



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

**PRODUCCION DE ANTICUERPOS MONOCLONALES
CONTRA QUERATINA.**

T E S I S

Que para obtener el Título de:

B I O L O G O

Presenta:

Juan Manuel Carrillo Farga



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

I N D I C E

	PAG.
INTRODUCCION	1
OBJETIVO	29
JUSTIFICACION	30
MATERIALES Y METODOS	31
I. OBTENCION DEL ANTIGENO	31
II. INMUNIZACION	33
III. MANTENIMIENTO DE LAS CELULAS DE MIELOMA	33
IV. FUSION CELULAR	34
V. DETECCION DE HIBRIDOMAS PRODUCTORES DE ANTICUERPO ESPECIFICO	36
VI. CLONACION CELULAR	37
VII. EXPANSION MASIVA	37
VIII. CONGELACION DEL MIELOMA	38
IX. CONGELACION DE HIBRIDOMAS	38
RESULTADOS	40
DISCUSION Y CONCLUSIONES	51
APENDICE	58
REFERENCIAS	65

A B R E V I A T U R A S

A	Angström
Ac	Anticuerpo
ACF	Adyuvante completo de Freund
Ag	Antígeno
AM	Aceite mineral
Ac Mon	Anticuerpo monoclonal
ATP asa	Adenosín trifosfatasa
BSA	Albúmina sérica de bovino
CAN	Célula asesina natural
CL	Célula de Langerhans
C3	Receptor de membrana
DFMO	Difluorometil ornitina
DMEM	Medio Eagle modificado por Dulbecco
DMEM-HAT	Medio de cultivo suplementado y adicionado de Hipoxantina, Aminopterina y Timidina
DMEM-HT	Medio de cultivo suplementado y adicionado de Hipoxantina y Timidina
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Acido desoxirribonucleico
DOPA	3,4-dihidrofénilalanina
EDTA	Acido etilen-diamino-tetraacético
ELISA	Ensayo inmunoabsorbente con enzima acoplada
ETAF	Factor activador de timocitos derivado de la epidermis

Fc	Receptor de membrana
FI	Filamentos intermedios
H	Cadena pesada de la Ig
Hbd	Agua bidestilada
Ia	Receptor de membrana
Ig	Inmunoglobulina
IL-1	Interleucina-1
INF	Interferón
IP	Intraperitoneal
K	Cadena ligera de la Ig (kappa)
kD	Kilodaltones
L	Cadena ligera de la Ig
LB	Linfocito B
LT	Linfocito T
MGBM	Metilglioxal bis-guanilhidrazona
nm	nanómetros
PBS	Solución amortiguada de fosfatos
PEG	Polietilenglicol
PGE2	Prostaglandina E2
PM	Peso molecular
RNA	Acido ribonucleico
SFB	Suero fetal de bovino
SSB	Solución salina balanceada
SSBH	Solución salina balanceada de Hanks

I N T R O D U C C I O N

En todos los vertebrados la epidermis consiste de un epitelio plano estratificado y queratinizado. El grosor de ésta varía dependiendo de la zona del cuerpo estudiada, así como de la especie que se trate. A partir de la dermis y hacia el exterior podemos identificar cinco diferentes capas celulares con las siguientes características.

1) Estrato basal o capa germinativa.- consiste de células cuboidales o columnares basofílicas que yacen sobre la unión dérmica-epidérmica y cuyos ejes mayores se localizan en forma perpendicular a la superficie de la piel. Estas células se encuentran estrechamente unidas en sus bordes laterales y superior por una gran cantidad de desmosomas. Este tipo de unión celular es también llamado macula adherens y su nombre refleja el hecho de que no se trata de un cinturón continuo. Las sustancias cementantes de los desmosomas muestran tres capas electrónicas interpuestas por otras electrónicas claras que ocupan el espacio intercelular. Este estrato se caracteriza además por una gran cantidad de células en división mitótica siendo responsable, junto con la porción inicial de la siguiente capa, de la renovación constante de células epidérmicas. En el caso de la epidermis humana ésta es renovada cada quince o treinta días dependiendo de la región del cuerpo, edad, así como de otros factores. Todas las células de este estrato presentan filamentos de 10 nm de diámetro,

los cuales se van repitiendo y aumentando en número hasta que en el estrato lúcido representan más del 50% de la proteína total.

2) Estrato espinoso.- que está constituido por células cuboidales o poligonales y raramente se presentan algunas aplanadas, las cuales muestran un núcleo central cuyo citoplasma contiene gran cantidad de racimos filamentosos. Estos convergen en extensiones celulares que terminan en los desmosomas localizados al final de las mismas. Estas son visibles cuando se observan al microscopio óptico y se han denominado tonofibrillas.

Las células de esta capa están firmemente unidas entre sí por este sistema de extensiones citoplásmicas, así como por los desmosomas que rodean toda su superficie, lo que le da una apariencia espinosa cuando se observa al microscopio de luz de donde deriva su designación. En un tiempo se creyó que las tonofibrillas cruzaban las uniones intercelulares que unían a una célula con otra, sin embargo actualmente se sabe que terminan insertadas en la zona citoplásmica de los desmosomas. Su función está relacionada con la capacidad de esta capa para soportar y resistir los efectos de la abrasión. Especialmente en la zona donde se localizan los desmosomas, debido a que en las zonas de continua fricción como lo son las plantas de los pies, el estrato espinoso presenta un mayor grosor que en otras partes del mismo organismo así como mayor abundancia de tonofibrillas. Este estrato y el germinativo reciben en conjunto el nombre de capa de Malpighio (1-2).

3) Estrato granuloso.- se caracteriza por la presencia de tres a cinco capas de células poligonales y achatadas que presentan un núcleo central y cuyo citoplasma se encuentra repleto de gránulos basofílicos de queratohialina. Los estudios bioquímicos han demostrado que contienen una proteína rica en histidina los cuales se convierten en parte de la matriz interfilamentosa en la células del estrato córneo. Otra estructura característica localizada con ayuda del microscópio electrónico corresponde a los gránulos rodeados de membrana de apariencia ovoidal. Estos se forman en asociación con el aparato de Golgi y se mueven hacia la parte superior de la célula, cerca de la membrana plasmática, con la cual se fusionan descargando entonces su contenido hacia el espacio intercelular de la capa granulosa. Bajo el microscopio electrónico muestran un arreglo laminar y las reacciones histoquímicas indican que contienen mucopolisacáridos y fosfolípidos. La función de este material es similar a aquella del cemento intercelular, que actúa como una barrera para la penetración de materiales extraños dándole a la piel un importante efecto de sellado. Este ha sido probado en diversos estudios, en los cuales la penetración de Lantano y peróxidos, como marcadores sobre epitelios queratinizados y no queratinizados, no ocurre en las zonas donde este material llena el espacio intercelular. La formación de esta barrera se aprecia por primera vez en los reptiles y constituyó un evento evolutivo muy importante que permitió el desarrollo de la vida terrestre (1,2).

4) Estrato lúcido.- esta capa usualmente se presenta en la piel gruesa, es translúcida y está compuesta de células ex tremadamente aplanadas que son eosinofílicas. En éstas los organelos celulares ya no se evidencian y el citoplasma consiste primariamente de filamentos densamente compactados y embebidos en una matriz electrón densa. En esta capa aún podemos apreciar desmosomas entre células adyacentes (1).

5) Estrato córneo.- contiene células totalmente apla nadas sin núcleo y totalmente queratinizadas. Su citoplasma está lleno de escleroproteínas filamentosas y birrefringentes conocidas como queratinas, así como de enzimas lisosomales que desempeñan un papel importante en la degradación y digestión de los organelos ce lulares.

Las proteínas antes mencionadas consisten de cadenas ricas en puentes disulfuro, que se van polimerizando y se presentan como racimos de siete a ocho nm. Las células consisten, luego del proceso de queratinización, únicamente de proteínas fibrilares y amorfas así como de membranas plasmáticas engrosadas llamadas células escamosas, las cuales se van eliminando continuamente.

Esta descripción de la epidermis corresponde a su más compleja estructura, presente en áreas muy gruesas, sin embargo otras zonas son mucho más delgadas y los estratos granuloso y lú cido están menos desarrollados y el estrato córneo puede ser muy delgado (2).

Como ya se mencionó la renovación de la epidermis es un proceso continuo que sucede bajo condiciones normales por la intensa actividad mitótica observada principalmente en los estratos basal y espinoso. Luego, como resultado de la diferenciación de las distintas capas o estratos de la epidermis, se observa el proceso de queratinización, en el cual se desarrolla un depósito gradual de proteínas en forma de filamentos, así como de sustancias amorfas conforme éstas migran hacia la superficie de la epidermis (Fig.1).

Durante la diferenciación uno de los numerosos marcadores lo constituye la envoltura cornificada. Esta constituye una de las más interesantes envolturas celulares del reino animal, debido a sus características de resistencia química. Esta se encuentra formada básicamente de proteínas y lípidos que son insolubles en agentes reductores y álcalis débiles. El hecho de que esta estructura sea insoluble en soluciones de dodecil sulfato de sodio (SDS) cuando se calienta a 100°C, indica que su estructura depende de enlaces covalentes, pero su resistencia a los agentes reductores confirma que las uniones son puentes disulfuro. Debido a la dificultad de producir cultivos en suspensión que contengan tan solo una células de estrato córneo, es relativamente difícil probar la susceptibilidad de sus envolturas con enzimas proteolíticas. Sin embargo algunos estudios han demostrado que las envolturas resistentes a detergentes son destruidas por pronasas, bromelina y subtilisina indicando así que su estructura insoluble se

Figura 1. Micrografía de la epidermis, que muestra un proceso continuo de renovación, el cual sucede bajo condiciones normales por la intensa actividad mitótica observada en los estratos basal y espinoso.

debe a la presencia de protefnas. Cuando se cultivan células cornificadas jóvenes se observa que a pesar de tener una forma aplanada, luego del proceso de tripsinización adoptan una forma esférica, lo que demuestra que la fuerza mecánica de la envoltura cornificada no es suficiente para resistir las fuerzas de tensión superficial que soportan las más viejas y superficiales, las cuales deben de tener una estructura cornificada más rígida (4).

Se han realizado filmaciones en las que se aprecia la pérdida de movilidad de las células queratinizadas cuando se cultivan in vivo. Lo anterior se puede deber a tres hechos; primero a la ausencia de estructuras para el movimiento celular como lo son microfilamentos y microtúbulos, segundo a la incapacidad del citoesqueleto para transmitir movimiento hacia la membrana celular debido a la rigidez de la envoltura queratinizada y tercero debido a la incapacidad de romper los desmosomas u otras uniones intercelulares (5).

La epidermis proporciona una barrera efectiva entre el organismo y su medio ambiente. En el caso del niño recién nacido esta función cumple su papel. Sin embargo en niños que nacen antes de término por ejemplo a la treinta semanas de gestación, la epidermis es aún inmadura y presenta dos características negativas; primero tiene una alta permeabilidad a las drogas que les puede causar envenenamiento accidental y segundo pierden una gran cantidad de agua por la epidermis en los primeros días de vida, lo

que ocasiona dificultades en el balance de fluidos y el control de la temperatura. Estas dificultades son transitorias y al cabo de dos a tres semanas de nacidos desarrollan progresivamente una epidermis más gruesa y con mayor número de células. El incremento de estos estratos es estadísticamente significativo (6).

Antes de pasar a describir la clasificación y tipificación de las proteínas constitutivas de los queratinocitos, mencionaré brevemente las características de otros tres tipos celulares presentes en la epidermis.

El color de la piel resulta de varios factores como lo son el número de vasos sanguíneos y los carotenos entre otros pero principalmente por el contenido de melanina que es un pigmento café oscuro producido por células especializadas llamadas melanocitos. Usualmente se localizan sobre la capa basal y entre las capas superiores de la epidermis. La síntesis de este pigmento ocurre en el interior de los melanocitos a partir de tirosina que como resultado de su actividad transforma la tirosina en 3,4-dihidrofenilalanina (DOPA). Luego es transformada en dopaquinona que después de una serie de reacciones se convierte en melanina (2), (Fig.2).

Otra población importante está constituida por las células de Langerhans (CL) que presentan forma estrellada similar a los melanocitos y se localizan principalmente en el estrato espinoso. A la microscopía de luz son demostrables utilizando impregnaciones de cloruro de oro, con la reacción histoquímica de adenosín trifosfatasa (ATP asa), con la reacción para la D-manosidasa y al exponerla in vitro con catecolaminas (8-12).

Figura 2. Micrografía de un melanocito en cuyo interior se produce el pigmento llamado melanina, que junto con el número de vasos sanguíneos y los carotenos dan color a la piel.



