohler, 1980; Luben et al., 1982; Pardue et al., 1983). Pero debe recalcarse que hasta el momento es un método poco reproducible, se obtienen mayor cantidad de monoclonales IgM que IgG y existe un alto número de clonas no deseadas con especificidad para suero fetal bovino. En cuanto al último factor se esta logrando mantener cultivos celulares en ausencia de suero fetal bovino (Cleveland et al., 1983; Wolpe S., 1983).

B. Radioinmunoensayo

El radioinmunoensayo en fase sólida montado, tuvo la sensibilidad suficiente para detectar algunos hibridomas secretores de anticuerpos anti-FII. Existe la posibilidad de detectar un mayor número de éstas teniendo un ensayo mas sensible, del orden de nano o picogramos de anticuerpo por mililitro. En este trabajo, probablemente se seleccionaron hibridomas productores de "grandes" cantidades de anticuerpos monoclonales.

Fue imposible incrementar la sensibilidad del RIE a pesar de haber modificado las condiciones de reacción de cada componente. Como se mostró la reacción inespecífica era practicamente nula, el acoplamiento del antígeno a la fase sólida, es eficiente (Possani et al., 1981d), al incrementar las cpm de ^{125}I anticuerpo de conejo a inmunoglobulinas de ratón se incremento el número de cpm remanentes pero no la sensibili-

dad por lo que indica la presencia en saturación del primer anticuerpo y la presencia de actividad del segundo. Por lo tanto, se concluye que no se pudo incrementar la sensibilidad del RIE por la falta de anticuerpos anti-FII debida a su inexistencia en grandes cantidades o a su perdida - por ser de baja afinidad. Las posibles explicaciones al bajo título de estos anticuerpos se mencionaron previamente y la posible baja afinidad se podría determinar por RIE en solución.

La baja sensibilidad del RIE, determinada con anticuerpos -- policlonales es aun menor para anticuerpos monoclonales, dada su monoespecificidad. Esto se acentua aun mas si se considera que no se esta empleando como antígeno una toxina pura, sino una mezcla de quince compo-- nentes. Se realizó así el experimento con el objeto de seleccionar anticuerpos monoclonales contra de todas las toxinas de la fracción II; subsecuentemente se llevaría a cabo una reselección con una toxina pura. - Por la baja eficiencia de producción de hibridomas obtenida, se recomienda en adelante emplear una sola toxina pura sino como inmunógeno dado el gran consumo de material y su elaborada preparación, si para la selección de hibridomas antígeno específicos.

CONCLUSIONES

Se montó un RIE en discos de celulosa con una sensibilidad de 1 μg/ml. Con esta técnica se detectaron cinco hibridomas secretores de anticuerpos específicos para la fracción II del veneno del alacrán *C. noxius*. Dos de estos hibridomas son ya clonas. Estas células se expanderán tanto "in vitro" como "in vivo" para proveer células y anticuerpos monoclonales (Hoogenraad *et al.*, 1983). Los anticuerpos se purificarán por cromatografía de intercambio iónico en columnas de DEAE celulosa y subsecuentemente por cromatografía de afinidad en columnas de Sefarosa-proteína A o en cromatografía líquida de alta presión. Una vez teniendo anticuerpos monoclonas puros se podrán empezar a utilizar para desarrollar los objetivos descritos en la introducción de este trabajo.

Cabe mencionar que para la obtención de hibridomas es crucial tener animales con excelente estado de salud. Lo cual fue un problema constante durante el desarrollo de este proyecto. Por falta de alternativas se tuvo que trabajar bajo estas condiciones.

Por otro lado para obtener los resultados presentados y debido a innumerables problemas técnicos, se montó una bateria de técnicas no mencionadas en este escrito. Estas estan siendo de gran utilidad en el presente, para el ejecutante del trabajo.

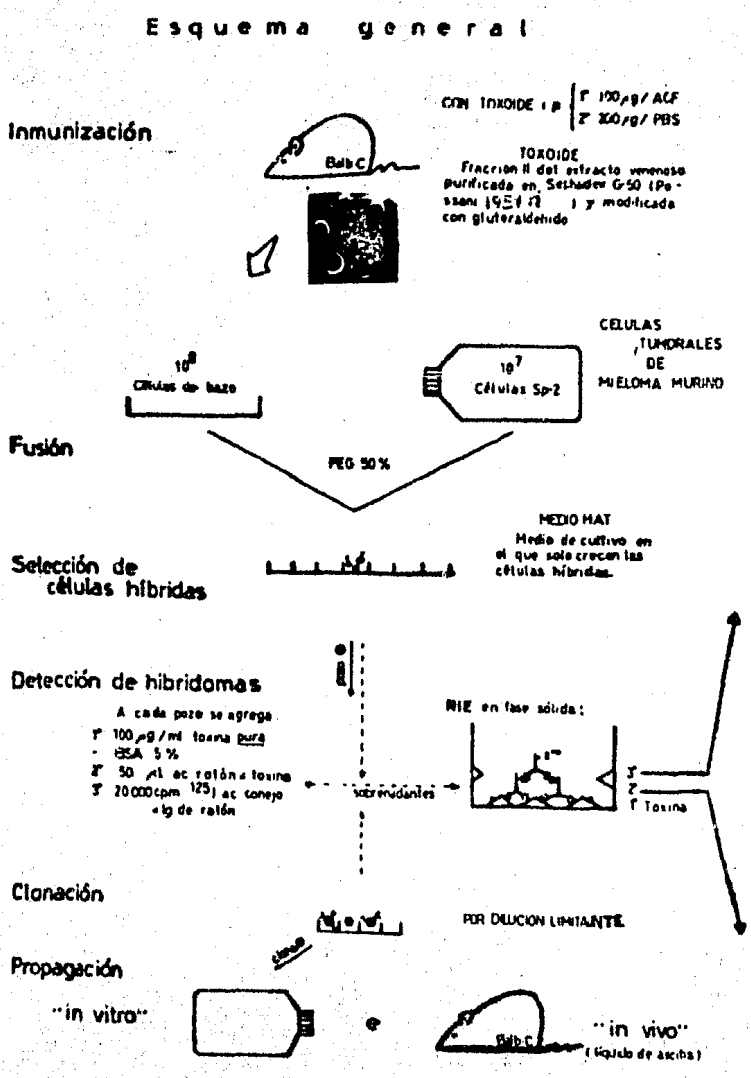


Figura 1. Esquema general para la obtención de hibridomas a fracción II del veneno del alacrán *Centruroides noxius*.

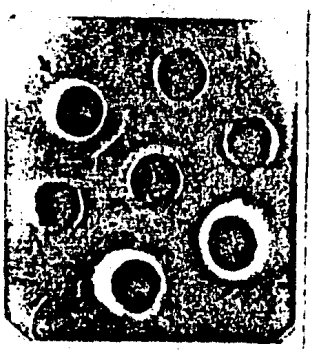


Figura 5. Detección por dobleinmunodifusión (DID) de anticuerpos anti-FII en suero murino inmune.

Al centro. Fracción II del veneno (10 mg/ml)
Alrededor. Diluciones del suero inmune de ratón: concentrado, 1:2, 1:4, 1.8, 1:16, 1:32.

DILUCION →

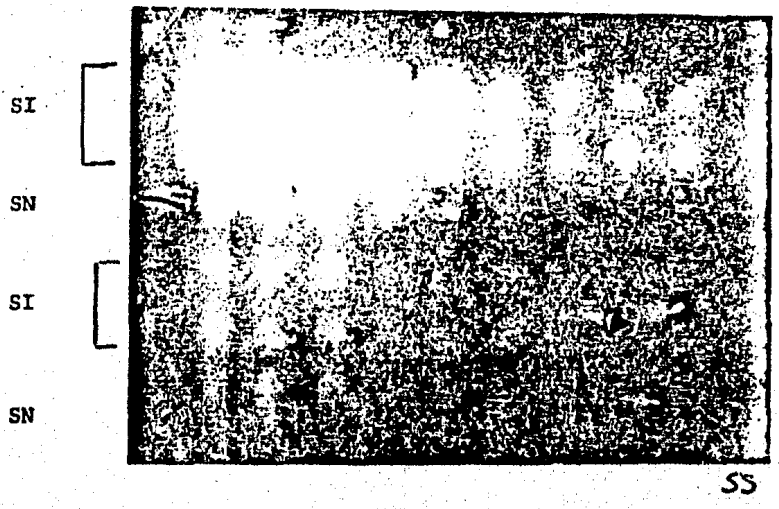


Figura 6. Determinación cualitativa de la sensibilidad del radioinmunoensayo (RIE) en placa de PVC, utilizando suero inmune de ratón.
Se aplicaron por pozo 100 µl de FII (100 µg/ml) (A), 50 µl de suero inmune (SI) en diluciones secuenciales de 1:5 partiendo de 1:5 (por duplicado) y 20 000 cpm/50 µl de ^{125}I anticuerpos de conejo anti-inmunoglobulinas de ratón. Controles: Suero normal con las mismas diluciones (SN), ausencia de suero (SS), ausencia de antígeno (B).

