

45
21.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA



EXAMENES PROFESIONALES
FAC. DE QUIMICA

PRODUCCION Y CARACTERIZACION DE
ANTICUERPOS MONOCLONALES MURINOS DE
LA CLASE IgG, ESPECIFICOS PARA
FOSFOTIROSINA.

TESIS MANCOMUNADA
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO
P R E S E N T A N :
CLAUDINE LILIANE IRLES MACHUCA
JUAN MANUEL PEÑA CERON



MEXICO, D. F.

1997

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO:

Presidente: Prof. SATURNINO DE LEON CHAPA.

Vocal: Prof. FERNANDO GARCIA TAMAYO.

Secretario: Prof. ENRIQUE ORTEGA SOTO.

1er. Suplente: Prof. ROSANA PELAYO CAMACHO.

2o. Suplente: Prof. MARTHA CECILIA MORENO LAFONT.

SITIO DONDE SE DESARROLLO EL TEMA:

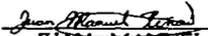
Ciudad Universitaria, Instituto de Investigaciones Biomédicas,
Departamento de Inmunología,
Laboratorio del Dr. Enrique Ortega Soto

Asesor del Tema:


DR. ENRIQUE ORTEGA SOTO

Sustentantes:


CLAUDINE LILIANE
IRLÉS MACHUCA


JUAN MANUEL
PEÑA CERÓN

Este trabajo se realizó bajo la supervisión del Dr. Enrique Ortega Soto, en el Departamento de Inmunología del Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM, gracias al financiamiento otorgado en los proyectos 3154P-N9607 de CONACYT y IN204696 de la DGAPA. Agradecemos la ayuda técnica de la Q.F.B. Claudia Angélica Garay Canales y del M en C. Antonio Ramirez Bárcenas.

NO DESISTAS

**Cuando vayan
mal las cosas
como a veces suelen ir;
cuando ofrezca tu camino
sólo cuestas que subir;
cuando tengas poco haber
pero mucho que pagar;
y practises sonreír
aún teniendo que llorar;
cuando ya
el dolor te agobie
y no puedas ya sufrir;
descansar acaso debes;
¡pero nunca desistir !.**

R. Kipling.

INDICE

	PÁG.
I. RESUMEN	2
II. INTRODUCCIÓN	3
II 1 Inmunoglobulinas	3
II 1.1 Estructura de las Inmunoglobulinas.	4
II 1.2 Interacción antígeno-anticuerpo	7
II 1.3 Funciones biológicas de los anticuerpos	10
II 1.4 Genética de Inmunoglobulinas	13
II 2 Anticuerpos Monoclonales	19
II 2.1 Generalidades	19
II 2.2 Usos de anticuerpos monoclonales	22
III. ANTECEDENTES	28
III 1 Transducción de señales mediada por receptores de membrana.	28
III 1.1 Generalidades	28
III 1.2 La agregación de receptores como mecanismo inductor de activación.	29
III 1.3 Fosforilación	29
III 1.4 Dominios SH2 y SH3	31
III 1.5 Receptores Multicadena de Reconocimiento Inmune (MIRRs).	33
III 1.6 Cinasas asociadas a los MIRRs	40
III 1.7 Un modelo del papel de la fosforilación en tirosina en transducción de señales por el Fc ϵ R1	41
IV. JUSTIFICACIÓN	44
V. OBJETIVOS	46
V 1. Objetivos Generales	46
V 2. Objetivos Particulares	46
VI. MATERIALES Y MÉTODOS	47
VI 1 Material Biológico	47
VI 2 Reactivos y preparación de soluciones	47
VI 3 Metodología	47
VI 3.1 Producción de anticuerpos monoclonales anti-fosfotirosina.	47
VI 3.1.1 Preparación del inmunógeno PY-Ala-Gly-KLH.	47
VI 3.1.2 Selección del donador de linfocitos	49
VI 3.1.3. Inmunización	49