Figura 3. Micrografía que muestra a las células de Langerhans puestas de manifiesto por medio de la técnica de ATP asa. Muy recientemente se ha dilucidado el papel inmunológico de esta población celular.

adenosín trifosfatasa (ATP asa), con la reacción para D-manosidasa y al exponerla in vitro con catecolaminas (8-12).

A diferencia de los queratinocitos no presentan tonofilamentos ni desmosomas, ésta última característica le permite moverse dentro de la epidermis, así como en otros epitelios lo cual ha sido demostrado experimentalmente estimulando con antígenos (Ag) como el dinitrofluorobenceno (9,13), (Fig.3).

Junto a los demás organelos de su citoplasma se puede observar una estructura característica llamada gránulo de Birbeck el cual tiene forma de rodillo y una longitud de 460 nm. La membrana de esta inclusión muestra la composición trilaminar de la unidad de membrana, pero su función es aún desconocida. Estas células representan una subpoblación del sistema fagocítico mononuclear, probablemente de la línea macrófagos/monocitos requeridos para la activación de linfocitos T (LT) en las respuestas inmunes. La función descrita para ellas es la captura y concentración de Ag en la superficie celular para su efectiva presentación ante los linfocitos (14). En general cuando un Ag es tomado por los macrófagos una porción es degradada por fagocitosis mientras que otra parte es fijada a la superficie celular donde se piensa forma una asociación con la molécula Ia, la cual es una proteína receptora presente en su superficie además de la C3 y Fc (9,15-17).

Otra población celular la constituyen las células de Merckel presentes generalmente en las plantas de los pies y en las palmas de manos. Su característica distintiva es que muestran terminaciones nerviosas libres que forman un disco terminal exp-

pan

las palmas de manos. Su característica distintiva es que muestran terminaciones nerviosas libres que forman un disco terminal expandido en la base de éstas. De ahí que se cataloguen como mecanoreceptores sensoriales aunque es posible que no sea su única función (2).

Con ayuda de la microscopía electrónica ya desde hace algunos años se ha identificado un sistema de proteínas filamentosas citoplásmicas distintas de los filamentos de actina que tienen 60 Å de diámetro y también diferente a los microtúbulos de 250 Å de diámetro. Estas tienen un valor intermedio de 100 Å y se han denominado filamentos intermedios (FI) por esa misma razón. En la actualidad se han clasificado cinco tipos distintos de FI en base a sus características bioquímicas e inmunológicas; entre ellos se encuentran las queratinas o tonofilamentos presentes en las células epiteliales (18).

En particular las proteínas de los mamíferos englobadas como queratinas son fibrosas con una disposición espacial tipo alfa hélice asociadas de manera filamentosa y con un diámetro aproximado de 80 Å. Estas son sintetizadas activamente por las capas germinativa y espinosa de la epidermis (19). Con ayuda de la electroforesis se han separado e identificado familias y subfamilias que están en los intervalos de cuarenta y setenta kilodaltones (kD). Los datos experimentales sugieren que la mayor parte de las queratinas existen en forma reducida lo que favorece su polimerización. De hecho dos o tres polipéptidos de queratina

purificados tienden a polimerizarse in vitro en filamentos con la misma estructura general que los filamentos de queratina nativos. Los datos de difracción de rayos X han indicado que los FI de queratina están compuestos fundamentalmente de una unidad estructural de tres cadenas (18-20).

A pesar de que existen más de veinte tipos de queratinas diferentes, los datos obtenidos a partir de la reactividad con anticuerpos monoclonales (Ac mon) antiqueratina, mapeo de péptidos y electroforesis en gel de dos dimensiones se han clasificado en FI tipo I en el que se incluyen las queratinas ácidas y FI tipo II en los que están las queratinas neutras y básicas (20).

El tipo de queratinas que se pueden encontrar en los tejidos epiteliales varía con el desarrollo embriológico y edad. Un análisis detallado de las queratinas presentes en los epitelios ha demostrado que únicamente de dos a diez queratinas distintas se expresan en el mismo tejido, pero que por lo menos está presente una de cada familia. Se ha reconocido también que por lo menos dos queratinas diferentes se requieren para la reconstrucción de los FI (21).

Las cuatro queratinas más abundantes de la epidermis humana normal tienen los pesos moleculares (PM) siguientes: 50.0, 56.5, 58.0 y 65-67 kD. De las anteriores, las dos primeras corresponden a proteínas de la subfamilia ácida y las restantes a las básicas.

Se ha concluído que las únicas queratinas sintetizadas por las células epiteliales basales corresponden a la 50.0 kD (ácida) y la 58.0 kD (básica). Mientras que en las capas que ratinizadas únicamente se coexpresan la 56.5 kD (ácida) y las 65-67 kD (básicas). Como se puede apreciar existe un gradiente de PM que va aumentando conforme se pasa a las capas más superficiales de la epidermis (21,22), (Fig.4).

Las queratinas de 50.0 kD y 58.0 kD están presentes en distintas cantidades en todos los epitelios y aún las de PM entre 65-67 kD se llegan a localizar en epitelios como la córnea, conjuntiva y otros cuando existe deficiencia de vitamina A (Fig. 5). En este renglón se ha estudiado la influencia de la dermis sobre la epidermis durante el desarrollo embrionario y se ha observado que al recombinar queratinocitos humanos adultos con dermis muerta desprovista de su epidermis, al ser cultivados se induce la formación de un epitelio parecido al encontrado en la epidermis normal, en la cual se sintetizan queratinas de 67.0 kD. En estos cultivos las células epidérmicas se invaginan en los agujeros dejados al remover la epidermis original (22). A nivel ultraestructural los marcadores de la diferenciación incluyendo hemidesmosomas, gránulos recubiertos de membrana intra y extracelulares, gránulos de queratohialina, uniones estrechas así como desmosomas se pueden distinguir claramente. Múltiples experimentos han demostrado que los cambios en la diferenciación celular están provocados por la capacidad filtradora de la matriz dérmica de elemenmen

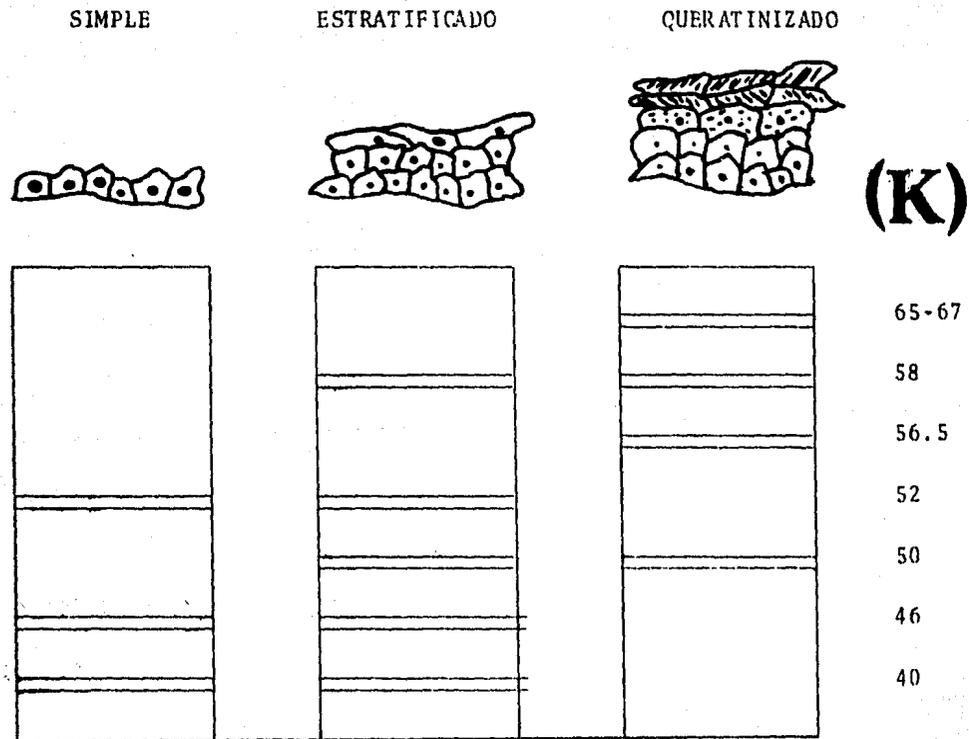


Figura 4. Resumen esquemático de la distribución típica de las diferentes clases de queratinas en la epidermis humana, así como en otros epitelios no queratinizados.

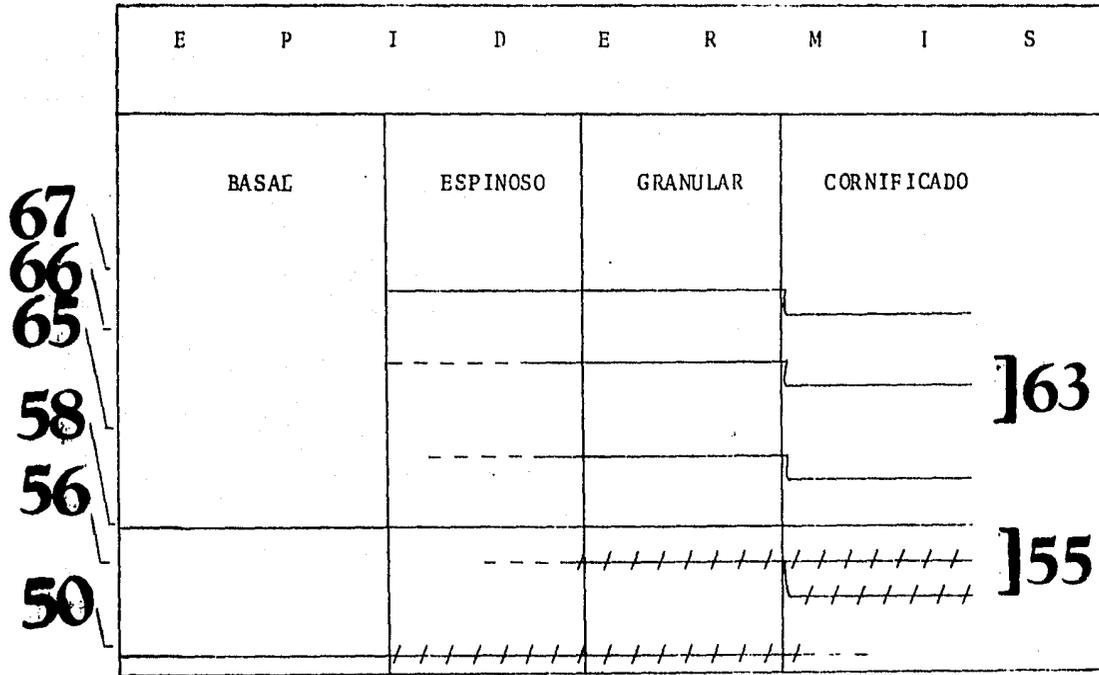


Figura 5. Resumen esquemático de los cambios en la expresión de queratinas durante la diferenciación normal de la epidermis. La línea continua denota la presencia de la queratina, la discontinua la posible presencia de ésta, la línea cruzada que el Ag está presente pero no es detectable con Ac mon y finalmente la línea doblada indica la parcial degradación durante la formación del estrato córneo.

tos no celulares. Estos son complementarios en su función a la vitamina A en lo referente a la inducción de subunidades de queratina en las capas suprabasales cuando se cultivan in vitro (22,23).

Por otra parte investigaciones sobre la cinética celular de poblaciones de queratinocitos en cultivo han mostrado que estos constituyen una población heterogénea, en la cual se pueden distinguir subpoblaciones en base a su tasa de síntesis de DNA (24,25). Los estudios más recientes utilizando estimuladores del crecimiento sugieren la posibilidad de que estas subpoblaciones estén involucradas en la renovación y expansión durante la diferenciación temprana de los queratinocitos (26,27). El control de la diferenciación y proliferación de los cultivos de células epidérmicas es un proceso altamente complejo, que depende del balance delicado entre factores que promueven la proliferación y aquellos que favorecen la diferenciación (28,29).

Por lo anterior se desprende que los inhibidores endógenos deben jugar un papel muy importante en el mantenimiento de este balance y se asume que los estados de renovación y pérdida celular están mediados por dichos inhibidores que se llaman colectivamente chalonas (30). En el caso particular del inhibidor del crecimiento epidérmico se trata de un oligopéptido el cual tiene la capacidad de detener la actividad mitótica, así como a las células que se encuentran en fase de síntesis del ciclo celular (31). Lo anterior se ha comprobado marcando células con

timidina tritiada y observando la disminución en la tasa de síntesis de DNA (30,31).