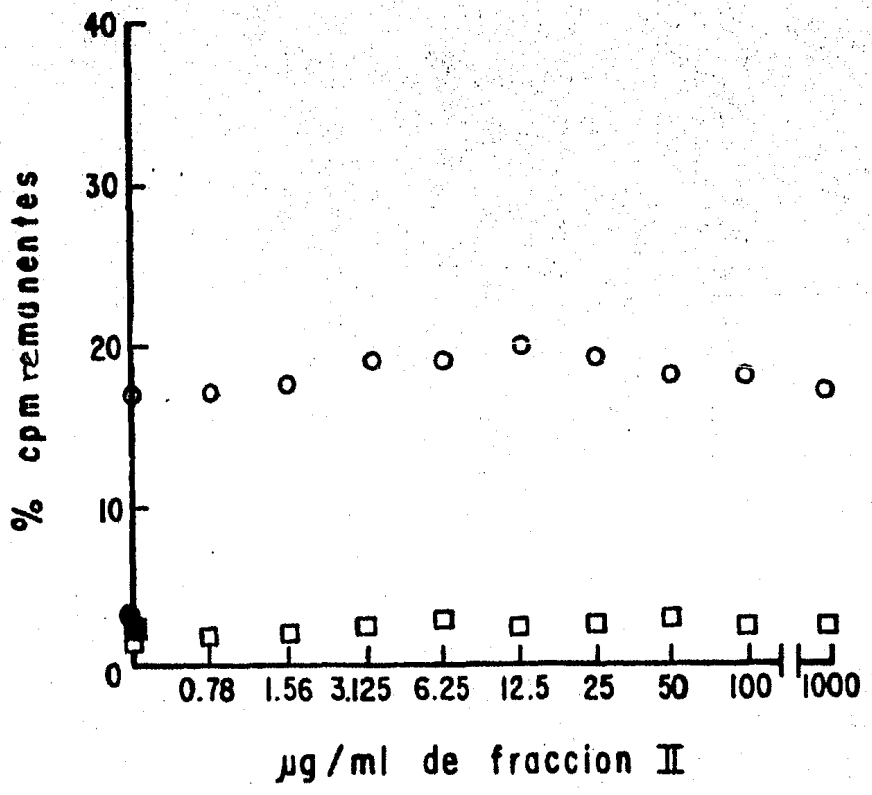
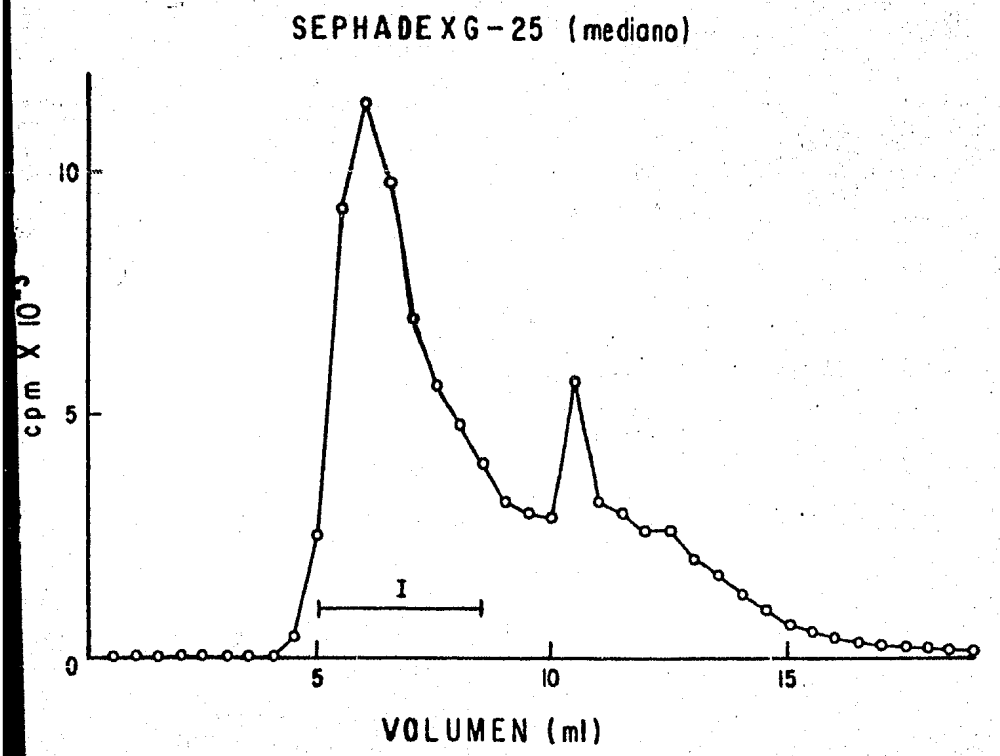


Figura 2. Variación de la concentración de antígeno acoplado a placas de cloruro de polivinilo (PVC).
Se aplicaron 100 µl de la Fracción II en concentraciones desde 1 mg/ml hasta .780 µg/ml (o). 50 µl por pozo de suero inmune 1/20 y 20 000 cpm en 50 µl de ^{125}I anticuerpos de conejo a Ig de ratón. Controles: suero normal 1/20 (▣); suero inmune (●) y suero normal (■) sin antígeno.



gura 3. Purificación de ^{125}I FII por filtración en gel en Sefadex G-25. Se íodinó FII por el método de cloramina T para péptidos sensibles. Se separó el iodo libre de ^{125}I FII (I, en la gráfica), en una columna de 10 ml de Sefadex G-25. Las condiciones de corrida se indican en la figura 17.

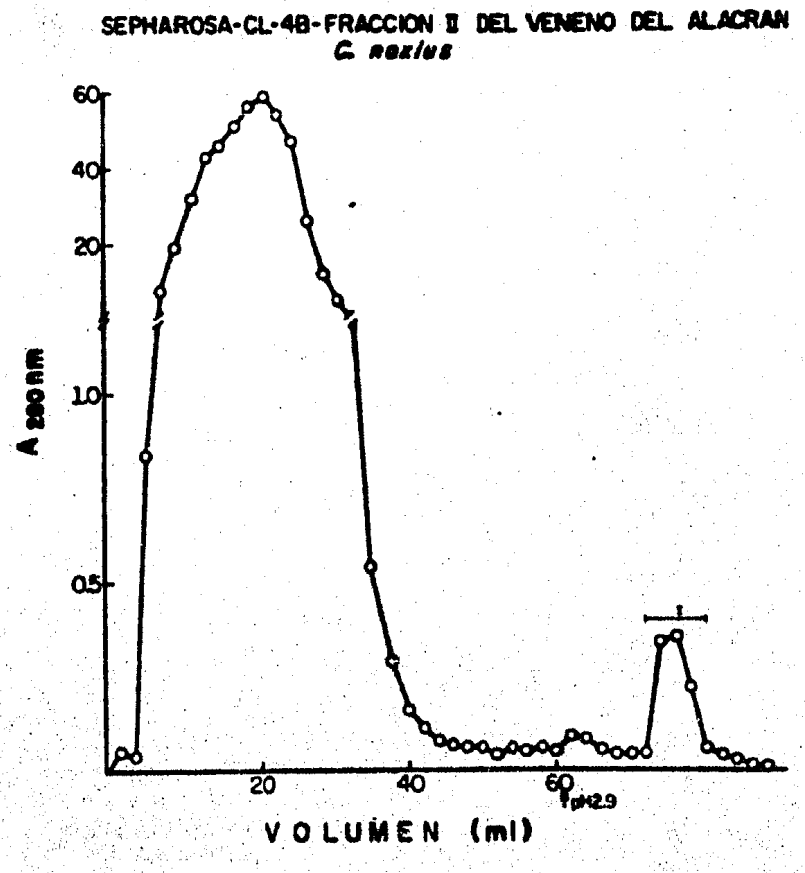


Figura 4. Purificación de anticuerpos murinos anti-FII por cromatografía de afinidad en Sefarosa Cl-4B-FII. Se aplicaron 12 ml de suero de ratón inmune (A_{280} 0.62). Se lavó la columna (8 x 1.5 cm) con Tris HCl 0.1 M pH 7.95 a un flujo de 30 ml/hr. Se eluyó la columna con glicina -- HCl 0.05 M pH 2.9 a un flujo de 45 ml/hr. Las fracciones de la elución se recolectaron en 100 µl/tubo de Tris HCl .1 M pH 7.95.

CPM DE ANTICUERPOS DE CONEJO ANTI-IGG DE RATON PEGADAS

Diluciones 1:	Suero inmune de ratón + FII	Suero inmune de ratón - FII	Suero normal de ratón + FII	Suero normal de ratón - FII	Sin suero + FII	Sin suero - FII
					320	179
					314	220
					276	209
5	15 930	1 757	1 649	1 799		
	13 481	1 610				
10	13 126	1 387	1 309	1 023		
	12 416	1 733				
20	12 356	1 179				
	9 377	1 710	1 113	772		
40	10 821	1 117				
	8 813	1 434	770	787		
80	11 461	723				
	9 065	963	559	1 134		
160	8 555	583	443	977		
	6 485	882				
320	6 398	388				
	6 729	518	429	1 065		
640	4 754	391				
	4 228	552	394	524		
1 280	4 811	336				
	4 274	462	353	305		

Figura 7. Determinación cuantitativa de la sensibilidad del RIE en placas de PVC, utilizando suero inmune.

Utilizamos 100 µl de la fracción II del veneno de alacrán (ver texto) a 1 mg/ml (control: sin toxina); BSA 1% para cubrir los sitios libres de la placa; 50 µl suero de ratón inmunizado con 100 µg de toxoide en ACF una vez y tres semanas después con 200 µg de toxoide en PBS, (controles: - suero de ratón no inmune o normal, y sin suero); 200,000 cpm de ^{125}I inmunoglobulinas de conejo anti-IgG de ratón. Controles negativos: suero normal en presencia y ausencia de antígeno, suero inmune en ausencia de antígeno.

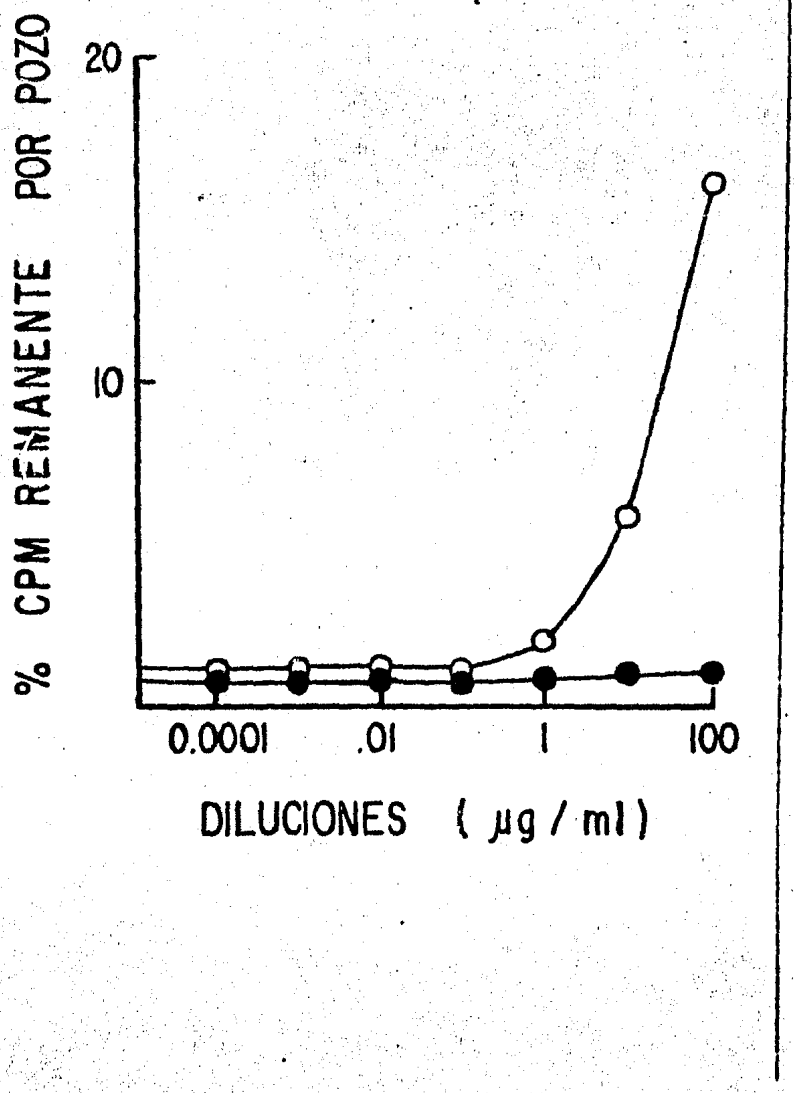


Figura 8. Determinación de la sensibilidad del RIE en PVC utilizando anticuerpos puros anti-FII (o-o). Condiciones mencionadas en figura 6. Control: Inmunoglobulinas de ratón (•-•).