VI.3.1.4. Selección de la línea celular del mieloma.	50
VI.3.1.5. Fusión celular	50
VI.3.1.6. Procedimiento post-fusión	52
VI.3.1.7. Selección de clones productoras de anticuerpos anti-fosfotirosina.	53
VI.3.1.7.1. Pruebas para detectar anticuerpos anti-fosfotirosina.	53
VI.3.1.7.2. Determinación del isotipo	54
VI.3.1.8. Clonación	56
VI.3.1.9. Cultivos a gran escala	57
VI.3.1.10. Criopreservación de los hibridomas	58
VI.3.1.11. Crecimiento de los hibridomas	59
VI.3.1.12. Purificación de anticuerpos monoclonales	59
VI.3.2. Caracterización de los anticuerpos monoclonales anti-fosfotirosina.	60
VI.3.2.1. Determinación del isotipo	60
VI.3.2.2. Determinación de la constante de afinidad	61
VI.3.2.3. Especificidad de los anticuerpos (comparación entre la capacidad de distintos fosfoaminoácidos para inhibir la unión de ACM ₂ a antígenos fosforilados)	62
VI.3.2.4. Detección de proteínas fosforiladas en tirosina mediante Western-Blot.	62
VI.3.2.4.1. Immunoblot anti-fosfotirosina	62
VI.3.2.5. Reconocimiento de proteínas celulares fosforiladas en tirosina por el anticuerpo monoclonal	64
VI.3.2.5.1. Tratamiento de células con pervanadato	64
VI.3.2.5.2. Immunoblot anti-fosfotirosina	65
VII. RESULTADOS	66
VII.1. Producción del anticuerpo anti-fosfotirosina	66
VII.2. Caracterización del anticuerpo antifosfotirosina ACM ₂	69
VII.2.1. Determinación del isotipo	69
VII.2.2. Determinación de la constante de afinidad y especificidad del anticuerpo (reactividad con distintos fosfoaminoácidos)	71
VII.2.2.1. Obtención de la concentración de ACM ₂	71
VII.2.2.2. Especificidad del anticuerpo	71
VII.2.2.3. Determinación de la constante de afinidad	74
VII.2.3. Detección de proteínas fosforiladas en tirosina mediante Western-Blot.	77
VII.2.4. Reconocimiento de proteínas celulares fosforiladas en tirosina por el anticuerpo monoclonal	77
VIII. DISCUSIÓN DE RESULTADOS	80
VIII.1. Producción de anticuerpos monoclonales anti-fosfotirosina.	80
VIII.2. Caracterización de los anticuerpos monoclonales ACM ₂ .	82
VIII.2.1. Comparación semi-cuantitativa de la constante de afinidad y especificidad del anticuerpo	82
VIII.2.1.1. Determinación de las constantes de ACM ₂ y PY20 por fosfoaminoácidos	82

VIII.2.1.2 Especificidad del anticuerpos (comparación entre los distintos fosfoaminoácidos)	86
VIII.2.2 Detección de proteínas fosforiladas en tirosina mediante Western-Blot	86
VIII.2.3 Reconocimiento de proteínas celulares fosforiladas en tirosina por el anticuerpo monoclonal	87
IX. CONCLUSIONES	89
X. PERSPECTIVAS	89
XI. APÉNDICE	90
XII. BIBLIOGRAFÍA	97

ABREVIACIONES.

Ag	Antígeno
Ac	Anticuerpo
Ala	Alanina
ATCC	Colección Americana de Tipos de Cultivo (American Type Culture Collection)
8-A	8-Azaguanina
FA	Fosfatasa Alcalina
BSA	Albúmina Bovina Sérica
BSA-PY	Fosfotirosina acoplada a Albúmina Sérica Bovina
BSA-PS	Fosfoserina acoplada a Albúmina Sérica Bovina
BSA-PT	Fosfotreonina acoplada a Albúmina Sérica Bovina
D-MEM	Medio Mínimo esencial modificado (Dulbecco's Modified Minimum Essential Medium)
DMSO	Dimetilsulfóxido
Fc γ R's	Receptores para el Fc de la IgG
Gly	Glicina
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
HAT	Hipoxantina, Aminopterina, Timidina
HT	Hipoxantina, Timidina
Ig	Inmunoglobulina
ITAM	Motivos Inmunes de activación en tirosina
Ka	Constante de afinidad
Kd	Constante de disociación
KLH	Hemocianina del molusco <i>Megathura crenulata</i> (Keyhole Limpets Hemoeyanine)
MF	Medio de Fusión
MIRRS	Receptores Multicadena de Reconocimiento Inmune
MM	Medio de mieloma
PEG	Poli(etil)englicol
PBS	Amortiguador salino de fosfatos
PS	Fosfoserina
PT	Fosfotreonina
PY	Fosfotirosina
RPM	Revoluciones por minuto
SDS-PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida-dodecilsulfato de sodio
SFB	Suero Fetal Bovino
TBS	Amortiguador salino y Trizma® base