También se han estudiado los efectos antiproliferativos de los interferones recombinantes alfa y gama sobre las poblaciones de queratinocitos. Estas moléculas se han clasificado en tipo I que incluye al interferón alfa que deriva principalmente de los leucocitos y el interferón beta derivado de fibroblastos y células epiteliales; estos dos son inducidos por virus. En cuanto a los interferones (INF) de tipo II o inmunes se tiene al INF gama que es una linfocina derivada de linfocitos T e inducido por mitógenos. Las tres clases de INF presentan atributos muy similares a los polipéptidos de las hormonas y existe evidencia directa de que los primeros se unen a receptores con afinidades similares a los de éstas (32). Apparently entre otras funciones los INF regulan la proliferación o diferenciación de los queratinocitos y la expresión de receptores antigénicos de superficie (33).

Otros estudios han demostrado que la aplicación combinada de difluorometil ornitina (DFMO) y metilglioxal bisguanilhidrazona (MGBM) producen inhibición de la síntesis epidérmica de DNA tanto in vivo como in vitro a un grado tal que no es comparable cuando se utilizan cada una de estas drogas por separado. Se ha demostrado además que éstas producen inhibición selectiva de células provenientes de un tejido con Psoriasis comparado con queratinocitos en cultivo provenientes de un tejido

normal. Estudios de este tipo pueden dar luz sobre la terapia a seguir en diferentes enfermedades cutáneas (34,35).

En total se han determinado tres subpoblaciones distintas de queratinocitos en base a su tamaño, contenido de ácido ribonucleico (RNA), propiedades inmunoquímicas y la cinética del ciclo celular. La subpoblación A consiste de células basales pequeñas con bajo contenido de RNA y largos periodos de duplicación. La subpoblación B contiene células dos o tres veces más grandes, con mayor contenido de RNA y menor tiempo de división celular. La subpoblación C consiste de células grandes que no tienen la capacidad de dividirse y con mayor cantidad de RNA que las dos anteriores (36).

Los queratinocitos producen una molécula llamada factor activador de timocitos derivado de epidermis (ETAF) el cual es biológica y fisicoquímicamente igual a la linfoquina interleucina 1 (IL-1). Esta proteína tiene un PM de 15 kD y desempeña un papel integral en la generación tanto de la respuesta inmune como inflamatoria. Algunos de los efectos inducidos por ésta son la pirogenicidad, quimiotaxis de neutrófilos, activación y quimiotaxis de linfocitos, proteólisis muscular, producción de proteínas de la fase aguda, síntesis de prostaglandinas y la producción de colagenasa por fibroblastos que son eventos asociados con la inflamación (37).

La cantidad de ETAF/IL-1 que se puede extraer del estrato córneo sugiere que esta estructura funciona como un alma

cén para este mediador. Además se ha demostrado que en los queratinocitos normales se expresa sobre la superficie de su membrana plasmática la molécula ETAF/IL-1 (37,38).

En otros estudios en los que se ha medido la tasa de proliferación de queratinocitos, se ha demostrado que al haber un incremento en la síntesis de prostaglandina E2 (PGE2), la tasa de proliferación de estas células se ve aumentada. También se ha observado que una vez que comienza la proliferación hasta llegarse a formar un epitelio, una mayor concentración de PGE2 no conduce a mayor proliferación. Lo anterior sugiere que los queratinocitos son capaces de proliferar por dos sistemas diferentes, uno dependiente y otro independiente de PGE2. En estudios con ratas deficientes en ácidos grasos esenciales, en las que se han provocado quemaduras o heridas, el tiempo de reparación epitelial está muy retardado, lo cual está en concordancia con lo antes expuesto debido a que dichos roedores carecen de los precursores necesarios para la síntesis de PGE2 (39). Más aun la incapacidad de un epitelio para aumentar la síntesis de PGE2 ante una herida se presenta en enfermedades inflamatorias hiperproliferativas como la psoriasis, donde se presenta como alternativa un incremento en el metabolismo del ácido araquidónico (40).

En las células epiteliales los F1 cumplen un propósito estructural y en particular las queratinas se encuentran ancladas en regiones especializadas donde se localizan los desmosomas (41). Aquí las queratinas se extienden a través de la membra

na y proyectan un extremo de glicoproteína hacia la superficie externa que se enlaza con las presentes en las células adyacentes. Estos glicoconjugados presentan un patrón distintivo en las diferentes capas de la epidermis humana (42,43). Se han detectado por medio de lectinas unidas a fluorocromo excepto en la epidermis embrionaria la cual carece de estos conjugados, a pesar de mostrar ya una diferenciación de las capas basales. Estas glicoproteínas junto con glicolípidos juegan un papel de vital importancia en los procesos de proliferación y diferenciación (44-47).

En cuanto a los lípidos sabemos que el proceso de queratinización se acompaña de cambios profundos en la composición y morfología de las estructuras de éstos. En las capas basales encontramos una alta concentración de fosfolípidos y lípidos no polares, mientras que las ceramidas se encuentran en baja concentración. Estas proporciones se van invirtiendo conforme se estudian las capas más externas y en el estrato córneo pueden ser reconocidos dos ácidos linoleicos fundamentales para evitar la pérdida excesiva de agua, éstos son la acilceramida y la acilglucoceramida (48).

Pero no únicamente compuestos orgánicos complejos tienen influencia sobre las poblaciones celulares de la epidermis. Así tenemos que cambios en la concentración de un ión como lo es el Calcio (Ca^{+}) en el espacio extracelular, inicia la síntesis de DNA en queratinocitos epidérmicos permitiendo la diferenciación

y estratificación, así como de la formación de desmosomas (49).

En años recientes gran cantidad de investigaciones se han dedicado al estudio de las células epiteliales transformadas. Esto se debe en gran medida a que la mayor parte de los tumores humanos son de origen epitelial y porque se han desarrollado sistemas de cultivo de tejidos que permiten estudiar los in vitro. Es obvio el interés de determinar la evolución del proceso oncogénico, previo al tiempo en que estos tumores se expresan como carcinomas declarados (50). También es claro a partir de observaciones in vitro e in vivo, que el proceso oncogénico altera inevitablemente el programa normal de diferenciación, tanto, que es la característica para determinar una neoplasia. En los tejidos que tienen la capacidad de renovarse tales como la epidermis, en los que la estructura está regulada en forma precisa por la producción de células germinativas y células diferenciadas, es razonable postular que la diferenciación debe ser un proceso temprano en la carcinogénesis, causando la proliferación anormal de subpoblaciones de células basales malignas(51). De manera alternativa los procesos de proliferación y diferenciación pueden llevarse a cabo de manera simultánea en células que normalmente estarían llevando a cabo uno u otro de estos procesos. Cuando se infectan queratinocitos con un virus como el SV-40, que presenta un marcador de superficie fácilmente identificable, estas células muestran un crecimiento infinito cuando son cultivadas in vitro y se puede observar que

su capacidad para diferenciarse disminuye progresivamente. Estas poblaciones infectadas manifiestan inestabilidad fenotípica, en términos de la aparición de variantes, que en contraste con células no infectadas muestran un patrón bien definido en su citoesqueleto (52,53).

De todo lo anterior se puede apreciar que el mantenimiento de la homeostasis cutánea depende de interacciones celulares complejas entre queratinocitos, células de Langerhans, LT y otras células linfoides como los linfocitos B (LB), monocitos y células asesinas naturales (CAN), así como de productos orgánicos y elementos inorgánicos (54).

Más recientemente, se ha comparado el integumento de los anfibios con su ecología y se ha observado que ciertas peculiaridades histoquímicas de su diferenciación epidérmica sugieren que éstas juegan un papel importante en la adaptación a su existencia terrestre. Se puede notar que esta adaptación es progresiva y que va acompañada de la formación de un gradiente histológico vertical, demostrado por la acumulación de proteínas ricas en grupos catiónicos y sulfhidrilos en las capas celulares superficiales. Es de hacerse notar que las propiedades histoquímicas de la epidermis del sapo común que presenta una capa de queratina y las del sapo verde que carece de ella (paraqueratosis) son coincidentes. En ambas la diferenciación histoquímica de la epidermis resulta de la acumulación de proteínas con las características antes mencionadas sobre la capa

celular más superficial (55).

La zona de protección de la epidermis de reptiles es notable por su concentración de grupos cisténicos distribuidos difusamente. En el borde de la zona de protección y la zona germinativa se forma la zona de transición cuyas proteínas tienen altas concentraciones de grupos disulfuro y proteínas libres de cationes, así como oligopéptidos libres. De ahí que la epidermis de los reptiles no adquiere únicamente una capa córnea más gruesa, sino también un nuevo tipo de diferenciación histoquímica en la zona de protección.

El tipo de diferenciación que apareció en los reptiles se ha preservado en los mamíferos, en cuyo caso han aparecido nuevos aspectos relacionados con el integumento piloso. El segmento de epidermis cubierto por pelo tiene altas concentraciones de cisteína, así como de proteínas libres de cationes en la zona protectora. En las zonas de protección se acumulan proteínas con un alto contenido de histidina y arginina.

Es evidente el hecho de que la zona de protección en los anfibios está formada por una queratinización periférica (las proteínas ricas en cisteína se localizan en la periferia de las células de la zona de protección), mientras que la zona de protección de la epidermis en reptiles está formada por una queratinización difusa (las proteínas ricas en cisteína también se encuentran formando parte del cuerpo celular). Los datos obtenidos en el estudio histoquímico comparativo de

la epidermis de vertebrados contemporáneos, puede servir como un patrón de los eventos que ocurrieron en la filogenia de las especies (56).

La función primordial del sistema inmune es la defensa del organismo contra la infección y se basa en tres aspectos importantes que son la memoria, la especificidad y el reconocimiento de lo no propio. Esta protección está dada por la respuesta inmune que es una reacción contra el agente infeccioso denominado antígeno (Ag). Cuando estos últimos han penetrado en el organismo los linfocitos B se diferencian en células plasmáticas que secretan grandes cantidades de anticuerpos (Ac) o inmunoglobulinas (Ig) las cuales son moléculas bifuncionales que se ligan a estos para eliminarlos iniciando toda una gama de fenómenos secundarios.

Las Ig se han dividido en base a la estructura conformacional que presentan. Se trata de polipéptidos en aproximadamente un 95% y carbohidratos en un 5%. Forman un tetrámero unido por puentes disulfuro donde existen dos cadenas de mayor PM denominadas pesadas (H) y dos cadenas de menor PM llamadas ligeras (L), con estructura general (H₂L₂) como se puede apreciar en la Fig.6 (56).

En humanos se ha establecido la existencia de cinco tipos de cadenas pesadas que han dado origen a distintas clases de Ig, estas son las siguientes; IgG, IgM, IgA, IgD e IgE. Las cadenas ligeras se han clasificado como () y (), éstas se

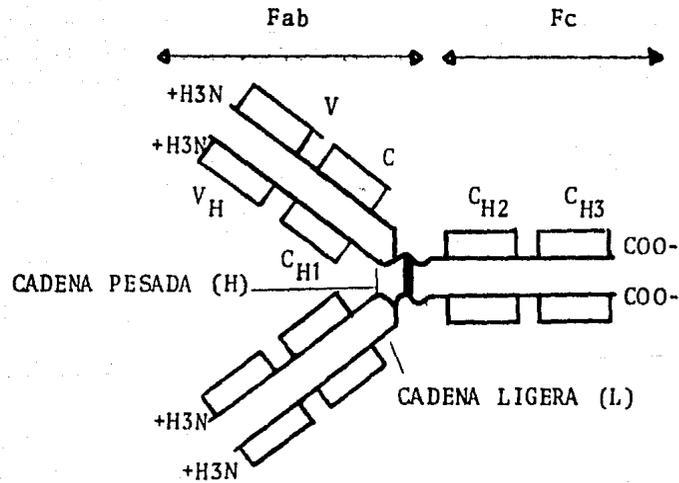


Figura 6. Modelo simplificado de una molécula de Ac humano IgG1, que muestra la estructura básica de 4 cadenas y los dominios. V indica la región variable, C la región constante. Los rectángulos representan los enlaces de sulfuro.

presentan de manera pareada en cada Ig, según la fórmula general, pero nunca combinadas en la misma Ig (57).

En cuanto a su función la IgG constituye el 75 % de las Ig del suero y la portan sobre su superficie los macrófagos que entonces funcionan como citotóxicos hacia el Ag. Además esta Ig difunde más rápidamente que las demás hacia los espacios extravasculares donde neutralizan las toxinas de bacterias y se une a microorganismos para permitir su fagocitosis.