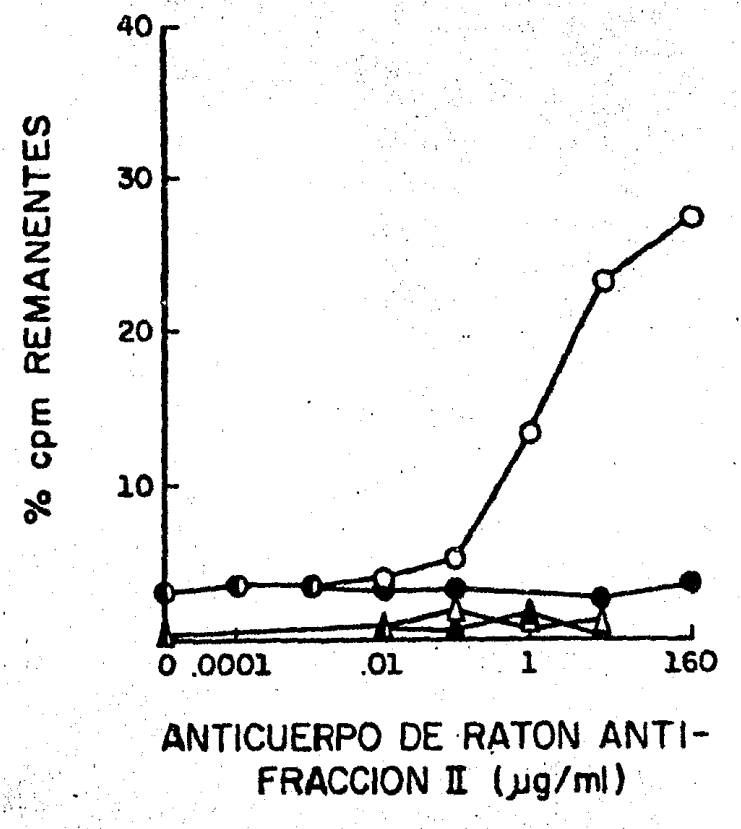


Figura 9. Determinación de la sensibilidad del RIE - en discos de celulosa utilizando anticuerpos murinos anti-FII, puros (o-o). Controles: Inmunoglobulinas de ratón en presencia (●-●) y ausencia (▲-▲) de antígeno, anticuerpos anti-FII en ausencia de antígeno (▲-▲) condiciones generales: Material y - Métodos.

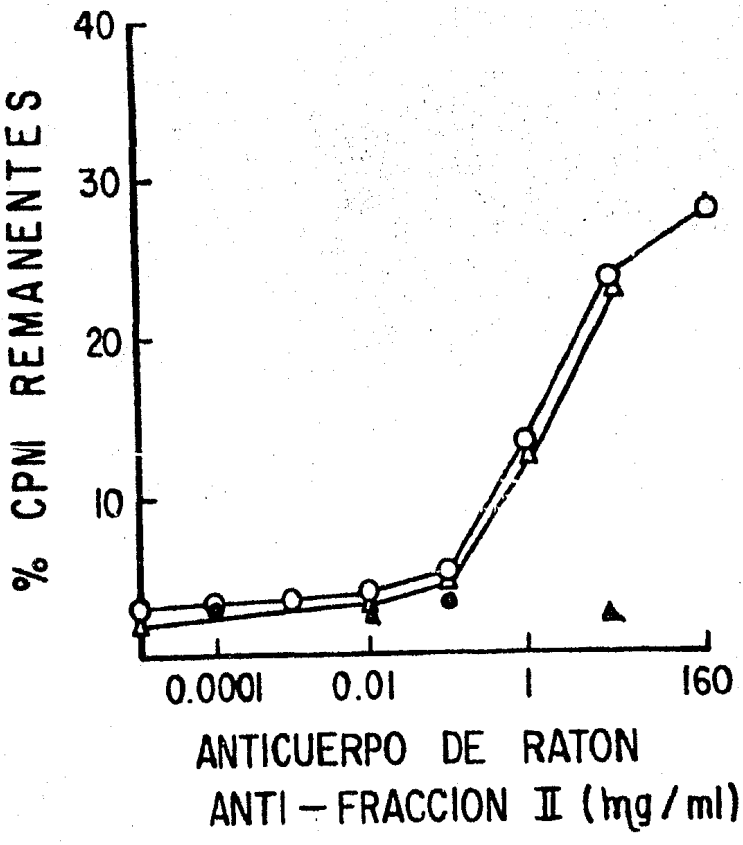


Figura 10. Variación en el tiempo de incubación del primer anticuerpo con FII acoplada a discos de celulosa.
Se incubaron por 15(o-o) y 30 min (▲-▲), 50 ul de anticuerpo murino anti-FII en diferentes concentraciones con discos de celulosa-FII. Control: Inmunoglobulinas de ratón 15 (●) y 30 min (▲). Condiciones generales: Material y Métodos.

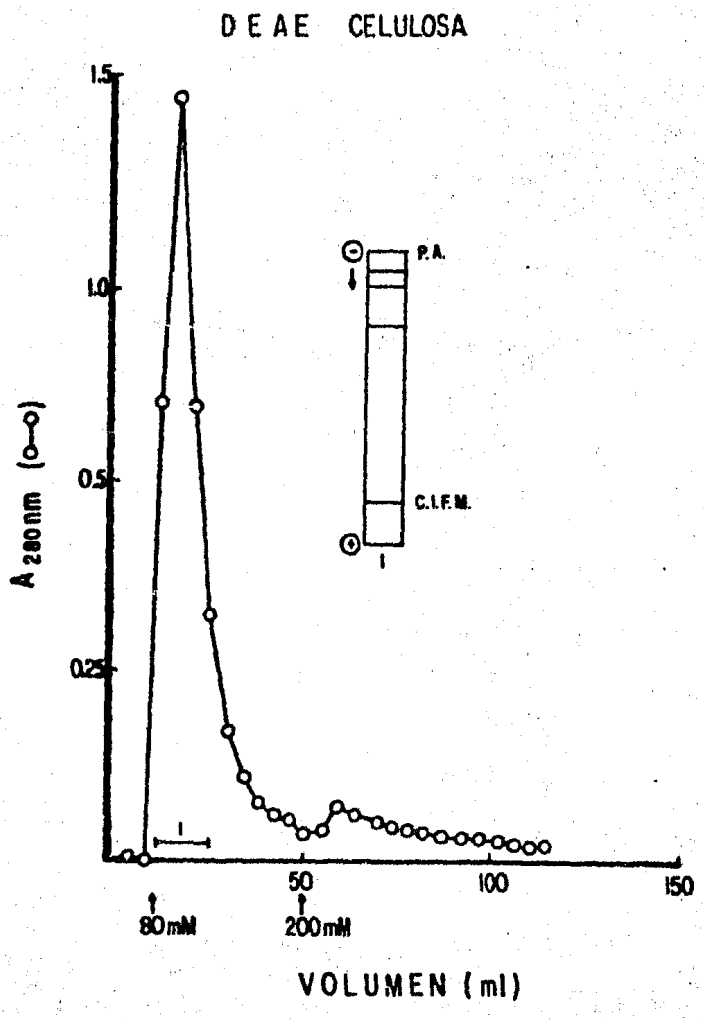


Figura 11. Purificación por intercambio iónico (DEAE celulosa de la fracción del suero de ratones obtenida precipitando por sulfato de amonio y luego dializando contra un buffer de Tris-HCl 25 mM pH 6.95 con 80 mM Na Cl.
Se aplicaron 51.4 mg/9.2 ml a una columna (23 x 0.9 cm) equilibrada con el mismo buffer de diálisis, se eluyó la muestra también con este buffer a un flujo de 30 ml/Hr, después de colectar 50 ml (5 ml/tubo) se eluyó con alta fuerza iónica (200 mM Na Cl) colectándose otros 50 ml al mismo flujo.
Además se corrió una electroforesis en gel de poliacrilamida al 8% con SDS, de la fracción 1 (P.A. Punto de aplicación C.I.F.M. colorante indicador del frente de movimiento.

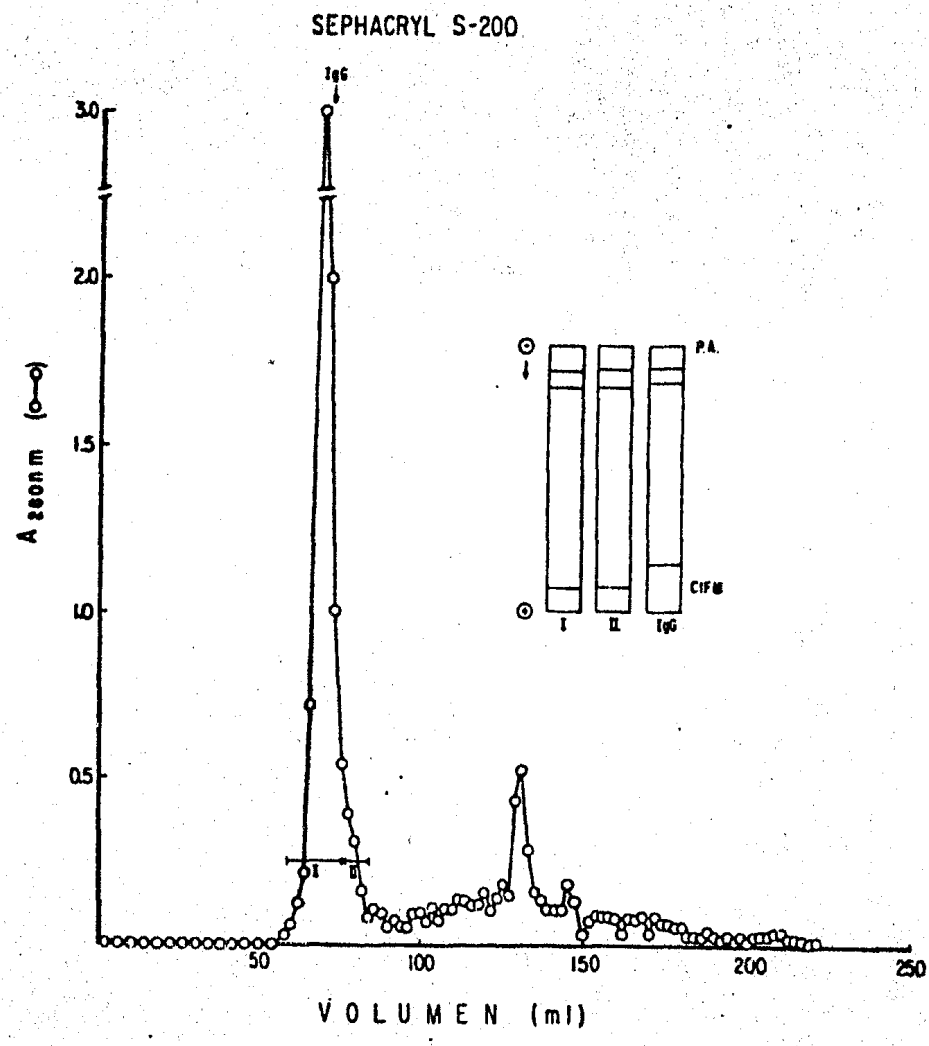


Figura 12. Purificación de Inmunoglobulinas de ratón por filtración en gel (Sephacryl S-200) se aplicaron 23 mg/12 ml de una fracción del suero purificado previamente por precipitación con sulfato de amonio y luego por DEAE celulosa. La columna - (200 x 0.9 cm) ya equilibrado con Tris-HCl 20 mM (con 1 mM de NaCl) pH 6.95 se corrió a un flujo de 9.6 ml/hr, y utilizando este mismo buffer. Se colectaron 30 gotas/tubo/110 - tubos.
Se calibró la columna con inmunoglobulina comercial (IgG

Además se corrió una electroforesis en gel de poliacrilamida al 8% con SDS, de las fracciones I y II, y de IgG comercial.