I. RESUMEN.

Diferentes tipos de células del sistema inmune expresan en su membrana plasmática receptores para la fracción constante de las Inmunoglobulinas, a los que se denomina FcR's. La unión de complejos antígeno-anticuerpo a estos receptores induce su agregación, lo que a su vez desencadena una serie de eventos intracelulares que van a desembocar en la activación de las funciones efectoras de los anticuerpos, como citotoxicidad dependiente de anticuerpo, fagocitosis, liberación de mediadores de la inflamación y citocinas, proliferación de linfocitos, regulación de la producción de anticuerpos, etc. La secuencia precisa de los eventos bioquímicos intracelulares que están involucrados en la activación de las funciones efectoras, aún se desconoce. Sin embargo, se sabe que la agregación de los FcR's induce la activación o inactivación de ciertas enzimas, la elevación de la concentración citoplasmática de iones Ca^{2+} , la hidrólisis de fosfolípidos de inositol, y la fosforilación de proteínas celulares. La fosforilación de ciertos residuos en la proteína, puede modificar su función, induciendo un cambio en su actividad catalítica (en el caso de enzimas), o bien en su capacidad de unirse a otras proteínas. En el mecanismo de transducción de señales por receptores Fc, y por otros muchos receptores, la fosforilación de proteínas, en residuos de tirosina, es un evento central. Esto ha sido demostrado al observarse que se puede inhibir la respuesta celular con el uso de inhibidores de cinasas de tirosina. Los anticuerpos anti-fosfotirosina son una herramienta muy útil, para estudiar estos procesos pues pueden usarse para:

-Identificar si la activación celular induce cambios en el estado de fosforilación de proteínas.

-Aislar esas proteínas para su caracterización.

Este trabajo describe la preparación y caracterización parcial de un anticuerpo monoclonal específico para fosfotirosina, y su utilización en el estudio de la transducción de señales por receptores de Igs.

II. INTRODUCCION.

II. 1. Inmunoglobulinas.

En los animales vertebrados, existen células y moléculas que de manera colectiva y coordinada, responden a la presencia de sustancias reconocidas como extrañas al organismo, a esta respuesta se le conoce como respuesta inmune. De forma general, una sustancia reconocida como extraña (antígeno) es captada por células especializadas del sistema inmune (linfocitos, macrófagos) que llevan a cabo mecanismos efectores con el fin de mantener la integridad del organismo. Al comenzar a estudiar y caracterizar la respuesta inmune, se encontró que participaban tanto moléculas solubles presentes en suero, como células, postulándose así la división entre respuesta humoral y celular. Ahora se sabe que ambas son elementos que no funcionan separadamente si no en conjunto.

Los factores humorales son las inmunoglobulinas (anticuerpos), que son producidos por linfocitos B activados. Por otro lado, los linfocitos T cooperan en la producción de anticuerpos y pueden participar en reacciones de citotoxicidad, hipersensibilidad, etc. Todas estas respuestas son iniciadas por el reconocimiento de antígenos, en el cual intervienen la especificidad, diversidad y memoria de la respuesta inmune. Esto lleva a la activación de los linfocitos que reconocen específicamente al antígeno. Primero, las células proliferan, expandiéndose las clonas de linfocitos antígeno-específicas, amplificándose de esta manera la respuesta. Segundo, los linfocitos sufren una diferenciación, células cuya función primaria era reconocer al antígeno ahora son células efectoras que ayudan a eliminar antígenos.

Nuestro interés está enfocado en el estudio de anticuerpos que serán usados como herramientas para investigar la transducción de señales intracelulares. Es entonces fundamental conocer y entender las características estructurales y funcionales de estos elementos de la respuesta humoral.