La IgA predomina en las secreciones corporales y proporciona el mecanismo primario de defensa. Abunda en la saliva, lágrimas, secreciones bronquiales, mucosa nasal, secreciones vaginales y en intestino delgado. Su función no es la destrucción de los Ag sino más bien la de impedir la entrada de estos al organismo. Se presenta en forma dimérica unida a la cadena J.

La IgM está presente en la superficie de los linfocitos B y es la más eficiente fijadora del sistema de complemento. Se ha demostrado que casi toda la IgD está presente junto con la IgM en la superficie de linfocitos, donde parece que actúan mutuamente con los receptores de Ag para controlar la activación y supresión de los linfocitos.

Las IgE se encuentran unidas a las células cebadas y cuando entran en contacto con un Ag, producen la degranulación de éstas, liberando aminas vasoactivas como la histamina. También juega un papel importante en la protección de mucosas externas (58-60).

A principios de la década de los sesentas se reconoció que la fusión celular era un proceso espontáneo pero poco frecuente entre células que se mantenían en cultivo. A partir de este hecho se trató de encontrar un agente que permitiera la fusión celular a mayor escala. Inicialmente se probó con el virus de Sendai que presentaba como limitación el que las células a fusionar debían de tener receptores antigénicos para dicho virus (61-62).

En 1975 se desarrolló una nueva metodología que permitía la producción de clonas formadoras de Anticuerpos monoclonales (Ac mon) con especificidad única (63). De manera general la técnica permite fusionar células mielómicas que tienen la capacidad de proliferar indefinidamente, junto con linfocitos B del bazo que secretan Ac. Para permitir la fusión celular se utilizó primeramente el virus de Sendai como ya se ha mencionado, sin embargo en la actualidad se emplea el polietilenglicol (PEG) que es un agente aglutinante de protoplastos vegetales (64). Las células resultantes de la fusión se han denominado hibridomas y pueden ser clonadas por métodos de dilución limitante con la finalidad de asegurar la calidad monoclonal de las células productoras de Ac (65-66). Las clonas así obtenidas pueden ser expandidas en placas y botellas de cultivo, para finalmente hacer una expansión masiva y obtener altas concentraciones de Ac mon, esto es, que reconocen un solo determinante antigénico y que sobrepasa el orden de los 10 mg/ml (67).

Baste recordar que un buen suero está constituido por más de 90% de moléculas que tienen poca o ninguna avidéz por el Ag. Se tiene entonces un contraste tremendo con los Ac mon que tienen la misma clase de Ig, alotipo, la misma región variable, estructura, idiotipo, afinidad y especificidad por un determinado epítotope. Cuando se dirige un Ac mon contra un solo epítotope del Ag, este muestra una alta especificidad en términos de reacción cruzada con otros Ag, pues ésta es nula o casi nula. Ocasionalmente se puede encontrar alguna reacción cruzada, pero esta será mínima y se explica por el hecho de que un Ag puede presentar receptores parecidos en su estructura terciaria (68-69).

Otra de las ventajas de los Ac mon es que permite producir Ac específicos contra distintos Ag que se encuentren en una mezcla compleja y separar los hibridomas productores de Igs particulares, simplemente clonando esos hibridomas (70).

El potencial de esta tecnología es muy grande y sólo como ejemplo de sus beneficios están la caracterización de líneas celulares linfoides y mieloides malignas, reconocimiento de tejidos, elucidación de la estructura fina en los sitios de combinación de las Ig, diagnóstico de cáncer y la terapia con agentes citotóxicos unidos a un Ac mon anti tumor (71-73).

O B J E T I V O

Usando extractos crudos de epidermis de cobayos obtener Ac mon contra alguna o algunas de las queratínas presentes en el mismo.

J U S T I F I C A C I O N

En primer término tenemos que la producción de Ac mon permite obtener 100% de Ig específica contra un Ag determinado a diferencia de los sueros policlonales en donde se obtiene una mezcla que en general tiene poca avidez hacia los epítopes problema. En segundo término tenemos que los Ac mon permiten reconocer que ratinas específicas contra las que se inmunizan los ratones y tercero a partir de éstos su utilización en problemas de diagnós-tico clínico.

M A T E R I A L E S Y M E T O D O S

I. Obtención del Ag

El Ag utilizado en el presente trabajo correspondió a la epidermis de cobayos, los cuales fueron proporcionados por el bioterio de la Facultad de Medicina, UNAM. Estos fueron depilados completamente utilizando un depilador comercial (Lilly, México) y luego de anestesiarlos se procedió a disectar la piel completa en la zona abdominal y dorsal. Después fueron sacrificados por desnucamiento cervical.

Las muestras fueron sumergidas inmediatamente en solución salina balanceada de Hanks (SSBH) que contenía un agente quelante de iones calcio y magnesio ácido etilendiamino tetra-acético (EDTA) y se incubaron durante 3 hr a 37°C. Transcurrido este tiempo se procedió a separar la epidermis subyacente utilizando para esto agujas de disección. Los fragmentos de epidermis así obtenidos se homogenizaron a 1500 rpm durante 10 min utilizando 3 ml de SSBH dentro del homogenizador. Esta solución ya no tenía el agente quelante. Este paso se repitió tres veces para cada una de las muestras obtenidas.

P R O C E S A M I E N T O D E L A g

El siguiente paso consistió en centrifugar a 3500 rpm durante 5 min el Ag; el sobrenadante obtenido se guardó en congelación a -4°C y el paquete celular se resuspendió en 6 ml de bicarbonato de amonio (NH_4HCO_3 , 5mM) y se pasó a baño maría durante

40 min a 70°C. Finalmente fue centrifugado a 800 rpm durante 5 min y filtrado en papel Whatman no.1 (100 μ m). El paquete celular aquí obtenido se guardó en congelación a -4°C con 3 ml de NH_4CO_3 , mientras que al sobrenadante se le hizo la medición de proteínas por medio de la técnica de Lowry (74), utilizando para ello un blanco, tres controles y tres muestras problema que se prepararon como se indica a continuación.

Para preparar un blanco se colocaron en un tubo de ensaye de 5 ml de capacidad, 400 μ l de agua bidestilada (Hbd) a los que se agregaron otros 400 μ l de solución A-B-C y se esperó durante 15 min antes de añadir 1200 μ l de la solución Folin-Ciocalteu (F-C), se agitó durante 30 seg en vortex y luego de 30 min de espera se hizo la lectura en el espectrofotómetro a 750 nm de absorbancia.

El primer tubo control se preparó colocando 300 μ l de Hbd con 100 μ l de albúmina sérica de bovino (BSA) a una concentración de 1mg/ml, a estos se agregaron 400 μ l de la solución A-B-C, así como los 1200 μ l de F-C. Después se siguieron los mismos pasos que en la preparación del blanco. El segundo tubo control contenía 200 μ l de Hbd y 200 μ l de BSA a la misma concentración. El último tubo control tenía 400 μ l de BSA y los reactivos restantes.

Finalmente las tres muestras problema se prepararon con 100 μ l de Ag (85 μ g/100 μ l) más 300 μ l de Hbd, los demás reactivos se agregaron siguiendo la misma metodología.

II. Inmunización de ratones

Se inmunizaron cinco ratones de cuatro semanas de edad de la cepa Balb/c, los cuales fueron proporcionados por el bioterio del Departamento de Ciencias Biológicas y de la Salud, UAH-Iztapalapa. Para cada uno de los cinco ratones se prepararon 100 ul de Ag (85 ug/100 ul) diluidos en 150 ul de solución salina balanceada (SSB) y emulsionados con 250 ul de adyuvante completo de Freund (ACF) de (DIFCO, Detroit) que contenía Bordetella pertussis inactivada. Esta emulsión se homogenizó durante 3 min en Vortex y se inculó en un total de 500 ul/ratón por vía intraperitoneal. A los 13 días se inculó en cada ratón una segunda dosis que contenía 100 ul del Ag a la misma concentración en 400 ul de SSB.

III. Mantenimiento de las células de mieloma

La línea celular utilizada fue la P3X63 Ag-8 (6.5.3), ésta corresponde a un mieloma de ratón que prolifera indefinidamente en medio de cultivo (75). Este fue mantenido y expandido en botellas (NUNC, Noruega) dentro de una incubadora National en atmósfera húmeda con 95% de aire. Se cultivaron en medio mínimo Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) de (Microlab, México), suplementado con suero fetal de bovino (SFB), antibac, L-glutamina, antifun, aminoácidos no esenciales, piruvato de sodio de la misma compañía. Además contenía gentamicina (Schering, México), insulina (Lilly, México) y 2-mercaptoetanol (J.T.Baker, USA). El suero se inactivó

a 56°C durante 30 min y se filtró en membranas de Millipore de 0.8 µm, 0.45 µm y finalmente en 0.22 µm (76,77).

IV. Fusión celular

Se hicieron seis fusiones, cada una se llevó a cabo 72 hr después de la segunda inmunización, disectando en esterilidad los bazos de cuatro ratones. Los órganos se colectaron en cajas de Petri que contenían 5 ml de SSB a 37°C. De ahí se pasaron a la campana de flujo laminar donde fueron macerados en una malla de acero inoxidable presionando con un pistón de vidrio. Las células así disgregadas fueron recogidas en otra caja de Petri con 5 ml de SSB y pasadas a tubos de centrifuga cónicos estériles de 15 ml de capacidad (NUNC, Noruega). Se centrifugaron a 1000 rpm durante 10 min en una centrifuga Sorvall modelo LC-50, luego de lo cual se eliminó el sobrenadante y nuevamente se resuspendieron en 5 ml de SSB centrifugando una vez más para lavar de contaminantes. Se le retiró el sobrenadante y finalmente se resuspendieron en otros 5 ml de SSB.

Para acondicionar el medio de crecimiento de los híbridos, se disectaron en esterilidad los timos de cuatro ratones de 3-4 semanas de edad. Se disgregaron en la malla de acero presionando con el pistón de vidrio y las células se recogieron en una caja de Petri conteniendo 5 ml de SSB. Se pasaron a un tubo de centrifuga cónico de 15 ml de capacidad y se centrifugaron a 1000 rpm durante 10 min, luego de lo cual se eliminó el sobrenadante y se

resuspendieron las células en 90 ml de medio que contenía Hipoxantina, Aminopterina y Timidina (HAT) todas ellas de (Sigma, USA), así como medio suplementado.

Las poblaciones de mieloma y linfocitos se contaron por separado en cámaras de Neubauer, utilizando la prueba de exclusión con azul tripano para viabilidad celular. En la fusión se utilizaron 110×10^6 células de mieloma y aproximadamente 800×10^6 linfocitos. Ambas poblaciones se colocaron en un tubo de centrifuga cónico de 50 ml de capacidad (NUNC, Noruega) y se centrifugaron a 1000 rpm durante 10 min. Después de esto se retiró el sobrenadante y se procedió a realizar la fusión que consta de los siguientes pasos.

Primero se agregó 1 ml de PEG de PM 1500 (Baker, USA) estéril disuelto en relación 1:1 (p/v) con DMEM a 37°C sobre el paquete celular durante 1 min y con agitación continua. Esta última se realizó golpeando continuamente con los dedos el tubo de centrifuga. La agitación se prolongó durante otro min. En otros dos min se agregaron 2 ml de DMEM y finalmente 7 ml de DMEM en otros dos min con agitación continua. Se procedió a centrifugar a 1000 rpm durante 10 min, se retiró el sobrenadante y el paquete celular se resuspendió con 10 ml de medio HAT, los cuales se agregaron a la botella que contenía 90 ml de medio HAT y los timocitos.

Se procedió entonces a colocar 100 μ l de la suspensión celular en 960 pozos de placas (NUNC, Noruega) y a guardarlas finalmente en la incubadora con atmósfera de CO₂ (78-81).

V. Detección de híbridomas productores de Ac específico

Para la detección de células híbridas productoras de Ac mon se utilizó de manera rutinaria la prueba de ELISA, la cual es un ensayo inmunoenzimático no competitivo de fase sólida.

El primer paso fue colocar en cada pozo de microcultivo (NUNC, No ruela) Ag a una concentración de 0.5 ug/50 ul, con la finalidad de inmovilizarlo. Luego de preparar la placa se incubó a 37°C durante 12 hr en atmósfera seca. Cuando todos los pozos se han desecado se lava tres veces con PBS para saturar los sitios libres de la fase sólida. Después se tomaron 100 ul de sobrenadante de los pozos a probar y se dejó reposar durante 20 min. Aquí sí al adicionar los sobrenadantes estos contienen Ac vs Ag, entonces se unirán a él.