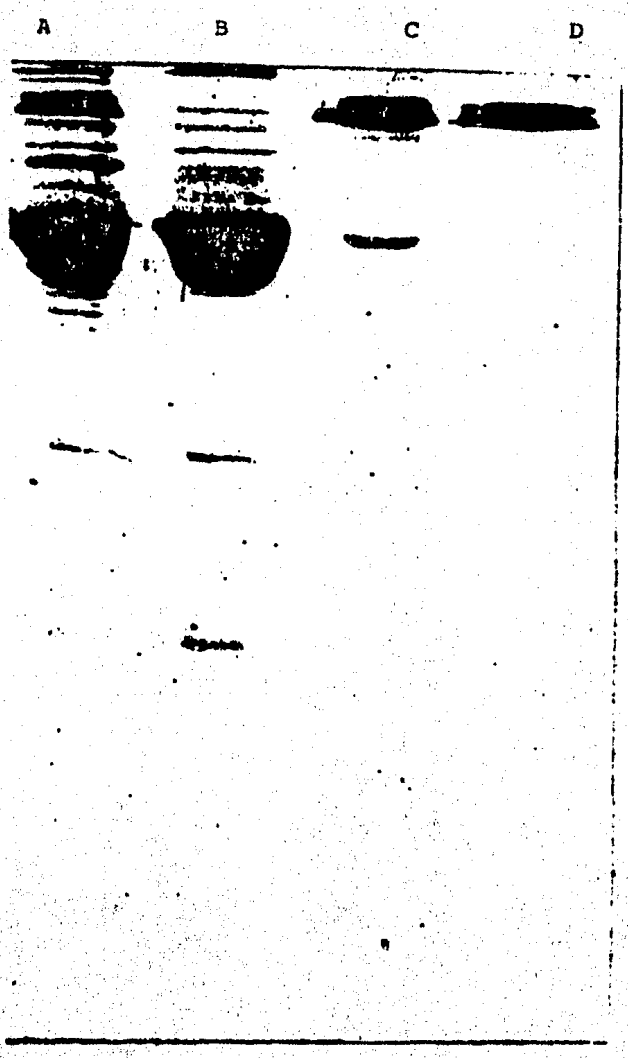


Figura 13. Electroforesis en gel de acrilamida-SDS de inmunoglobulinas de ratón en diferentes pasos de purificación. - A. Suero completo de ratón; B. Sobrenadante del suero precipitado con sulfato de amonio; C. Sedimento de la precipitación con sulfato de amonio; D. Purificación de la muestra - "C" por DEAE celulosa y Sephacryl -- S-200.

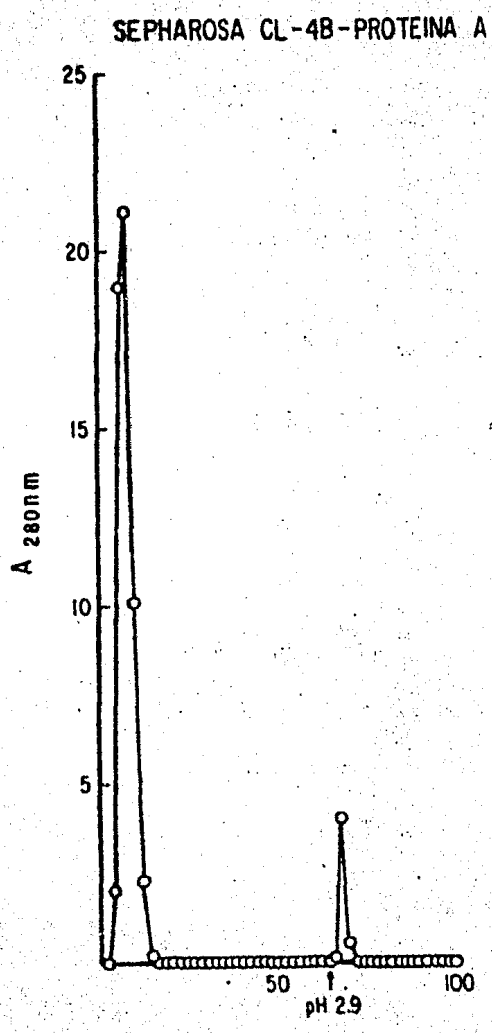


Figura 14. Purificación de IgG de ratón por su afinidad de la proteína A de Staphylococcus aureus. La columna (10 x .8 cm) de proteína A-Sepharosa Cl-4B se corrió en las mismas condiciones que las indicadas en la Figura 4.

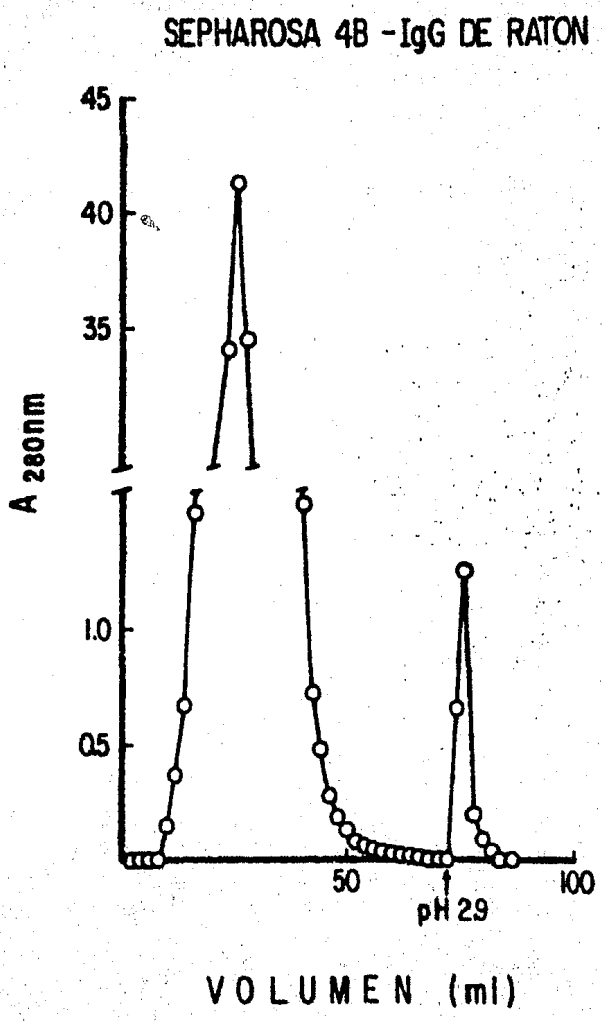
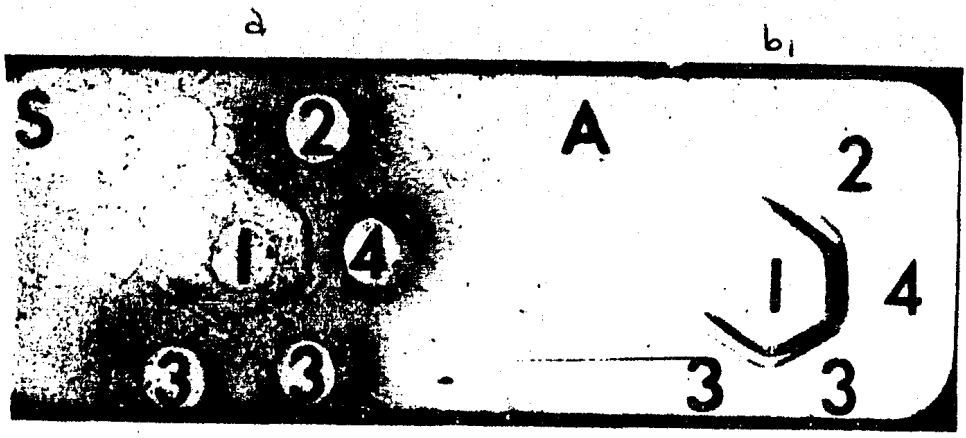


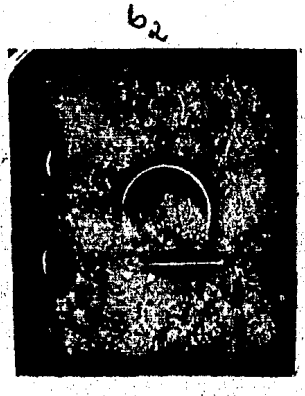
Figura 15. Purificación de anticuerpos de conejo a inmunoglobulinas de ratón por una columna de afinidad Sepharosa 4B Inmunoglobulinas de ratón.
Aplicamos 6.5 ml de suero obtenido centrifugando la -- sangre del conejo inmunizado, a la columna (30 x .9 cm) equilibrada con buffer Tris-HCl .1 M pH 7.95, se eluyó la muestra con este buffer a un flujo de 30 ml/hr, se colectaron 30 tubos (32 gotas/tubo) y enseguida, se -- eluyeron los anticuerpos con buffer de glicina-HCl - 0.05 M pH 2.9 a un flujo de 40 ml/hr recolectándose 20 tubos (32 gotas/tubo) cada uno conteniendo 100 µl del buffer Tris-HCl (1 M pH 7.95 para neutralizar el pH en que se encuentran las inmunoglobulinas.



Centro en a y b_1: Inmunoglobulinas de ratón purificadas por DEAE-Celulosa y Sephacryl S-200.

Alrededor en a : Sueros de los conejos No. 2, No. 3 y No. 4 anti-inmunoglobulinas de ratón.

Alrededor en b : Anticuerpos de conejo anti-inmunoglobulinas de ratón purificados por cromatografía de afinidad.



Centro en b_2: Inmunoglobulinas de ratón purificadas en Sepharosa-proteína A.

Figura 16. Detección de la actividad de los anticuerpos de conejo anti-inmunoglobulinas de ratón, por dobleinmunodifusión (DI). Se inmunizaron tres conejos (Nos. 2, 3, y 4) con 0.3 mg de inmunoglobulinas puras primero en adyuvante completo y luego en adyuvante incompleto, cada quince días; sangrando cada semana.