II. 1.1. Estructura de las Inmunoglobulinas.

Los anticuerpos son moléculas formadas por dos tipos de cadenas polipeptídicas: dos cadenas pesadas glucosiladas idénticas (PM 50,000-70,000) y dos cadenas ligeras sin glucosilar también idénticas (PM 25,000). Las cadenas pesadas están unidas entre sí a través de enlaces covalentes disulfuro (entre residuos de cisteína) y cada cadena pesada se encuentra asociada a una cadena ligera también a través de un enlace disulfuro (Figura 1). Los dos tipos de cadena están formados por una serie de unidades homologas (de aproximadamente 110 aminoácidos) llamados dominios de inmunoglobulina (Ig). Todos los dominios de inmunoglobulina tienen la misma estructura compacta, globular formada por cadenas de hojas beta-plegadas. Otras proteínas tienen dominios estructuralmente similares por lo que todas estas moléculas forman parte de la super-familia de las inmunoglobulinas. Las diferentes clases de anticuerpo tienen una región extra llamada "región de la bisagra", con una conformación más flexible, susceptible a proteólisis y que al parecer tiene un papel biológico importante, permitiendo un mejor acoplamiento del anticuerpo con el antígeno. Las secuencias aminoterminal de las cadenas ligeras y pesadas varían mucho entre moléculas, se les conoce entonces como regiones variables (V), siendo V_L y V_H las regiones variables de las cadenas ligeras y pesadas, respectivamente. En contraste, las regiones constantes (C) se encuentran hacia el extremo carboxiterminal de la cadena (Fahey, 1966; Franklin, 1964; Cohen, 1967; Abbas, 1994; Ruitt, 1994).

En la asociación entre las cadenas participan tanto enlaces covalentes como interacciones no-covalentes. La estructura básica formada por 2 cadenas pesadas y dos cadenas ligeras se conoce gracias a estudios de proteólisis. La papaina permite obtener tres fragmentos, dos de los cuales siguen reconociendo al antígeno y son llamados Fab (fragment, antigen-binding), y un tercero llamado Fc (fragmento cristalizabile) que es cristalizabile. La digestión con pepsina origina un fragmento bivalente Fab que contiene la región de la bisagra y si los enlaces disulfuro intracadena permanecen intactos, se le llama entonces $F(ab')_2$.

Dentro de la secuencia de aminoácidos de cada región variable, se distinguen tres regiones llamadas hipervariables. Las tres regiones hipervariables de las cadenas ligeras y las tres regiones hipervariables de las cadenas pesadas se yuxtaponen en el espacio tridimensional de tal manera que forman una estructura complementaria a la conformación tridimensional del antígeno. Se crea entonces un sitio de unión al antígeno formado por las regiones hipervariables o CDR's (Complementarity-determining regions) (Figura 2). Las diferencias en la secuencia de aminoácidos que forman los CDR's de cada anticuerpo resultan en la estructura única del sitio de unión al antígeno, que determina la especificidad de los anticuerpos (Pressman, 1968). En general los anticuerpos tienen dos sitios idénticos de unión al antígeno (paratope) pero algunos anticuerpos como la IgA y la IgM poliméricas tienen más de dos.

En el humano y el ratón existen dos tipos de cadenas ligeras, κ y λ . Las inmunoglobulinas se clasifican en cinco clases según sus características fisicoquímicas, propiedades biológicas y estructurales: IgM, IgG, IgD, IgE y IgA (Tabla 1). La clase de inmunoglobulina está determinada por el tipo de cadena pesada y se le conoce como isotipo. La IgA y la IgG en el humano, pueden dividirse en subclases o subtipos, llamados IgA1 y IgA2, y IgG1, IgG2, IgG3 y IgG4, respectivamente. En el ratón encontramos los mismos isotipos de inmunoglobulinas pero la IgG está dividida en las subclases IgG1, IgG2a, IgG2b y IgG3. Entre las cadenas pesadas de las inmunoglobulinas de un mismo isotipo existe una gran similitud en la secuencia de aminoácidos en su región constante (IgG1, IgG2, IgG3, ...) mientras que entre las distintas clases de inmunoglobulina (IgG, IgM, IgE, ...) observamos una gran heterogeneidad, en la misma región (Spiegelberg, 1974).

Otra fuente de heterogeneidad está dada por cambios en la secuencia de aminoácidos (uno o dos aminoácidos) en las cadenas pesadas y ligeras de las Igs provocado por los distintos alelos que codifican para los genes de las inmunoglobulinas. Se habla entonces de alotipos de las Igs, dados por las diferencias genéticas que existen dentro de una misma especie. Estos alotipos proveen marcadores genéticos importantes siendo el grupo Gm de la IgG el más importante en humanos.