Transcurrido el tiempo se lavó con Tween 20 (0.05%) por 10 veces para eliminar todos los componentes no unidos. Se procedió a agregar 50 ul/pozo de peroxidasa de rábano conjugada con Ac de ca bra anti IgG de ratón (Cappel, USA) diluida en buffer de dilución 1:1500. Se permitió que se llevara a cabo la reacción durante 10 min y se lavó nuevamente con el mismo detergente, lo que permitió retirar el exceso de enzima.

Inmediatamente después se agregaron 100 ul de sustrato que permite poner de manifiesto la presencia de la enzima. La hidrólisis enzimática de ésta origina un producto colorido que fue leído a 405 nm en el lector de ELISA (Flow laboratories, USA). Las lecturas se hicieron a los 30 min después de agregado el sustrato (82,83).

VI. Clonación celular

Para llevar a cabo la clonación celular se prepararon 100 ml de supermedio adicionado de hipoxantina (10 mM) y timidina (160 mM) ambas de (Sigma, USA). A este medio se le agregaron timocitos obtenidos en esterilidad de tres ratones Balb/c de 3 a 4 semanas de edad.

A los pozos que resultaron positivos en la prueba de ELISA se les midió viabilidad con la prueba de exclusión del azul tripano en cámara de Neubauer. Después se calculó el volumen que contenía 2500 células y éstas se resuspendieron en 10 ml de medio suplementado con (HT). Se procedió a colocar 100 μ l en cada pozo de una placa de 96 con la finalidad de tener aproximadamente 25 hibridomas por pozo. Este proceso de clonación se hizo dos veces y posteriormente se fueron expandiendo de 1 a 2, de 2 a 4 y así sucesivamente hasta llegar a 16, entonces se pasaron a pozos de 1 ml y de cuatro de estos a botella que principió con 5 ml y terminó con 30 ml aproximadamente (78).

VII. Expansión masiva.

Para prepararla se inyectó por vía intraperitoneal (IP) cada uno de 20 ratones Balb/c de cuatro semanas de edad con 0.5 ml de aceite mineral (AM) pristán de (Aldrich, USA) a los cero y 10 días. Tres días después de la segunda dosis se inocularon cerca de 8×10^6 hibridomas por ratón, resuspendidos en 500 μ l de SSBH para producir el tumor ascítico (78,79).

Entre diez y quince días después de inocular los hibridomas se extrajeron los líquidos ascíticos de los ratones que habían formado el tumor utilizando jeringas de 5 ml y agujas de calibre 18. Estos líquidos se centrifugaron a 3500 rpm durante 10 min y se guardaron únicamente los sobrenadantes en criotubos (NUNC, Noruega) de 2 ml de capacidad a -36°C dentro de un ultra congelador (REVCO, USA).

VIII. Congelación del mieloma.

En cámara de Neubauer se contaron las células por medio de la prueba de exclusión con azul tripano. Después se tomó el volumen necesario que contuvo 6.0×10^6 células vivas y se centrifugó a 1000 rpm durante 10 min. Se retiró completamente el sobrenadante y muy suavemente se resuspendió el paquete celular con 1.0 ml de una mezcla que contenía SFB (90%) y dimetil sulfóxido (10%) de (Sigma, USA). Este DMSO se esterilizó junto con el SFB con membranas Millipore de 0.22 μm . Las muestras se guardan en criotubos de 1.8 ml de capacidad (NUNC, Noruega) a -36°C .

IX. Congelación de los hibridomas

Primero se midió la viabilidad celular de la misma forma que se hizo con el mieloma y se tomó el volumen necesario para contener de $6-8 \times 10^6$ hibridomas. Se centrifugaron a 1000 rpm durante 10 min y se retira completamente el sobrenadante.

En una solución con 90% de 5FB y 10% de DMSO se re-suspende el botón celular y se guarda en criotubos a -36°C . No es recomendable congelar en nitrógeno líquido a -196°C , pues al descongelar la viabilidad se ve disminuida (84).

R E S U L T A D O S

La línea celular de mieloma de ratón P3 X63 Ag-8 (6.5.3) se mantuvo proliferando en total esterilidad y bajo las condiciones antes descritas en cultivo continuo. La expansión del mieloma se realizó en periodos que fluctuaron de dos a tres semanas previas a cada una de las fusiones. El número aproximado de células de mieloma y de linfocitos utilizados para cada una de ellas, así como las diversas fuentes de error que impidieron un crecimiento favorable en las cinco primeras se muestra en el cuadro 1.

En la última fusión se utilizó una modificación del método propuesto en 1981 (79), pues se utilizó una mayor cantidad de los dos tipos celulares, lo que nos permitió incrementar la eficiencia de fusión. Se sabe que pueden existir en el cultivo varias combinaciones celulares al momento de la fusión y por probabilidad muy pocas de ellas ser la fusión mieloma-linfocito B. Sin embargo al aumentar la celularidad de ambas poblaciones aumentó también la probabilidad de tener esta combinación. De aquí se debe tomar en cuenta que de los hibridomas producidos sólo una pequeña proporción, no mayor del 5%, estará sintetizando el Ac específico y de estas únicamente una fracción lo estará secretando. Lo anteriormente expuesto estuvo en concordancia con los resultados observados luego de la sexta fusión al revisar las placas con microcultivos bajo el microscopio invertido.

FUSION	CEL. MIELOMA (x 10 ⁶)	LINFOCITOS (x 10 ⁶)	FUENTE DE ERROR
F1	50	150	Baja eficiencia de fusión.
F2	50	150	Baja eficiencia de fusión.
F3	43	150	Contaminación del medio.
F4	48	150	Alcalinización del medio.
F5	42	150	Alcalinización del medio.
F6	110	800	Ninguna.

Cuadro 1. Número aproximado de células de mieloma y de linfocitos utilizados en cada una de las seis fusiones y fuentes de error que impidieron el crecimiento favorable de las cinco primeras.

Estas observaciones no se cuantificaron, sin embargo la eficiencia de fusión fue notablemente más alta que en las fusiones anteriores.

El cuadro 2 muestra los SFB utilizados para el mantenimiento de mieloma e hibridomas en los experimentos, así como la viabilidad promedio y la concentración celular por unidad de volumen que pudo mantener cada uno. Se observa que el suero de HI-clone fue el más eficiente y consecuentemente tuvo un rendimiento mayor. Sin embargo también se puede apreciar que la eficiencia va aumentando conforme se probaron los diversos SFB, lo cual representa un sesgo ya que al adquirir más experiencia éstos se utilizaron más eficientemente.

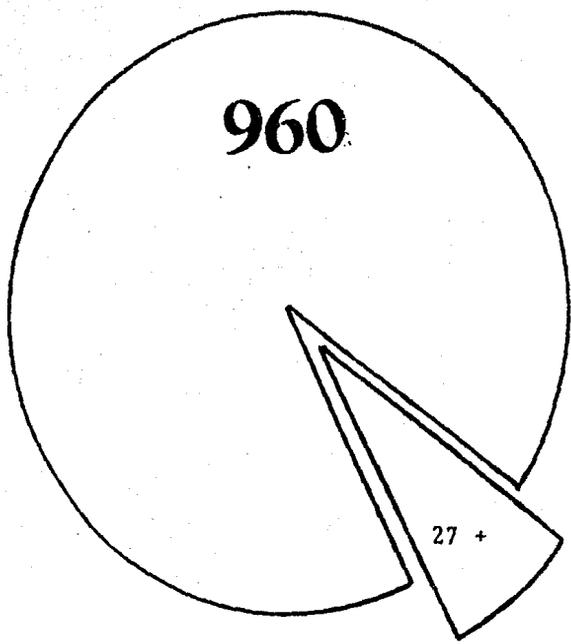
LOTE DE SFB Y MARCA	VIABILIDAD PROMEDIO	CONCENTRACION PROM. CELULAS MIELOMA/ml
169 (Microlab, Méx.)	90%	1.3×10^6
152 (Microlab, Méx.)	92%	1.5×10^6
- (Sigma, USA)	82%	1.0×10^6
203 (Microlab, Méx.)	89%	1.6×10^6
- (HI-clone, USA)	95%	2.2×10^6

Cuadro 2. Resultados comparativos de los SFB utilizados en las seis fusiones que muestran la eficiencia de cada lote así como el número de células de mieloma que podían mantener por mililitro de medio de cultivo.

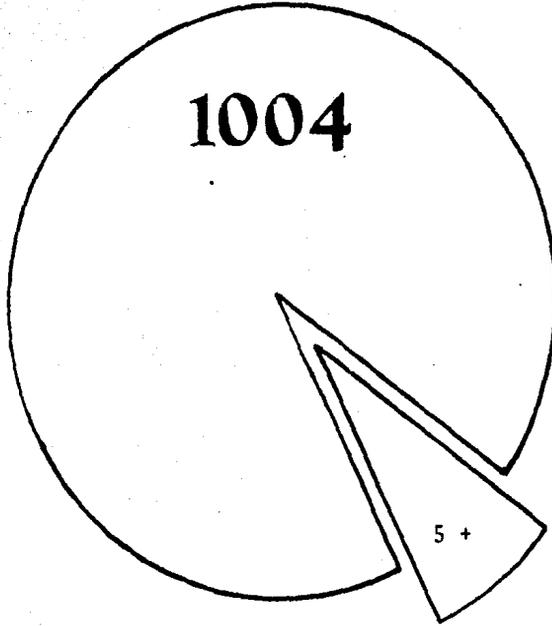
La mayor eficiencia de fusión se obtuvo al utilizar el polietilén-glicol (PEG) de PH 1500 (Baker, USA) y aun con esto no rebasó el 10% de eficiencia en ninguna de las placas. Sin embargo al realizar el análisis de Ac de los pozos con colonias, mostraron que la mayor parte de ellos tenían reactividad positiva al hacer la prueba de ELISA. Para evitar caer en errores relacionados con la posibilidad de que el sobrenadante de las células del mieloma dieran reacción cruzada con el Ag, al momento de hacer el ensayo inmunoenzimático se probaron los sobrenadantes de éstos y se observó que no dieron reacción positiva.

De los 960 microcultivos que se hicieron para la sexta fusión celular sólo 27 resultaron con colonias positivas, lo cual representa únicamente 2.8% del total (gráfica 1). De estos, cinco pozos fueron clonados con la metodología ya descrita mientras que 22 se expandieron a dos pozos de microcultivo inicialmente para de ahí expandir la población celular. En total se tuvieron 1004 microcultivos (gráfica 2).

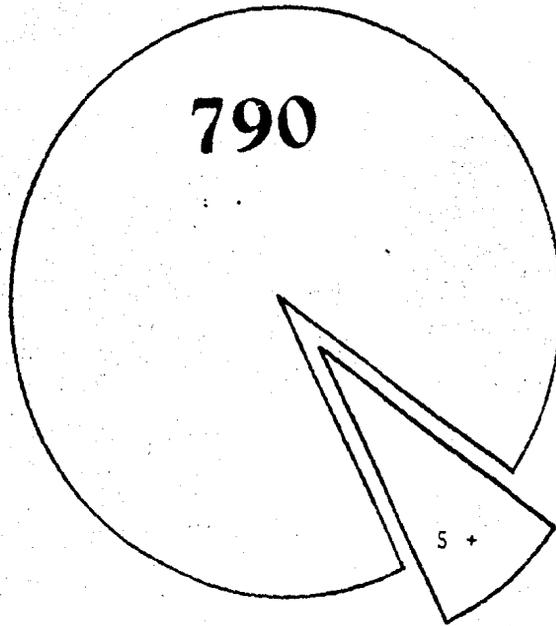
Para la segunda clonación se seleccionaron cuatro pozos que tenían tan sólo una colonia grande y que además habían resultado con lecturas de absorbancia más altas en la prueba de ELISA. Por otra parte se expandieron seis pozos en placas que se marcaron como expansión #1, expansión #2 y así sucesivamente. De esta segunda clonación se prepararon 196 microcultivos por cada pozo clonado dando un total de 784 aparte de los expandidos (gráfica 3).



Gráfica 1. Muestra el número de pozos cultivados en la sexta fusión, mientras que el corte a la misma representa el número de pozos positivos (2.8%).



Gráfica 2. Representa el número de microcultivos de la primera clonación. El corte a la gráfica indica el número de pozos positivos.



Gráfica 3. Representa el número de microcultivos de la segunda clonación, mientras que el corte a la misma indica el número de pozos positivos a partir de los cuales surgieron las cinco líneas de Ac mon productoras y secretoras.