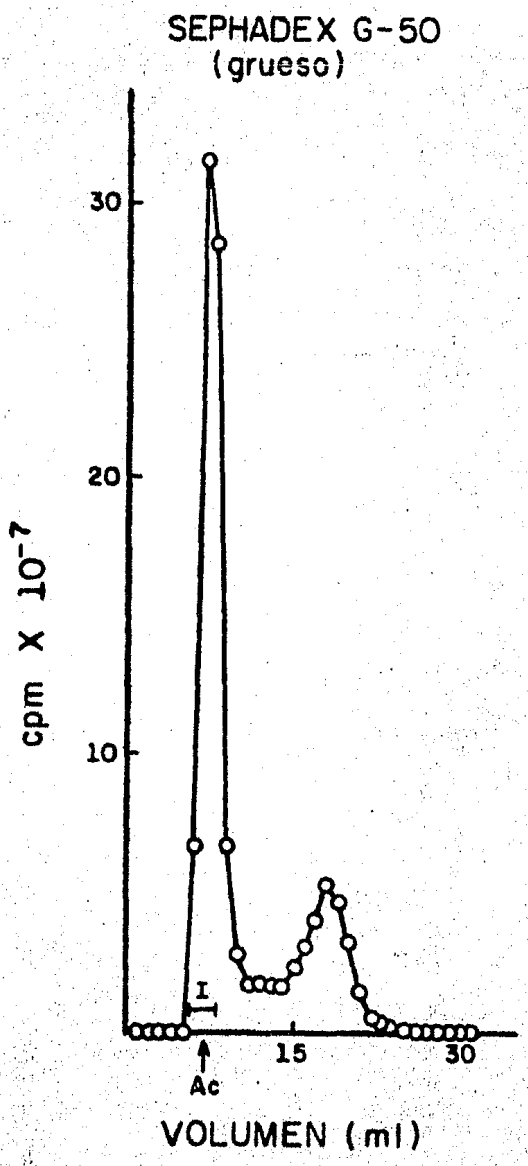


Figura 17. Purificación de ^{125}I anticuerpos de conejo anti-inmunoglobulinas. Se iodinaron por el método de cloramina-T. El iodo libre se separó de la proteína por filtración en gel en Sephadex G50 (grueso).
Se aplicó la muestra a la columna (30 x .7 cm) equilibrada con PBS + BSA 0.2% + KI 0.25 M + azida de sodio 0.02% y eluida manualmente con el mismo amortiguador (flujo aproximado 20 ml/hr) y recolectando 20 tubos (2 ml/tubo).

CPM DE ANTICUERPOS DE CONEJO ANTI-IgG DE RATON PEGADAS

	^{125}I Ig Conejo	Ig de Ratón (50,000 cpm)	
Diluciones 1:	Suero inmune (1:20)	Suero normal (1:20)	Sin suero
1	10 114	1 474	253 269
2	4 007	521	
4	1 950	362	
8	953	197	
16	532	114	
32	318	70	

Figura 18. Variaciones de la concentración de ^{125}I-anticuerpos de conejo anti-inmunoglobulinas de ratón, en el RIE en discos de celulosa.

Aplicando 100 µl de la fracción II del veneno de alacrán a (1 mg/ml); suero inmune 1:20 (Controles: suero normal 1:20, sin suero); y diluyendo los anticuerpos iodados vemos que tan solo 12 500 cpm serían suficientes para detectar anticuerpos en contra de la fracción II.

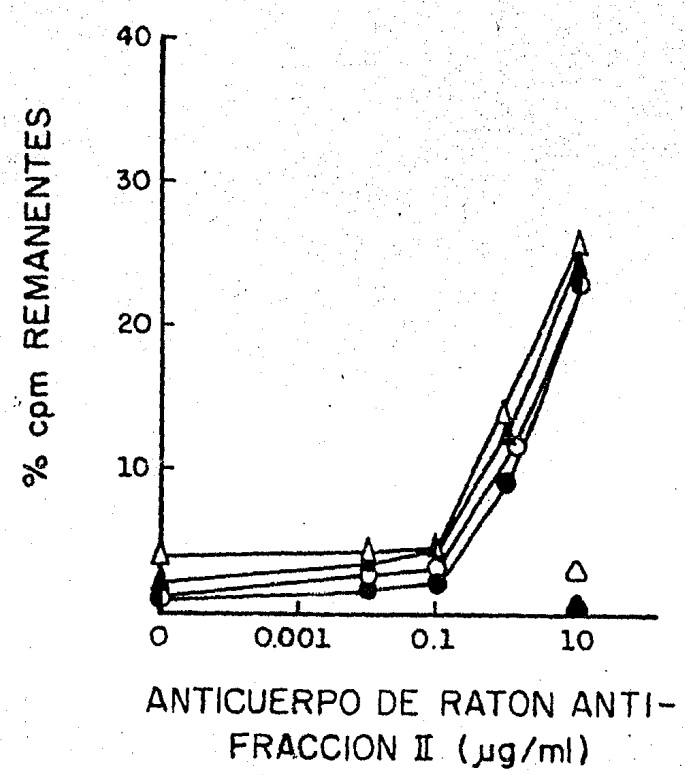
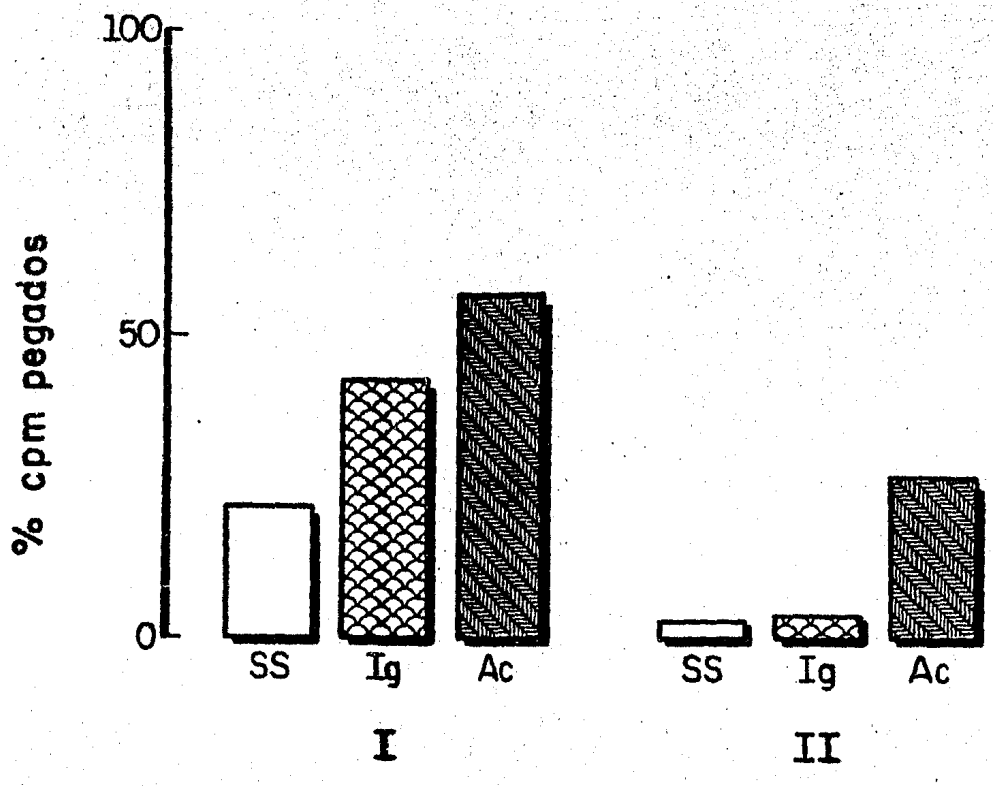


Figura 19. Variaciones de la concentración de ^{125}I anticuerpos de conejo anti-inmunoglobulinas de ratón en el RIE en discos de celulosa.
Se utilizan concentraciones del segundo anticuerpo de 20 000 (▲-▲), 40 000 (o—o), 80 000 (△---△) y 160 000 (●-●) cpm/50 ml.
Control: Inmunoglobulinas de ratón en presencia (●) y ausencia (■) de antígeno, anticuerpos anti-FII en ausencia de antígeno (△).
Condiciones generales: Material y Métodos.



	I	II
Primer anticuerpo	11%	1%
Segundo anticuerpo	22%	3%

Figura 20. Reducción de la reacción inespecífica en el RIE en discos de celulosa.
I. Porciento de cpm remanentes en discos de celulosa al final del ensayo utilizando: I BSA al 0.1% y cinco lavados con PBS-TWEEN .05% entre cada paso del RIE: II BSA al 1% y diez lavados con PBS-TWEEN .05% y 50 ul de anticuerpo anti-FII (▬) e inmunoglobulinas de ratón (▭) en una concentración de 1 ug/ml o PBS (▭).
Condiciones generales: Material y Métodos.

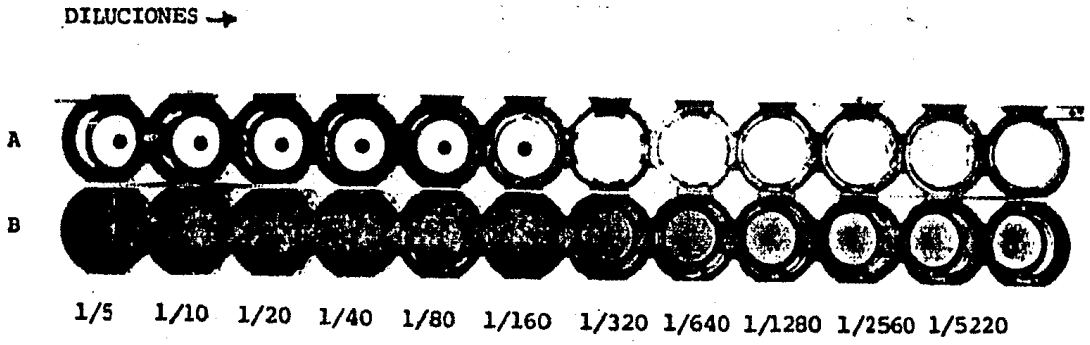


Figura 21. Montaje de la técnica de hemaglutinación de eritrocitos de carnero.
Se aplicaron diluciones secuenciales de 1:2 empezando con 1:5 de suero murino inmune anti-eritrocitos de carnero (B). Control: suero murino normal en las mismas concentraciones (A) - Condiciones generales: Material y Métodos.

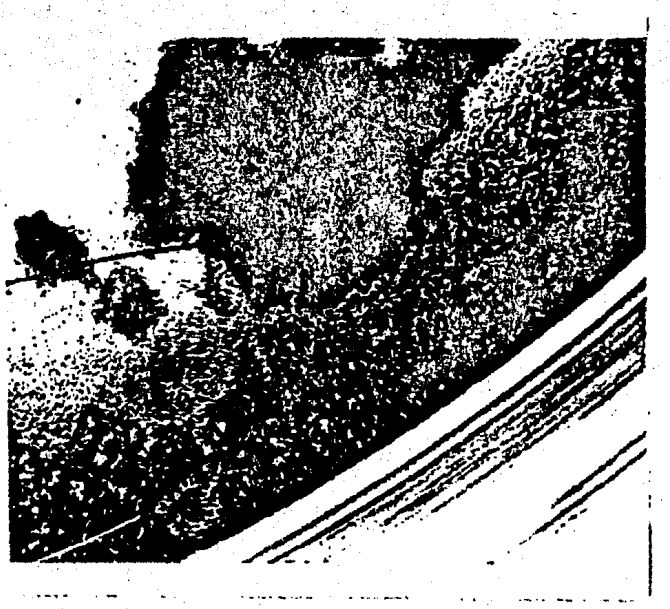


Figura 22. Detección por microscopía óptico invertido (aumento 4X) de una clona de células híbridas.