Para la tercera clonación se utilizaron cuatro pozos haciendo un total de 784 microcultivos que no proliferaron por lo que se eliminaron. Así a partir de la segunda clonación se eligieron cinco líneas celulares que se fueron expandiendo hasta tenerlas en botellas de cultivo. Estas líneas se marcaron con las siguientes iniciales; 0 2-2, 0 2-5, 4A-C1, 4A-C9 y A2-C1 las cuales se utilizaron para la expansión masiva de hibridomas productores de Ac mon. El cuadro 3 muestra el número de ratones inoculados con hibridomas y la cantidad de células utilizadas para cada una de las cinco clonas.

CLONA	HIBRIDOMAS ($\times 10^6$)	No. RATONES
0 2-2	8.0	6
0 2-5	8.0	6
4A-C1	6.0	5
4A-C9	6.0	3
A2-C1	4.0	2

Cuadro 3. Proporción de hibridomas productores de Ac mon específico inoculados para la expansión masiva en ratones Balb/c. Estos fueron inoculados previamente con aceite mineral para inducir el tumor ascítico.

Un segundo lote de hibridomas se inocularon en ratones Balb/c previamente oristanizados. Estos hibridomas se hicieron proliferar en supermedio que contenía únicamente 5% de 3FB HI-clone. El cuadro 4 muestra el número de hibridomas de cada clona que fueron inoculados IP en dichos roedores.

CLONA	HIBRIDOMAS (x10 ⁶)	No.RATONES
0 2-2	6.0	5
0 2-5	5.0	4
A2-C1	4.0	4
4A-C9	3.0	3

Cuadro 4. Proporción de hibridomas productores de Ac mon específico inoculados para una segunda expansión masiva en ratones Balb/c. Estos fueron inoculados previamente con aceite mineral (pristán) para inducir la formación del tumor ascítico en la cavidad peritoneal.

Después de la segunda expansión masiva se procedió a congelar las cinco clonas de hibridomas bajo la metodología ya descrita. De igual forma se congelaron los sobrenadantes de éstas. Los datos se pueden apreciar en los cuadros 5 y 6 respectivamente.

CLONA	HIBRIDOMAS ($\times 10^6$)	No. CRIOTUBOS (1 ml)
O 2-2	6.0	4
O 2-5	5.5	5
4A-C1	5.0	1
A2-C1	3.0	3
4A-C1	7.5	2
4A-C9	6.0	5

Cuadro 5. Número de criotubos congelados a -36°C de cada una de las líneas productoras de Ac. mon, así como el número de células por mililitro.

SOBRENADANTES	VOLUMEN (ml)
0 2-2	43
0 2-5	35
4A-C1	09
4A-C9	10
A2-C1	08

Cuadro 6. Muestra el volumen de sobrenadantes recuperados de las cinco clonas.

Tanto de la primera como de la segunda expansión se recuperó una cantidad impresionante de líquidos ascíticos. Los volúmenes recuperados de cada clona se muestran en el cuadro 7.

CLONA	VOLUMEN (ml)
0 2-2	35
0 2-5	32
4A-C1	15
4A-C9	07
A2-C1	10

Cuadro 7. Muestra el volumen de líquido ascítico recuperado de cada clona.

D I S C U S I O N

Es claro que la preparación de Ac mon presenta notorias ventajas sobre la producción de antisueros convencionales. Así cuando un animal es inmunizado con una mezcla antigénica, responde de forma muy compleja hacia cada uno de ellos. De hecho, pequeñas cantidades de un contaminante pueden ser antigénicamente dominantes y los Ac producidos contra componentes específicos estarán mezclados con los Ac que se unen a los Ag restantes.

En los sueros convencionales se pueden hacer purificaciones parciales que generalmente son demasiado complejas y en ellas se puede gastar gran cantidad de tiempo y dinero, además de la pérdida de Ac para lograr los resultados deseados. Sin embargo en la metodología con Ac mon la selección de Ac se reduce a la clonación y ha resultado una poderosa herramienta en problemas biomédicos básicos y aplicados (85).

En el presente estudio la inmunización se hizo con una mezcla de proteínas muy compleja y heterogénea pues se realizó con epidermis de cobayo, donde no únicamente existían que ratinocitos sino también otras poblaciones celulares. Así pues, con la finalidad de incrementar la respuesta de los ratones para producir Ac, el Ag se emulsificó con ACF y el cultivo con la utilización del principio básico antes mencionado se seleccionaron las líneas celulares productoras de Ac específico.

La concentración de proteínas con la que se inmunizó

a los ratones y el número de exposiciones al Ag fue similar a la utilizada en otros experimentos no relacionados pero que proporcionaron resultados positivos. Además la observación directa del bazo al momento de disectarlos nos indicó por su gran tamaño el éxito en esta primera parte del experimento.

Se conoce que el suero es tóxico para las células por lo que nunca se utiliza concentrado. Usualmente se diluye a una concentración de 10-20% (v/v). Esta toxicidad intrínseca probablemente se debe al hecho de que muchas sustancias potencialmente citotóxicas presentes en el suero nunca dejan los espacios vasculares, para estar en contacto directo con las células de otros tejidos. Las células cuya proliferación está dirigida por hormonas, usualmente requiere que las mismas se encuentren en concentraciones mucho mayores que las encontradas dentro del organismo, aparte de que existen algunas zonas donde las hormonas tienen una concentración mayor que en la circulación general. Por estas razones no se puede esperar que el suero diluido proporcione el medio ambiente ideal para el crecimiento de diferentes líneas celulares (86-87).

Durante el desarrollo de nuestros experimentos nos vimos forzados a cambiar de marca y lotes de SFB. Finalmente utilizamos SFB de Hi-clone que permitió la recuperación de pozos en expansión y clonados que otros sueros no podían mantener pues su eficiencia era muy baja. Se contó así con un suero capaz de mantener un número muy bajo de células, que no excedía de 25 cé

lulas por pozo, con lo que se pudo asegurar la calidad monoclonal de las líneas celulares productoras de Ac específico.

Los experimentos iniciales para la formación de hibridomas fueron llevados a cabo utilizando como agente fusógeno el virus de Sendai. Este tiene un alto grado de eficiencia pero presenta dificultades en su manejo. A mediados de la década de los setentas se introdujo un fusógeno químico, el PEG que es un agente aglutinante de protoplastos vegetales. Cuando se comparó la eficiencia de fusión del virus de Sendai inactivado con radiación UV contra el PEG se concluyó que la de éste último era mayor. De hecho la mayor parte de las fusiones en la actualidad se desarrollan utilizando PEG.

Se encontró que la concentración ideal para usarlo es al 50% diluido con DMEM. También se encontró que la frecuencia de hibridización es altamente dependiente del pH del fusógeno, así como el del medio de cultivo. A lo largo de nuestros experimentos se probaron diferentes marcas y lotes de PEG, encontrándose uno que superaba a los restantes en su capacidad fusógena notablemente. Ahora bien la fusión de las membranas celulares consiste de dos etapas diferentes (las cuales se han estudiado con muestras de células recién fusionadas, al microscopio electrónico) primero la aglutinación celular durante la cual las membranas plasmáticas de dos células adyacentes se aproximan y segundo la formación de puentes intercitoplásmicos que conlleva a la formación de heterocariontes.

Así el proceso de fusión se ha observado y se ha hecho una analogía con el proceso de exocitosis, pero el mecanismo de acción del fusógeno aun es desconocido. La inducción de las fusiones se llevó a cabo de forma más eficiente cuando se realizó a 37°C (88).

El crecimiento continuo de los hibridomas está de terminado por la fusión de linfocitos B y células de mieloma. En los primeros experimentos de fusión celular la línea celular empleada sintetizaba Ig con cadenas ligeras y pesadas que al momento de la fusión producían gran cantidad de Ig inespecífica. Por técnicas de selección se desarrollaron líneas celulares que no las sintetizaban. Con esto los hibridomas únicamente secretarían Ig proveniente de los linfocitos B, y en la actualidad existen toda una gama de mielomas de ratón adecuadas para este propósito. Las primeras líneas celulares derivaron de ratones Balb/c en los que se indujeron plasmacitomas y el primer tumor se denominó MPC-11, de él surgió la línea celular 4T0. 2 resistente a la 6-tioguanina.

Otra línea celular de plasmacitomas resistente a la 8 azaguanina es la P3K que se desarrolló en cultivo de tejidos a partir de un tumor inducido con aceite mineral llamada MOPC-21. De la anterior se originó la línea celular parental de la utilizada en el presente trabajo y que es la P3 X63 Ag-8 (6.5.3), que no secreta ninguna Ig.

En el desarrollo de estos experimentos se pudo cons

tatar que ciertos factores son determinantes en la producción de Ac mon y algunos de ellos ya fueron mencionados. Otros como las fluctuaciones de pH y temperatura deben ser evitados al máximo sobre todo luego de la fusión celular, por lo que inmediatamente después de ésta las placas deben ser introducidas en la incubadora de CO₂ y no debe ser abierta por lo menos en 48 hr. El abrir ocasionalmente la incubadora conduce a un crecimiento retardado de las colonias o hasta la muerte de los híbridos por pérdida de humedad y CO₂. Las células de mieloma comienzan a morir unas 48 hr después de la fusión (90), mientras que la vida media de los linfocitos no fusionados es mayor. Todas las condiciones antes mencionadas son requisito indispensable para tener éxito en la producción de hibridomas si se persigue la producción de Ig por largos periodos.

Las modificaciones a la metodología (79) aumentaron en gran medida (no cuantificado) la eficiencia de fusión pues es claro que al no tocar las células con la pipeta se aumenta su viabilidad (89).

Se ha comprobado que dos clonaciones son suficientes para obtener la estabilidad cromosómica de la línea celular aunque otros discrepan argumentando que únicamente al obtener la cuarta clonación se logra ese objetivo. En el presente trabajo se hizo una tercera clonación que se perdió debido a la baja eficiencia del suero que no permitía rebasar concentraciones mínimas de 800×10^3 células/ml.

Otros grupos de trabajo ajenos al nuestro obtuvieron resultados similares con suero del mismo lote (comunicación personal de Concepción Gutiérrez, UAM-I). De ahí que tuviéramos que trabajar exclusivamente con los hibridomas de la segunda clonación.

De esta segunda clonación surgieron cinco líneas celulares que se pudieron expandir desde microcultivos hasta botellas. Su tasa de proliferación con el suero Hi-clone se cuadruplicó, por lo que el tiempo para realizar la expansión masiva fue muy corto. Lo anterior sugiere como ya se había mencionado que un buen suero puede ahorrar muchos reactivos y tiempo.

La cantidad de Ig que se produce en un cultivo no rebasa los 100 ug/ml y aunque no se midió para el presente estudio, con ayuda del lector de ELISA se tuvo una medida de comparación contra sueros de animales inmunizados y no inmunizados. Este ensayo nos da una medida de la avidéz o afinidad con la que el Ac se une al Ag que a su vez es una medida de la concentración del primero (91-93).

Para la expansión masiva in vivo luego de la sensibilización con pristán en los ratones, se inyectaron cuatro líneas celulares diferentes con excepción de la clona 4A-C1 cuyo crecimiento fue más lento. Se ha propuesto que las células que tienen esta forma de crecimiento secretan una mayor cantidad de Ig (94).

Como cada uno de los ratones produce más de 10 ml de líquido ascítico, es factible suponer que se obtienen cientos de

miligramos de Ac específico. Así con estas cinco clonas hemos producido una batería de Ac que reaccionan con un Ag en particular, de los cuales es posible seleccionar el que resulte mejor para demostrar una cierta estructura dentro de un tejido a probar.

La determinación de las células que originan las neoplasias poco diferenciadas es un problema frecuente en el diagnóstico diferencial del patólogo. La detección de algunos Ag requiere un procesamiento de la muestra, que presenta ciertas limitaciones, sin embargo con la utilización de Ac mon se permite la caracterización de neoplasias linfoides. Los Ac mon contra diferentes queratinas dan un patrón de tinción distintivo. Estas representan marcadores efectivos de los tumores que pueden ser detectados en muestras que estén incluidas en parafina y procesadas por métodos inmunohistoquímicos. Finalmente se ha encontrado que la tinción con Ac mon es más variada y menos consistente cuando se hace contra Ag de membranas epiteliales que contra queratinas (95-96).

Con la producción de estos Ac mon se tiene lista la herramienta para llevar a cabo el estudio de identificación de las diferentes clases de queratinas que componen las células de la epidermis de cobayos. Más adelante se pretende utilizarlos para determinar cambios o modificaciones anormales en las queratinas de tumores en tejido epitelial.

A P E N D I C E

Preparación de medios de cultivo, soluciones y reactivos.