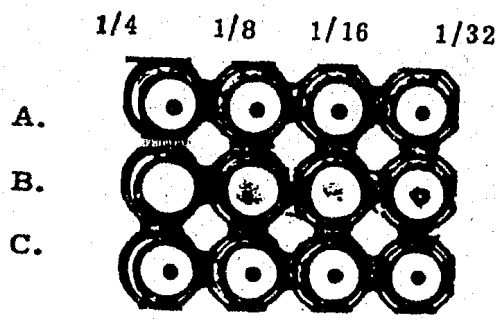
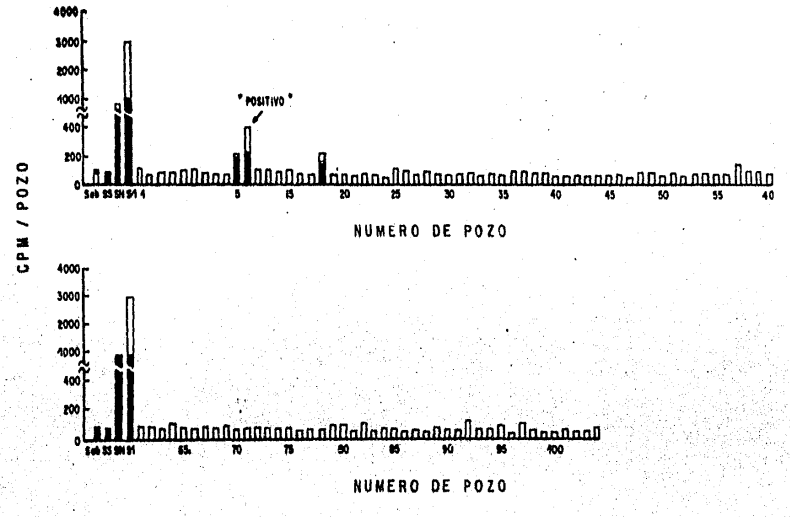


Figura 23. Detección de un hibridoma en contra de eritrocitos de carnero con sus respectivos controles (ver también figura 3), por hemaglutinación.

A. Sobrenadante de un pozo sin crecimiento.
B. Sobrenadante de un pozo con crecimiento y actividad anti-eritrocitos de carnero (hibridoma).
C. Sobrenadante de un pozo con crecimiento, pero sin actividad anti-eritrocitos de carnero.

Figura 24. Ensayo de sobrenadantes de los híbridos por RIE, en placas de PVC.
Se tomaron 50 µl del sobrenadante de cada pozo y siguiendo el protocolo mencionado (Material y Métodos) se midieron las cpm remantes por pozo - Controles: 50 µl de suero murino inmune (SI) -- suero normal (SN), PBS (SS) o del sobrenadante de un pozo sin crecimiento celular (SC); todos y cada uno con (▭) y sin (▬) antígeno.
Condiciones generales: Material y Métodos.



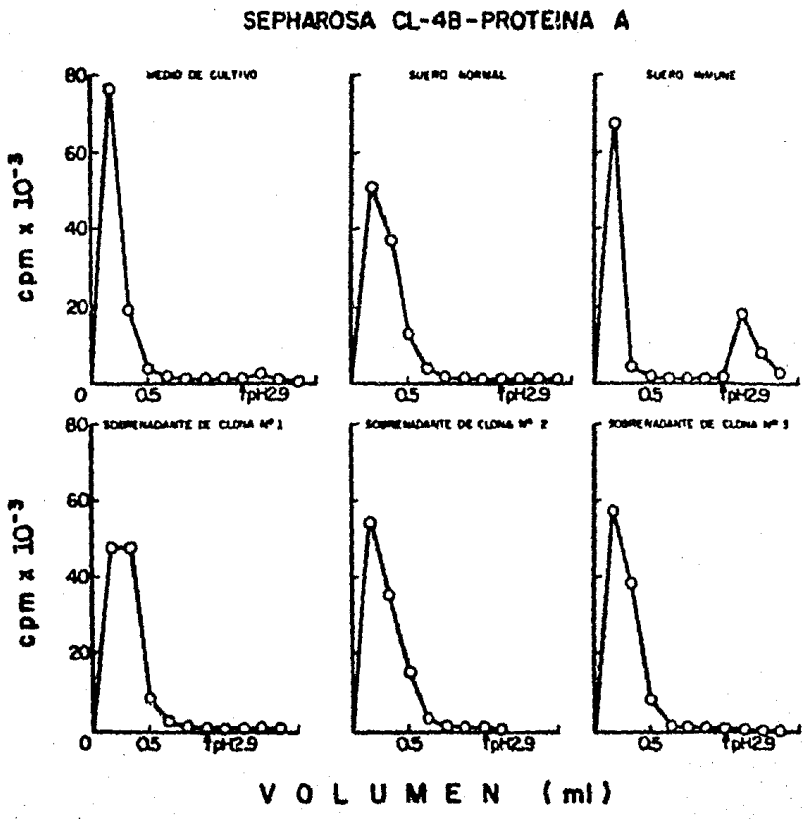


Figura 25. Por cromatografía de afinidad en Sepharosa-proteína A se ensayaron sobrenadantes de clonas "positivas" con sus respectivos controles. Se incubó cada columna con 200 ul de la muestra indicada por 30 min; enseguida se aplicaron aproximadamente 70 x 10^3 cpm de ^{125}I Fracción II y se incubó por 15 min. La elución se llevó a cabo por el procedimiento mencionado en figura 8.

Figura 26. Ensayo del sobrenadante de híbridos celulares, por RIE en discos de celulosa. Indicaciones mencionadas en Fig. 24. Para los controles se utilizaron en lugar de suero, anticuerpo anti-FII e inmunoglobulinas puras en concentraciones de .01, .1, y 10 μg/ml.

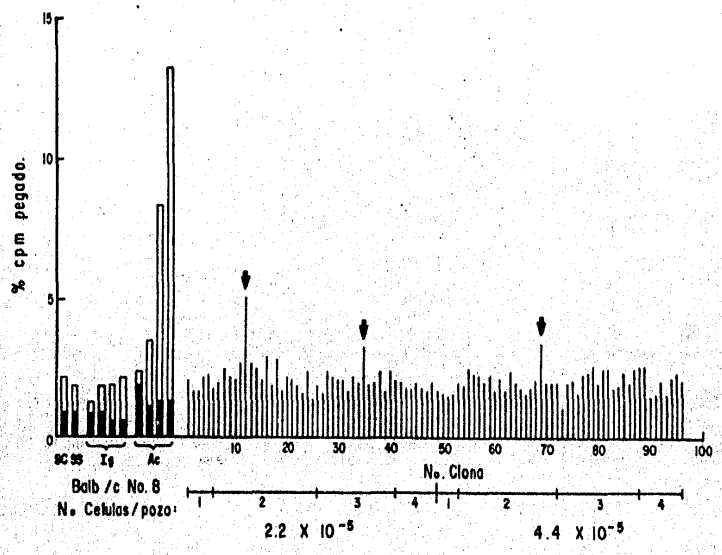
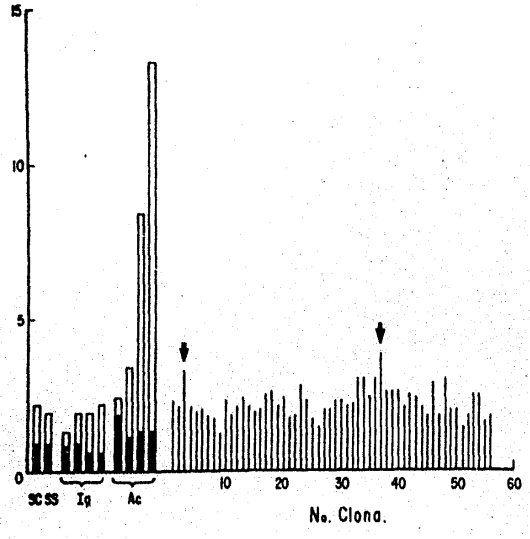


Figura 27. Ensayo del sobrenadante de híbridos por RIE en discos de celulosa. Indicaciones mencionadas en Fig. - 26.



REFERENCIAS

1. Adetugho K., Milstein C. y Secher D.S. 1977. Molecular analysis of spontaneous somatic mutants. Nature 265: 299.

2. Ahkong Q.F., Cramp F.C., Fisher D., Howell J.I. y Lucy J.A. 1972. Studies on chemically induced cell fusion. J. Cell. Sci. 10: 769.

3. Ahkong Q.F., Fisher D., Tampion W. y Lucy J.A. 1973. The fusion of erythrocytes by fatty acids esters, retinol and -tocophenol. Biochem. J. 136: 147.

4. Ahkong Q.F., Fisher D., Tampion W. y Lucy J. A. 1975. Mechanisms of cell fusion. Nature 253: 194.

5. Alagón A., Possani L.D., Erickson B.W. 1978. Isolation and characterization of several proteins from *Tityus serrulatus* scorpion venom. Proc. 5th. Inter. Symp. on Animal, Plant and Microbial Toxins. San José, Costa Rica. Pergamon Press, New York pp. 609-618.

6. Alagón A., Possani L.D. 1981. Utilización de cromatografía por afinidad para la purificación de enzimas de venenos animales. I Simp. Intern. sobre Biotecnología de Enzimas.

7. Anné J. Eyssen H. y De Somer P. 1976. Somatic hibridisation of *Penicillium roquefortti* with *P. crysogenum* after protoplast fusion. Nature 262: 719.

8. Babin D.R., Watt D.D., Goos S.M., Mlejnek R.V. 1974. Aminoacid sequence of neurotoxic protein variants from the venom of *Centruroides sculpturatus* Ewing. Arch. Biochm. Bioph. 164: 694-706.

9. Balozet L. 1971. Scorpionism in the old world, In: Venomous Animals and their Venoms. Eds. Bücherl, W., Buckley E.E. vol. III. Academic Press, New York pp 349-371.

10. Bankert R.B., DesSoye D., Powers L. 1980. Antigen-promoted cell fusion: antigen-coated myeloma cells fuse with antigen reactive spleen cells. Transplantation Proceedings XII(3): 443-446.

11. Baumal R. and Scharff M.D. 1973. Synthesis, assembly and secretion of mouse immunoglobulin. Transplant. Rev. 14: 163.

12. Bravo-Becherelle M.A. y Mazzoti L. 1961. Distribución geográfica de la mortalidad por picadura de alacrán en México. Rev. Inst. Sal. Enf. Trop. (Méx.) 21: (3-4) 129-140.

13. Bücherl W. 1971. Classification biology and venom extraction of scorpions. In: Venomous animals and their venoms. Eds. Bücherl, W., Buckley E.E. Vol. III. Academic Press, New York, London pp. 317-347.

14. Carbone, E., Prestipino, G., Wanke, E., Possani, L.D. y Maclicke, A. 1983. Selective action of scorpion neurotoxins on the ionic currents of the squid giant axon. Toxicon 3: 57-60.

15. Carbone E., Wanke E., Prestipino O., Possani L.D., Maelicke A. 1982. Selective blockage of voltage dependent K^+ channels by a novel scorpion toxin. Nature 296: 90-91.

16. Cebra J.J., Koo P.H. and Ray A. 1974. Specificity of antibodies: Primary structural basis of hapten binding. Science 186: 263.

17. Ceska M., Lundkvist V. 1972. A new and simple radioimmunoassay method for the determination of IgE. Immunochemistry 9: 1021-30.

18. Chicheportiche R., Lazdunski M. 1970. The conformation of small proteins. The state diagram of a neurotoxin of Androctonus australis Hector. Ew. J. Biochem. 14 549-555.

19. Civin C.I., Banquerigo M.L., 1983. Rapid, efficient cloning of murine hybridoma cells in low gelation temperature agarose. J. Immunol. Methods 61: 1-8.

20. Cleveland W. L., Wood I., Erlanger B.F.; 1983. Routine large-scale production of monoclonal antibodies in a protein free culture medium. J. Immunol. Methods 56: 221-234.

21. Cohn M., 1967. Natural history of the myeloma. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 32: 211. Cold Spring Harbor Symposia and Quantitative Biology. 1967 Vol. 32, Antibodies.

22. Cotton R.G.H. and Milstein C.; 1973. Fusion of two immunoglobulin producing myeloma cells. Nature 244: 42.

23. Davidson R.L., Ephrussi B.; 1965. A selective system for the isolation of hybrids between L cells and normal cells. Nature (London) 205: 1170-1.

24. Davidson R.L., O'Malley K.A. y Whecler T.B.; 1976. Polythilene glycol-induced mammalian cell hybridization: effect of polyethyleneglycol molecular weight and concentration. Somat. Cell Genet. 2: 271-280.

25. Del Pozo E.C. 1962. Estudios experimentales sobre las acciones del veneno de alacrán. Rev. Inst. Sal. Enf. Trop. (Méx.) 22(3-4): 173-178.

26. Dent M.A.R., Possani L.D., Ramírez G.A., Fletcher P.L.Jr.; 1980. Purification and characterization of two mammalian toxins from the venom of the mexican scorpion Centruroides noxius Hoffmann. Toxicon 18: 343-350.

27. Dent M.A.R.; 1983. Aislamiento y caracterización química de diversas toxinas del veneno del alacrán Centruroides noxius Hoffmann. Tesis de Maestría. Facultad de Química, UNAM.

28. Dunn M.J.; 1974. Red blood cell calcium and magnesium: effects upon sodium and potassium transport and cellular morphology. Biochim. Biophys. Acta 352: 97.

29. Fazekas de St. Groth S. y Scheidegger D.; 1980. Production of monoclonal antibodies: Strategy and tactics. J. Immunol. Methods. 85: 1-21.

30. Flores R.; 1963. Observaciones sobre la sintomatología y tratamiento de la intoxicación por picadura de alacrán. Rev. Ins. Sal. Enf. Trop. (Méx.) 23(3-4): 175-178.

31. Fontecilla-Camps J.C., Almassy R.J., Suddath F.L., Watt D.D. y Bugg Ch.E.; 1980. Three dimensional structure of a protein from scorpion venom: A new structural class of neurotoxins. Proc. Natl. Acad. Sci. 77(11): 6496-6500.

32. Fox P.C., Berenstein E.H., Siraganian R.P.; 1981. Enhancing the frequency of antigen-specific hybridomas. Eur. J. Immunol. 11: 431-343.

33. Francus T. and Birshtein B.K.; 1978. An IgG 2a-producing variant of an IgG 2b-producing mouse myeloma cell line. Structural studies on the Fc region of pa-ent and variant heavy chains. Biochemistry 17: 4324.

34. Galfre G., Howe S.C., Milstein C., Butcher G.W. y Howard J.C.; 1977. Antibodies to major histocompatibility antigens by hybrid cell lines. Nature 266: 550-552.

35. Galfre G., Milstein C. y Wright B. 1979. Rx rat hybrid myelomas and a monoclonal anti-Fd portion of mouse IgG. Nature 277: 131.

36. García G.P.; 1976. Étude des neurotoxines du venin du scorpion mexican Centruroides suffusus suffusus. Francia. Tesis (Doctorado) Universidad de Nice, Francia.

37. Goding J.W.; 1980. Antibody production by hybridomas. J. Immunol. Methods 39(4): 285-308.

38. Goldsby R.A., Osborne B.A. y Herzenberg L.A.; 1977. Hybrid cell lines with T-cell characteristics. Nature 267: 707-708.

39. Gómez M.V., Diniz C.R.; 1966. Separation of toxic components from the Brazilian scorpion Tityus serrulatus venom. Mem. Inst. Butantan Simp. Intern. 33(3): 899-902.

40. Haber E., Margolies M.N., y Cannon L.E.; 1977. en: Antibodies in Human Diagnosis and Therapy pp. 45-78, Raven Press, New York.

41. Haber F.; 1970. Antibodies of restricted heterogeneity of structural study. Fed. Proc. 29: 66.

42. Harris H., Watkins J.F.; 1965. Hybrid cells derived from mouse and man: artificial heterokaryons of mammalian cells from different species. Nature (London) 205: 640-6.

43. Helmreich F., Kern M., and Eisen H.N.; 1961. The secretion of antibody by isolated lymph node cells. J. Biol. Chem. 236: 464.

44. Hengartner H., Luzzati A.L., Schreier M.; 1978. Fusion of in vitro immunized lymphoid cells with X63 Ag8. Curr. Top. Microbiol. Immunol. 81: 92-9.

45. Hoffmann C.C.; 1938. Nuevas consideraciones acerca de los alacranes mexicanos. An. Inst. Biol. 9(1,2): 318-337.

46. Hoffmann C.C., Vargas R.; 1935. Contribuciones al conocimiento de los venenos de los alacranes mexicanos. Inst. Hig. 2(4): 182-193.

47. Hoogenraad N., Helman T., Hoogenraad J.; 1983. The effects of pre-injection of mice with pristane on ascites tumour formation and monoclonal antibody production. J. Immunol. Methods 61: 317-320.

48. Horibata K. y Harris A.W. 1970. Mouse myelomas and lymphomas in culture. Exp. Cell. Res. 60: 61.

49. Howard J.C., Butcher O.W., Galfree O. and Milstein C.; 1978. Monoclonal anti-rat MHC (H-1) alloantibodies. Curr. Top. Microbiol. Immunol. 81: 54.

50. Howard J.C. Butcher O.W., Galfré O., Milstein C., Milstein C.P.; 1979. Monoclonal antibodies as tools to analyze the serological and genetic complexities of major transplantation antigens. Immunol. Rev. 42: 139-74.

51. Hunter W.M., Greenwood F.C.; 1962. Preparation of iodine-131 labelled human growth hormone of high specific activity. Nature (Lond) 194: 495-6.

52. Kadish J.L. y Wenc K.M.; 1983. Contamination of polyethylene glycol with aldehydes: Implications for hybridoma fusion. Hybridoma 2(1): 87-89.

53. Kao F.T., Puck T.T.; 1974. Induction and isolation of auxotrophic mutants in mammalian cells. Methods Cell. Biol. 8: 23-39.

54. Kearney J.F., Radbruch A., Liesegang B., Rajewsky, K.; 1979. A new mouse myeloma cell line that has last immunoglobulin expression but permits the construction of antibody-secreting hybrid cell lines. J. Immunol. 123(4): 1548-50.

55. Kennett H., McKearn T.J. y Bechtol, K.B.; 1980. Monoclonal antibodies. Plenum. Press, New York.

56. Köhler O. and Milstein C.; 1975. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. Nature 256: 495.

57. Köhler O. y Milstein C.; 1976. Derivation of specific antibody-producing tissue culture and tumor lines by cell fusion. Eur. J. Immunol. 6: 511-519.

58. Köhler O., Howe S.C., Milstein C.; 1976. Fusion between immunoglobulin-secreting and nonsecreting myeloma cell lines. Ru. J. Immunol. 6(4): 292-5.

59. Köhler O., Pearson T., Milstein C.; 1977. Fusion of T and B cells. Somatic Cell Genet. 3(3): 303-12.

60. Köhler O., Hengartner H., Shulman M.J.; 1978a. Immunoglobulin production by lymphocyte hybridomas. Eur. J. Immunol. 8(2): 82.

61. Köhler O., Shulman M.J.; 1978b. Cellular and molecular restrictions of the lymphocyte fusion. Curr. Top. Microbiol. Immunol. 81: 143-8.

62. Kopeyan C., Martínez O., Lissitzky S., Miranda F., Rochat H.; 1974. Disulfide bonds of toxin II of the scorpion Androctonus australis Hector. Eur. J. Bioch. 47: 483-489.

63. Kosower N.S., Kosower E.M. y Wegman P.; 1975. Membrane mobility agents. II. Active promoters of cell fusion. Biochim. Biophys. Acta 401: 530-534.

64. Koznor D. y Roder J.C.; 1981. Requirements for the establishment of high-titered human monoclonal antibodies against tetanus toxoid using the Epstein-Barr virus technique. J. Immunol. 127(4): 1275-1280.

65. Krause R.M.; 1970. The search for antibodies with molecular uniformity. Adv. Immunol. 12: 1.

66. Kuchl W.M.; 1977. Synthesis of immunoglobulin in myeloma cells. Curr. Top. Microbiol. Immunol. 76: 1.

67. Laskov R., y Scharff, M.D.; 1970. Synthesis, assembly and secretion of gamma globulin by mouse myeloma cells. J. Exp. Med. 131: 515.

68. Littlefield J.W.; 1964. Selection of hybrids from matings of fibroblasts in vitro and their presumed recombinants. Science 145: 709.

69. Luben R.A., Mohler M.A.; 1980. In vitro immunization as an adjunct to the production of hybridomas producing antibodies against the lymphokine osteoclast activating factor. Mol. Immunol. 17(5): 635-9.

70. Luben R.A., Brazeaw P., Böhlen P., Guillermin R.; 1982. Monoclonal antibodies to hypothalamic growth hormone-releasing factor with picomoles of antigen. Science 218: 887-889.

71. Lucy J. A.; 1977. The membrane of the hen erytrocyte as a model for studies on membrane fusion. In: The Structure of Biological Membranes (Abrahamson, S., ec.) Nobel Symposium No. 34, pp. 275-291, Plenum Press, New York.

72. Maggio B., Ahkong Q.F. and Lucy J.A.; 1976. Poly (ethyleneglycol) surface potential and cell fusion. Biochem. J. 158(3): 647-650.

73. Maggio B. y Lucy J.A.; 1976. Polar-group behaviour in mixed monolayers of phoepholipids and fusogenic lipids. Biochem. J. 155: 353-364.

74. Margulies D.H., Cieplinski W., Dharmgrongartama B., Gefter M.L., Morrison S.L., Kelly T. y Scharff M.D.; 1977. Regulation of immunoglobulin expression in mouse myeloma cells. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 41: 781.

75. Master R.W.S., Rao S., Soman P.D.; 1963. Electrophoretic separation of biologically active constituents of scorpion venom. Bioch. Biophs. Acta 71: 422.

76. Mayhew E.; 1972. Ion transport of ovabain resistant and sensitive Ehrlich ascites carcinoma cells. J. Cell Physiol. 79: 441-52.