Solución balanceada de fosfatos (PBS)

Cloruro de sodio (NaCl).....	2.22 g
Fosfato dibásico de sodio (Na ₂ HPO ₄)	0.286 g
Fosfato monobásico de sodio (NaH ₂ PO ₄)	0.155 g

Se aforó en matraz volumétrico con 300 ml de Hbd

Solución salina balanceada de Hanks (SSBH)

Cloruro de sodio (NaCl)	4.0 g
Cloruro de potasio (KCl)	0.2 g
Cloruro de calcio (CaCl ₂)	0.07 g
Sulfato de magnesio (MgSO ₄ .7H ₂ O)	0.05 g
Cloruro de magnesio (MgCl ₂ .6H ₂ O)	0.03 g
Fosfato monobásico de potasio (KH ₂ PO ₄) .	0.03 g
Glucosa (C ₆ H ₁₂ O ₆)	0.5 g
Rojo fenol (0.1%)	0.01 ml
Bicarbonato de sodio (NaHCO ₃)	0.175 g

Se aforó en matraz volumétrico con 500 ml de Hbd

Solución de EDTA

PBS	500 ml
Acido etilendiamino tetra acético (EDTA)	7.6 g

Solución de 8-azaguanina (stock)

Se añaden 76 mg de 2-amino-6oxi-8-azaguanina (Sigma, USA) en 35 ml de DMEM y se disuelven añadiendo gota a gota NaOH (1N) recién preparado. Una vez disuelto se lleva a 50 ml de DMEM. Esta solución se ajusta a pH 9.0 con ácido acético (1N) y se esteriliza por filtración con membrana Millipore de 0.22 μ m.

Solución de trabajo de 8-azaguanina

Se agregan 10 ml de la solución stock en 90 ml de supermedio para dar una concentración final de 1×10^{-3} M.

Solución de 2-mercaptoetanol (stock)

Se prepara una solución (0.1M) de 2-hidroximercaptoetanol (Sigma, USA) cuyo PM es de 78.13 y su densidad a 20°C de 1.114. Se prepara diluyendo en H₂O o NaCl (0.9%) hasta tener una solución 1×10^{-3} M. Se esteriliza por filtración.

Solución de trabajo de 2-mercaptoetanol

De la solución stock se toman 0.5 ml por cada 100 ml de supermedio con lo que se obtiene una concentración final de 5×10^{-5} M.

Solución de gentamicina (stock)

Gentamicina (Lilly, Méx. 60 mg/1.5ml) 2.0 ml
 H₂O 6.0 ml

Solución de trabajo de la gentamicina

De la solución stock se toman 100 μ l y se llevan a 100 ml de supermedio quedando una concentración final de 10 ng/ml.

Preparación del supermedio

SFB	20.0 ml
Antibac (microlab, Méx.)	0.1 ml
Gentamicina (Lilly, Méx.)	0.1 ml
Insulina (Lilly, Méx.)	0.25 ml
Glutamina (Microlab, Méx.)	2.0 ml
Antifun (Microlab, Méx.)	1.0 ml
2-mercaptoetanol (Sigma, USA)	0.5 ml
Aminoácidos no esenc.(Microlab, Méx.)	1.0 ml
Piruvato de sodio (Microlab, Méx.) ..	1.0 ml
DMEM (Microlab, Méx.)	75.0 ml

Solución H-T (100x)

Hipoxantina (Sigma, USA)	0.1361
Timidina (Sigma, USA)	0.0388

Se llevan a 100 ml de Hbd que previamente está calentada a 80°C y se agita hasta hacer una solución homogénea. Lo anterior se realiza en un vaso de precipitado de 500 ml de capacidad tapandose con un vidrio de reloj para restituir el agua evaporada. Disolver con mechero al momento de utilizarla.

Solución de aminopterina (1000 x)

Aminopterina (Sigma, USA) 17.6 mg

Esta cantidad se disuelve en 80.0 ml de Hbd. Si no se disuelve total y rápidamente se agregan algunas gotas de NaOH (0.1M), luego se afora a 100 ml y se guarda en alfcuotas de 10 ml a -20°C.

Solución de HAT para medio de selección (50 x)

Solución HT (100 x) 50.0 ml

Solución de aminopterina (1000 x) 5.0 ml

Hbd 45.0 ml

Esterilizar por filtración con membranas de Milliipore 0.22um y guardar en alfcuotas de 10 ml. Almacenarlo a -20°C.

Solución HT para mantener hibridomas (50 x)

Solución HT (100 x) 50.0 ml

Hbd 50.0 ml

Medio de selección HAT (1 x)

Solución HAT (50 x) 2.0 ml

Supermedio 98.0 ml

Solución de azul tripano

Azul tripano (0.2%) 8.0 ml

Solución de NaCl (4.25%) 2.0 ml

Solución de hidróxido de sodio (1N)

NaOH 40.0 g

Se disuelven en 1 L de Hbd y se esterilizan por autoclave (121°C durante 15 min).

Solución para diluir la enzima peroxidasa

Cloruro de sodio (NaCl) 2.925 g

Fosfato dibásico de sodio (Na₂HPO₄) 0.142 g

Se afora a 100 ml de Hbd ajustando previamente el pH a 8.0 De aquí se tiene una concentración de cloruro de sodio (0.5M) y (10 mM) del otro reactivo.

Solución del sustrato (stock)

Acido cítrico (0.05 M, pH 4.0) que se prepara pesando 0.2626 g disueltos en 25 ml de Hbd. Peróxido de hidrógeno (H₂O₂ 0.5 M, 2%) que se prepara tomando 52 ml de la botella al 30% y se afora a 1 L. Acido 2,2-diazino bis (3-etilbenzotialinsulfónico) ABTS (40 mM) que se prepara pesando 0.549 g en 25 ml de Hbd.

Solución de trabajo para el sustrato

Acido cítrico (0.05 M) 5.0 ml

ABTS (40 mM) 20.0 ul

H₂O₂ (0.5 M) 25.0 ul

Solución para diluir el Ac

Fosfato dibásico de sodio (Na_2HPO_4)	0.67 g/100 ml
Azida de sodio (NaN_3)	0.02%

Se prepara la solución aforando a 100 ml de Hbd y se agrega el otro reactivo en ese porcentaje quedando a una concentración final de (25 mM). Se ajusta el pH a 7.4

Solución A-B (stock)

Bicarbonato de sodio (Na_2HCO_3)	200.0 g
Hidróxido de sodio (NaOH)	40.0 g
Tartrato de sodio	2.0 g

Se lleva a 10 L de Hbd y se almacena en frascos de color ambar a temperatura ambiente. Esto último corresponde a la solución A.

Sulfato de cobre ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$)	5.0 g
--	-------

Se lleva a 1 L con Hbd y se guarda en frascos ambar temperatura ambiente. Esta es la solución B.

Solución C de trabajo.

Solución A	15.0 ml
Solución B	1.5 ml

Solución de Folin-Ciocalteu

Folin-Ciocalteu (Aldrich, USA)	0.5 ml
Hbd	5.0 ml

Solución de BSA (10 mg/10 ml)

Albúmina sérica de bovino (Sigma, USA) Fracc V 0.01 g

Hbd 10.0 ml

R E F E R E N C I A S

- 1) HAM, A. Tratado de Histología. 6a edición. Nueva editorial Interamericana (México) 360, 1970.
- 2) JUNQUEIRA, L. y CARNEIRO, J. Basic Histology. 3a edición Lange medical publications (USA) 378-391, 1971.
- 3) TUNG-TIEN, S. y GREEN, H. Differentiation of the epidermal keratinocyte in cell culture: Formation of the cornified envelope. Cell. 9:511, 1976.
- 4) JENSEN, P, NORGARD, J y BOLUND, L. Changes in basal cell subpopulations and tissue differentiation in human epidermal cultures treated with epidermal growth factor and cholera toxin. J. Cell Pathol. 49:325, 1985.
- 5) WEBER, K. y OSBORN, M. Moléculas de la matriz celular. Inv. y Ciencia. 111:76, 1985.
- 6) EVANS, N y RUTTER, N. Development of the epidermis in the newborn. Biol. Neonate 49:74, 1986.
- 7) BECKER, S. y ZIMMERMANN, A. Further studies in melanocytes and melanogenesis in the human fetus and newborn. J. Invest. Dermat. 12:103, 1955.

- 8) BOCK, P. Fine structure of Langerhans cells in the stratified epithelia of the esophagus and stomach of mice. *Z. Zellforsch.* 147:237, 1974.
- 9) CARRILLO-FARGA, J. y MONTALVO, C. Células de Langerhans en el cobayo albino estudio morfométrico. *Patología.* 23:27, 1985.
- 10) ROBINS, P. y BRANDON, L. A modification of the adenosine triphosphatase method to demonstrate epidermal Langerhans cells. *Stain Technology.* 56:87, 1981.
- 11) SJOBORG, S. A new method for visualization of the epidermal Langerhans cell and its application on normal and allergic skin. *Acta dermatovener. Suppl.* 79, 1978.
- 12) ELLEDER, M. Activity of alpha d-manosidase in human Langerhans epidermal cells. *J. Cell Pathol.* 19:93, 1975.
- 13) BROWN, W. y HABOWSKY, J. Comparative ultrastructure and cytochemistry of epidermal response to tape stripping ethanol and vitamin A acid in hairless mice. *J. Invest. Dermatol.* 73:203, 1979.
- 14) ELMETS, C., BERGSTRESSER, P. y STREILEIN, W. Differential distribution of Langerhans cells in organ culture of human skin. *J. Invest. Dermatol.* 79:340, 1982.

- 15) MURPHY, G., HARRIST, T. y MIHM, M. Distribution of cell surface antigens in histiocytosis X cells. *Lab. Invest.* 48:90, 1983.
- 16) STINGL, G. Epidermal Langerhans cells bear Fc and C3 receptors. *Nature.* 268:245, 1977.
- 17) ROITT, I. *Essential Immunology.* 5a edición. Blackwell Sci. Pub. (Oxford). 65-66, 1980.
- 18) LAZARIDES, E. Intermediate filaments as mechanical integrators of cellular space. *Nature.* 283:249, 1980.
- 19) MARCHUK, D., McCROHON, S. y FUCHS, E. Remarkable conservation of structure among intermediate filaments genes. *Cell.* 39:491, 1984.
- 20) STEINERT, P., ALASDAIR, C. y ROOP, D. The molecular biology of intermediate filaments. *Cell.* 42:411, 1985.
- 21) EICHNER, R., TUNG-TIEN, S. y AEBI, U. The role of keratin pairs in the formation of human epidermal intermediate filaments. *J. Cell Biol.* 102:1767, 1986.

- 22) TUNG-TIEN, S., EICHNER, R., NELSON, W., SCHEFFER, T., WEISS, R. y WOODCOCK, J. Keratin classes:molecular markers for different types of epithelial differentiation. J. Invest. Dermatol. 81:109, 1983.
- 23) REGNIER, H., SCHWEIZER, J., MICHEL, S., BAILLY, C. y PRUNIERAS, H. Expression of high molecular weight (67K) keratin in human keratinocytes cultures on dead de-epidermized dermis. Exp. Cell Res. 165:63, 1986.
- 24) STAIANO-COICO, L., HIGGINS, J. Human keratinocyte culture. J. Clin. Invest. 77:396, 1986.
- 25) KATOH, Y., KODAMA, K. y ISHIKAWA, T. In vivo effects of epidermal and fibroblast growth factors on DNA replication in mouse skin. Exp. Cell Res. 161:111, 1985.
- 26) BOONSTRA, J., LAAT, S. y PONEC, M. Epidermal growth factor receptor expression related to differentiation capacity in normal and transformed keratinocytes. Exp. Cell Res. 161:421, 1985.
- 27) JENSEN, P. y BOLUND, L. Changes in proliferating cell subpopulations and mitotic activity in human epidermal cultures treated with epithelial growth inhibitors. J. Invest. Dermatol. 86:46, 1986.

- 28) PRUNIERAS, M. REGNIER, M. y WOODLEY, D. Methods for cultivation of keratinocytes with air-liquid interface. J. Invest. Dermatol. 81:28, 1983.
- 29) KARASEK, M. Culture of human keratinocytes in liquid medium J. Invest. Dermatol. 81:24, 1983.
- 30) FRAAS, C., KIRKHU, B. y SCHJOLBERG, R. Cell cycle progression kinetics of regenerative mouse epidermal cells. An in vivo study combining DNA flow cytometry, cell sorting and (3H)d Thd autoradiography. J. Invest. Dermatol. 86:402, 1985.
- 31) SIMPSON, R., SCHMIT, J., MORITZ, R., OHARE, M., RULAND, P., MORRISON, J., LLOYD, C., GRECO, B., BURGESS, A. y NICE, E. Rat epidermal growth factor:complete amino acid sequence. Eur. J. Biochem. 153:629, 1985.
- 32) NICKOLOFF, B. BASHAM, T., MERIGAN, T. y MORHENN, V. Anti-proliferative effects of recombinant alpha and gamma Interferons. Lab. Invest. 51:697, 1984.
- 33) YUSPA, S., KULESZ, M., BEN, T. y HENNINGS, H. Transformation of epidermal cells in culture. J. Invest. Dermatol. 81:162, 1983.

- 34) McCULLOUGH, J., PECKHAM, P., KLEIN, J., WEINSTEIN, D. y JENKINS, J. Regulation of epidermal proliferation in mouse epidermis by combination of difluoromethyl ornithine DFMO and methylglyoxal bis-guanilhidrazone MGBM. J. Invest. Dermatol. 85:518, 1985.
- 35) HERBICH, G. Epidermal changes limited to the epidermis of guinea pig skin by low power dioxide laser irradiation. Arch. Dermatol. 122:132, 1986.
- 36) FUSENING, N., BREITKREUTZ, D., DZARLIEVA, R., BOUKAMP, P., BOHNERT, A. y TILGEN, W. Growth and differentiation characteristics os transformed keratinocytes from mouse and human skin in vitro and in vivo. J. Invest. Dermatol. 81:168, 1983.
- 37) SAUDER, D., CARTER, C., STEPHEN, B., KATZ, I. y OPPENHEIM, J. Epidermal cell production of thymocyte activating factor (ETAF). J. Invest. Dermatol. 79:34, 1982.
- 38) GAHRING, L., BUCKEY, A. y DAYNES, R. Presence of epidermal derived thymocyte activating factor/interleukin 1 in normal human stratum corneum. J. Clin. Invest. 76:1585 1985.

- 39) PENTLAND, A. y NEEDLEMAN, P. Modulation of keratinocytes proliferation in vitro by endogenous prostaglandin synthesis. J. Clin. Invest. 77:246, 1986.
- 40) GOODWIN, J. y CEUPPENS, J. Regulation of the immune response by prostaglandins. J. Clin. Immunol. 3:295, 1983.
- 41) OSBORN, M. y WEBER, K. A monoclonal antibody recognizing desmosomes: Use in human pathology. J. Invest. Dermatol. 85:385, 1985.
- 42) IWASAKI, K. Properties and dynamics of glucocorticoid binding capacity in rat skin. J. Invest. Dermatol. 86:428, 1986.
- 43) BAUER, W., BOEZEMAN, B., LAWRENCE, M., GROOM, H., RAMAECKERS, C. Monoclonal antibodies for epidermal population analysis. 60:72, 1986.
- 44) VIRTANEN, I., KARINIEMI, A. y LEHTO, V. Fluorochrome coupled lectins reveal distinct cellular domains in human epidermis. J. Histochem and Cytochem. 34:307, 1986.
- 45) RHEINWALD, J. y GREEN, H. Serial cultivation of strains of human epidermal keratinocytes: The formation of keratinizing colonies from single cells. Cell. 6:331, 1975.

- 46) MILPIED, N., DRENO, B., BUREAU, B. y HAROUSSEAU, J. Analysis of skin reactivity with monoclonal antibodies after allogenic bone marrow transplantation. *Exp. Hematol.* 13:82, 1985.
- 47) NINOMIYA, T., HIGASHIYAMA, H. y MORI, M. Effects of cryosurgery in experimental carcinoma on lectin binding and keratin distribution. *Cryobiol.* 22:547, 1985.
- 48) MADISON, C., WERTZ, P., STRAUSS, J. y DOWING, T. Lipid composition on cultures of murine keratinocytes. *J. Invest. Dermatol.* 87:253, 1986.
- 49) BOYCE, S. y HAM, R. Calcium regulated differentiation of normal human epidermal keratinocytes in chemically defined clonal culture and serum free serial culture. *J. Invest. Dermatol.* 81:33, 1983.
- 50) HOSHANKIS, V., McILJINNEY, R., RAGHAVAN, D. y NEVILLE, A. Monoclonal antibodies to detect human tumors: an experimental approach. *J. Clin. Pathol.* 34:314, 1981.
- 51) PINKUS, G., ETHERRIDGE, C. y OCONNOR, E. Are keratin proteins a better tumor marker than epithelial membrane antigen? *Am. J. Clin. Pathol.* 85:269, 1986.

- 52) STEINBERG, M. y DEFENDI, V. Transformation and immortalization of human keratinocytes by SV-40. *J. Invest. Dermatol.* Nature. 268:245, 1977.
- 53) SCHLIWA, M. y BLERKOM, J. Structural interactions of cytoskeletal components. *J. Cell Biol.* 82:114, 1979.
- 54) NICKOLOFF, B., BASHAM, T., MERIGAN, T. y MORHENN, V. Antiproliferative effects of recombinant alpha and gamma interferons. *Lab. Invest.* 51:697, 1984.
- 55) MOLLIGNAYA, G. y SHUBICK, M. Histochemical basis of the vertebrate epidermis differentiation in the comparative aspects. *Acta Histochem.* 70:214, 1982.
- 56) TONEGAWA, S. Moléculas del sistema inmunitario. *Inv. Ciencia* 111:90, 1985.
- 57) WINKELHAKE, J. Immunoglobulin structure and effector functions. *J. Immunocytochem.* 15:695, 1978.
- 58) STITES, D., STORO, J., FUDENBERG, H. y WELLS, J. Inmunología básica y clínica. 5a edición. El manual moderno (México) 13-44, 1985.

- 59) LERNER, R. y DIXON, F. The human lymphocyte as an experimental animal. *Sci. Am.* 228:82, 1973.
- 60) METZGER, H. The mechanism of action of antibodies. *Molec. Immunol.* 21:679, 1984.
- 61) SINKOVICS, J. Early history of specific antibodies- producing lymphocyte hybridomas. *Cancer Res.* 4:1246, 1981.
- 62) MILSTEIN, C., CLARCK, R., GALFRE, G. y CUELLO, C. Monoclonal antibodies from hybrid myelomas. *International congress of Immunology.* 1a edición. Academic Press 1279 pp 1980.
- 63) KOHLER, G. y MILSTEIN, C. Continuous cultures of fused cells secreting antibodies of predefined specificity. *Nature* 256:495, 1975.
- 64) BARSKI, G., SORIEUL, S. y CORNEFERT, Fr. Hybrid type cells in combined cultures of two different mammalian cell strains. *J. Natl. Canc. Inst.* 26:1269, 1961.
- 65) De PHINO, R., FELDMEN, L. y SCHARFF, M. Tailor made monoclonal antibodies. *Ann. Internal Med.* 104:225, 1986.

- 66) KEARNEY, J., RADBRUCH, A., LIESEGANG, B. y RAJEWSKY, K. A new mouse myeloma cell line that has lost immunoglobulin expression but permits the construction of antibody-secreting hybrid cell lines. *J. Immunol.* 123:1548, 1979.
- 67) DIAMOND, B. y SCHARFF, M. Monoclonal antibodies. *J. Am. Med. Assoc.* 248:3165, 1981.
- 68) BOSS, H. y WOOD, C. Genetically engineered antibodies. *Immunology Today.* 6:12, 1985.
- 69) RUDDLE, F. y KUCHERLAPATI, S. Hybrid cells and human genes. *Sci. Am.* 231:36, 1984.
- 70) COHN, M. Antibody diversity 1983: Some elementary considerations. *Progr. Immunol.* 5:839, 1983.
- 71) GARY, D., WANG, R., BARTHOLOMEW, R., SERVIER, D. ADAHS, T. y GREENE, H. The hybridoma-An immunochemical laser. *Clin. Chem.* 2779:1580, 1981.
- 72) DAVIS, W., MCGUIRRE, T. y PERRYMAN, L. Biomedical and biological application of monoclonal antibodies technology in developing countries. *Periodicum Biologorum.* 3:259, 1983.

- 73) GOODMAN, S. Lymphocyte hybridomas and their products. *Nat. Library Med.* 80:1, 1978.
- 74) LOWRY, O., ROSENBOUGH, N., FARR, A. y RANDALL, R. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193:265, 1951.
- 75) MEYERS, H. y SHIN, S. Specific resistance to 8-azaguanine in cells with normal hypoxanthine phosphoribosyltransferase (HPRT) activity; the role of guanine deaminase. *Cytogenet. Cell Genet.* 30:118, 1981.
- 76) SATO, G. Cell culture and physiology. In: *From gene to protein; Translation into biotechnology.* Academic Press. (USA) 45-60, 1982.
- 77) CARREL, A. Tissue culture and cell physiology. *Physiol. Rev.* 4:1, 1924.
- 78) WESTWOUTD, R. Improved fusion methods IV. Technical aspects. *J. Immunol. Method.* 77:181, 1985.
- 79) OI, V. y HERZENBERG, A. Immunoglobulin-producing hybrid cell lines. In: *Selected methods in cellular immunology.* 1a edición. W.H. Freeman (San Francisco) 351-353, 1981.

- 80) KOHLER, G., HOWE, S. y MILSTEIN, C. Fusion between immunoglobulin-secreting and non secreting myeloma cell lines. J. Immunol. 6:292, 1976.
- 81) GEFTER, M., MARGULIES, D. y SCHARFF, M. A simple method for PEG hybridization of mouse myeloma cells. J. Cell Genet. 3:231, 1977.
- 82) ROTHMANS, J. y CHEVEN, B. The effect of antigen cross-linking on the sensitivity of the ELISA. J. Immunol. Methods. 70:53, 1984.
- 83) LEHTONEN, O. y EEROLA, E. The effects of different antibody affinities on ELISA absorbance titer. J. Immunol. Methods. 54:233, 1982.
- 84) HALASZ, N. y COLLINS, G. Studies un cryoprotection II: Propylene glycol and glycerol. Cryobiol. 21:144, 1984.
- 85) SPRINGER, T. Monoclonal antibody analysis of complex biological systems. J. Biol. Chem. 256:3833, 1981.
- 86) KOVAR, J. y FRANEK, F. Serum-free medium for hybridomas and parental myeloma cell cultivation: a novel composition of growth supporting substances. Immunol Letters 7:339, 1984.

- 87) FAZEKAS DE ST., GROTH, S. y SCHEIDEGGER, D. Production of monoclonal antibodies. Strategy and tactics. *J.Immunol.Methods*.35:1,1980.
- 88) HARRIS, H. y WATKINS, F. Hybrid cells derived from mouse and man: Artificial heterokaryons of mammalian cells from different species. *Nature*. 205:640, 1965.
- 89) MILSTEIN, C. Anticuerpos monoclonales. *Inv. Ciencia*. 98: 38, 1980.
- 90) DeBLAS, A., RATNAPARKHI, H. y MOSIMANN, J. Estimation of the number of monoclonal hybridomas in a cell fusion experiment. Effect of post fusion cell dilution on hybridoma survival. *J. Immunol. Methods*. 45:109, 1981.
- 91) HERTZOG, P., SHAW, A., SMITH, J. y GARNER, R. Improved conditions for the production of monoclonal antibodies to carcinogen-modified DNA, for the use in ELISA. *J. Immunol. Methods*. 62:49, 1983.
- 92) MILLER, K., BOLT, D. y GOLDSBY, R. A rapid solution phase screening technique for hybridoma culture supernatants using radiolabeled antigen and solid phase immunoadsorbent. *J. Immunol. Methods*. 59:227, 1983.

- 93) VAIDYA, H. y LADENSON, J. Inadequacy of traditional ELISA for screening hybridoma supernatants for murine monoclonal antibodies. *Hybridoma*. 4:271, 1985.
- 94) DE BLAS, A., RATNAPARKHI, M. y MASIMANN, J. Estimation of the number of monoclonal hybridoma in a cell fusion experiment. Effect of post fusion cell dilution on hybridoma survival. *J. Immunol. Methods*. 45:109, 1981.
- 95) MIRRO, J., SCHWARTZ, J. y CIVIN, C. Simultaneous analysis of cell surface antigens and cell morphology using monoclonal antibodies conjugated to fluorescent microspheres. *J. Immunol. Methods*. 47:39, 1981.
- 96) HOUGHTON, A., BROOKS, H., COTE, R., TAORIMA, M., OETTGEN, H. y OLD, L. Detection of cell surface antigens by human monoclonal antibodies. *J. Exp. Med.* 158:53, 1983.