77. Mazzoti L., Bravo-Becherelle M.A.; 1961. Escorpionismo en la República Mexicana. Rev. Ins. Sal. Enf. Trop. (Méx.) 21(1-2): 3-19.

78. McInstosh M., Watt D. 1973. Purification of toxins from the North American scorpion Centruroides sculpturatus In: Toxins of Animal and Plant Origin. Eds. A. De Vries and E. Kochva. Vol. 2, Gordon and Breach, New York pp. 529-544.

79. Milstein C. y Köhler O.; 1977. Cell fusion and the derivation of cell lines producing specific antibody in: Antibodies in Human Diagnosis and Therapy (E. Harber and R.M. Krause, eds.). Raven Press, New York, pp. 271-286.

80. Milstein C., Adetugho K., Cowan, N.J., Köhler O., Secher D.S. y Wilde C.D.; 1977. Somatic Cell genetics of antibody-secreting cells: Studies of clonal diversification and analysis by cell fusion. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 41: 793-803.

81. Miranda F., Rochat H., Lissitzky S.; 1960. Sur la neurotoxine du venin de scorpion. I. Purification a partir du venin de deux especes de scorpions nord-africains. Bull. Soc. Chim. Biol. (Paris) 42: 379-391.

82. Mohamed A.H., Kamel A., Ayobe M.H.; 1969. Studies of phospholipase A and B activities of egyptian snak- venoms and scorpion toxin. Toxicon 6: 293-298.

83. Nagai Y. y Klenk H.D.; 1977. Activation of precursors to both glycoproteins of Newcastle disease virus by proteolytic cleavage. Virology 77: 125.

84. Pardue R.L., Brady R.C., Perry G. W., Dedman J.R.; 1983: Production of monoclonal antibodies against calmodulin by "in vitro" immunization of spleen cells. J. Cell Biol. 96: 1149-1154.

85. Parikh I., March S., Cuatrecasas P.; 1974. Topics in the methodology of substitution reactions with agarose. Methods Enzymol. 34: 77-102.

86. Pettengill G.S. y Sorensen G.D.; 1967. Murine myeloma cells in suspension culture. Exp. Cell. Res. 47: 608.

87. Pontecorvo G., Riddle P.N. y Hales A.; 1977. Time and made of fusion of human fibroblasts treated with polythyleneglycol. (PEG). Nature 265: 257-258.

88. Possani L.D., Alagón A.C., Fletcher P.L. Jr. Erickson B.W. 1977. Purification and properties of mammalian toxins from the venom of the Brazilian scorpion Tityus serrulatus. Lutz. and Mello. Arch. Biochem. Biophys. 180 : 394-403.

89. Possani L.D., Ramírez G.A., Fletcher P.L. Jr., Gurrola M.A.H.; 1978. Isolation of two mammalian toxins from the venom of the mexican scorpion Centruroides elegans (Thorell). FEBS Letters 91(2): 261-264.

90. Possani L.D., Fletcher P.L. Jr., Alagón A.B.C., Alagón A.C., Juliá J.Z.; 1980. Purification and characterization of a mammalian toxin from venom of the mexican scorpion, Centruroides limpidus tecomanus Hoffmann. Toxicon 18: 175-183.

91. Possani L.D., Steinmetz W.E., Dent M.A.R., Alagón, A.C., Wüthrich, K.; (1981a. Preliminary spectroscopic characterization of six toxins from Latin American scorpions. Bioch. Bioph. Acta. 669: 183-192.

92. Possani L.D., Dent M.A.R., Martin B.M., Maelicke A., Svendsen I.; 1981b. The amino terminal sequence of several toxins from the venom of the mexican scorpion Centruroides noxius Hoffmann. Carlsberg Res. Commun. 46: 207-214.

93. Possani L.D., Martin B.M. Mochca-Morales J., Svendsen I.; 1981c. Purification and chemical characterization of the major toxins from the venom of the brazilian scorpion Tityus serrulatus Lutz and Mello. Carlsberg Res. Commun. 46: 195-205.

94. Possani L.D., Fernández de Castro J., Juliá J.Z.; 1981d. Detoxification with glutaraldehide of purified scorpion (Centruroides noxius Hoffmann) venom. Toxicon 19(2): 323-9.

95. Poste G. y Allison A.C.; 1973. Membrane fusion. Biochim. Biophys. Acta 300: 421.

96. Poter M.; 1972. Immunoglobulin producing tumors and myeloma proteins of mice. Phsyiol. Rev. 52: 631-719.

97. Potter M., Rudikoff S., Radlan E.A. y Urana M.; 1977. Covalent structure of the antigen binding site: Antigen-binding myeloma proteins of the BALB/c mouse, en: Antibodies in Human Diagnosis and Therapy (E. Haber and R.M. Krause eds.) Raven Press, New York pp 9-28.

98. Potter M.; L978. Antigen-binding myeloma proteins of mice. Adv. Immunol. 25: 141.

99. Power J.B., Cummins S.E. y Cocking E.C.; 1970. Fusion of isolated plant protoplasts. Nature 225: 1016-1018.

100. Power J.B. y Cocking E.C.; 1971. Fusion of plant protoplasts. Sci. Prog., Oxford 59, 181-198.

101. Pochat H., Rochat C., Kopeyan C., Miranda F., Lissitzky S., Edman P.; 1970. Scorpion neurotoxins: a family of homologous proteins. FEBS Lett. 10: 359-351.

102. Rochat H., Bernard P., Couraud F.; 1979. Scorpion Toxins: Chemistry and mode of action. In: Advances in Cytopharmacology Vol. 3, ed. B. Ceccarelli and F. Clementi. Raven Press, New York.

103. Sampieri F., Habersetzer-Rochat C.; 1975. Structure function relation ship of scorpio neurotoxins. Communication at the 4th International Symposium on Animal, Plant and Microbial Toxin. Tokyo (1974) Abstract: Toxicon 13: 120.

104. Schaeffer P., Cami B. and Hotchkiss R.D.; 1976. Fusion of bacterial protoplasts. Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 73: 2151-2155.

105. Scharff M.D.; 1974. The synthesis, assembly and secretion of immunoglobulin: A biochemical and genetic approach. Harvey Lect. 69: 125.

106. Scharff M.D. y Laskov R.; 1970. Synthesis and assembly of immunoglobulin polypeptide chains. Prog. Allergy. 14: 37.

107. Scheid A., Caliguiri L.A., Compans R.W. et al.; 1972: Isolation of paramyxovirus glycoproteins. Association of both hemagglutinating and neuraminidase activities with the larger SVS glycoprotein. Virology 50: 640-52.

108. Scheid A. y Choppin P.W.; 1973. Isolation and purification of the envelope proteins of Newcastle disease virus. J. Virol. 11: 263.

109. Scheid A. y Choppin P.W.; 1975. Activation of cell fusion and infectivity by proteolytic cleavage of a sendai virus glycoprotein. En: Proteases and Biological Control (Reich E., Rifkin D.B. y Shaw E., eds.) p.p. 645-659. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Narbor, New York.

110. Scheid A., Choppin P.W.; 1977. Two disulfide-linked polypeptide chains constitute the active F protein of paramyxoviruses. Virology 80(1): 54-66.

111. Selvarajan V.R., Narayana Reddy K., Swami K.S.; 1975. Scorpion venom effects on succinate dehydrogenase activity of sheep tissues. Toxicon 13: 143-144.

112. Shulman M., Wilde C.D. y Köhler G.; 1978. A better cell line for making hybridomas secreting specific antibodies. Nature 276: 269.

113. Shulov A., Levy G.; 1978. Venoms of Buthinal. In: Arthropod Venoms Handbook of Experimental Pharmacology Vol. 48 Ed. Sergio Bettini. Springer-Verlag, New York. pp. 309-317.

114. Stähli C., Staehelin T., Miggiano V., Schmidt J. y Haring P.; 1980. High frequencies of antigen-specific hybridomas: Dependence on immunization parameters and prediction by spleen cell analysis. J. Immunol. Methods 32: 297.

115. Szybalski W., Szybalska E.H., Ragni G.; 1962. Genetic studies with human cell lines. Nat. Cancer Inst. Monogr. 7: 75-89.

116. Tanford C.; 1961. Physical Chemistry of Macromolecules, pp. 114-200, Wiley, New York.

117. Thiele C.J., Morrow C.D., Stevens R.H.; 1981. Multiple subsets of anti-tetanus toxoid antibody-producing cells in human peripheral blood differ by size, expression of membrane receptors, and mitogen reactivity. J. Immunol. 126(30: 1146-1153.

118. Tozawa H., Watanabe M. e Ishida N.; 1973. Structural components of sendai virus. Serological and physicochemical characterization of hemmagglutinin subunit associated with neuraminidase activity. Virology 55: 242.

119. Wallin A., Glimelins K. y Erikkson T.; 1974. The induction of aggregation and fusion of Dancus carota protoplasts by Polythilene glycol. Z. Pfl. Physiol. 74: 64-80.

120. Watt D.D.; 1964. Biochemical studies of the venom from the scorpion Centruroides sculpturatus. Toxicon 2: 171-180.

121. Watters J.J., Possani L.D., Mochca-Morales J., Hess B.; 1981. Determination of alfa-helix and beta-sheet structure in toxins purified from the venoms of Latin American scorpions. 4th. Eur. Symposium on Animal, Plant and Microbial Toxins, Marseille, Francia. Abstract: Toxicon 20(1): 81.

122. Williams A.F., 1977. Differentiation antigens of the lymphocyte cell surface. Contemp. Top. Mol. Immunol. 6: 83.

123. Williamson A.; 1971. Biosynthesis of antibodies. Nature 231: 359.

124. Wolpe S.; 1983. In vitro immunization and growth of hybridoma in serum free medium. En: Mather, J. (Ed.) Mammalian Cell Culture: The Use of Serum-Free and Hormone-Supplemented Media. Plenum Press (En preparación).

125. Yanagimachi R. y Usui N.; 1974. Calcium dependence of the acrosome reaction and activation of guinea pig spermatozoa. Exp. Cell Res. 89: 161-174.

126. Yelton D.E., Diamond B.A., Kwan S.P., Scharff M.D.; 1978. Fusion of mouse myeloma and spleen cells. Curr. Top. Microbiol. Immunol. 81: 1-7.

127. Zlotkin E., Rochat H., Kopeyan C., Miranda F., Lissitzky S.; 1971. Purification and properties of the insect toxin from the venom of the scorpion Androctonus australis Hector. Biochimie. 53: 1073-1078.

128. Zlotkin E., Miranda F., Lissitzky S. 1972. A toxic factor to crustacean in the venom of the scorpion Androctonus australis Hector. Toxicon 10: 211-216.

129. Zlotkin E., Miranda F., Rochat H.; 1978. Chemistry and Pharmacology of Buthinae Scorpions Venoms. In: Arthropod Venoms. Handbook of Experimental Pharmacology Vol. 48. Ed. Sergio Bettini. Springer Verlag, New York. pp. 317-369.

130. Zurawski V.R. Jr., Harber E. y Black P.H.; 1978. Production of antibody to tetanus toxoid by continuous human lymphoblastoid cell lines. Science 199: 1439.