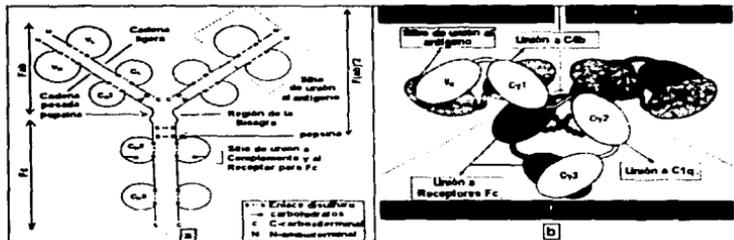


Figura 1. Estructura de una molécula de inmunoglobulina. (a) Diagrama esquemático de la IgG (b) Diagrama basado en un modelo indicando la localización de funciones biológicas (Dr A. Feisntein) y la relación entre los fragmentos Fab y Fc -en gris claro y obscuro, dos cadenas pesadas y en gris moteado, las cadenas ligeras

Por otro lado, existen características que determinan la especificidad de cada anticuerpo y son llamadas características idiotípicas. Estas se encuentran localizadas en la región hipervariable asociadas a las regiones variables de los anticuerpos. Existen sueros anti-idiotípicos que están cobrando importancia debido a teorías que proponen que el sistema inmune pudiera estar regulado por interacciones idioto/anti-idioto. Por otro lado, se está demostrando su utilidad como herramienta bioquímica o terapéutica.

Podemos encontrar dos tipos de inmunoglobulinas, las que son secretadas y se encuentran en suero y secreciones, y las que están asociadas a la membrana de células y tienen función de receptor de células B. Las secuencias de las cadenas pesadas de los dos tipos de Ig's son casi idénticas con una variación en el extremo carboxiterminal de la proteína. Las inmunoglobulinas de membrana están asociadas a la membrana a través del extremo carboxiterminal de la cadena pesada, el cual tiene un mayor número de aminoácidos que la Ig secretada, la mayoría de carácter hidrofóbico que permiten que la Ig de membrana permanezca embebida en la bicapa lipídica.

II. 1.2. Interacción antígeno-anticuerpo.

Para describir la unión anticuerpo-antígeno debemos estudiar sus características estructurales y fisicoquímicas.

Se conoce ahora, a partir de estudios cristalográficos que los anticuerpos reconocen determinantes antígenicos o epitopes del antígeno, complementarios a sus regiones CDR (Padlan, 1994). Un par de regiones variables V_L - V_H con seis "loops" hipervariables (tres de cada cadena ligera y pesada, respectivamente) forman el sitio de unión al antígeno. Esta superficie de unión es altamente variable en secuencia, tamaño y conformación, permitiendo de esta manera una enorme diversidad de combinaciones con diversos antígenos, a través de variaciones en la forma y naturaleza de la superficie de contacto (Figura 2).

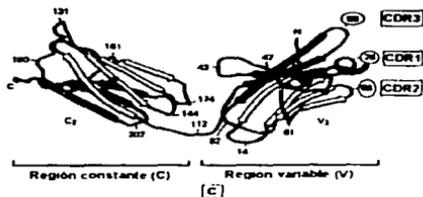


Figura 2. Estructura del sitio de unión a antígeno de la cadena ligera de un anticuerpo. La figura ilustra la estructura globular de cada dominio y la formación del sitio de unión. Las tres regiones hipervariables (CDR's) que sobresalen hacia la derecha, están marcadas con los aminoácidos 26 (CDR1), 68 (CDR2) y 96 (CDR3) (Tomado de Edmunson y col., 1975)

El sitio de combinación tiene un alto número de aminoácidos capaces de formar puentes de hidrógeno (como la tirosina, treonina y serina) que intervienen en la unión al antígeno. Además puede tener aminoácidos con carga neta, que contribuyen a la unión antígeno-anticuerpo a través de enlaces electrostáticos débiles. Se requieren entonces de interacciones no-covalentes puentes de hidrógeno, fuerzas de van der Waals, enlaces hidrofóbicos e interacciones electrostáticas débiles para la unión antígeno-anticuerpo. Además de las interacciones hidrofóbicas, parece ahora tomar importancia un cambio conformacional que se da después de la unión del antígeno al anticuerpo (Colman, 1991, Davies y Chacko, 1993, Wilson y Stanfield, 1993). Las uniones antígeno-anticuerpo son generalmente estables en un rango amplio de pH (4-9) y de concentraciones de sal (NaCl 0.01-0.1 M). Generalmente se requieren condiciones desnaturalizantes para romper esta unión (pH entre 3 y 10, tiocianato 3.5 M, guanidina-hidrociorídrico 6 M y urea 9 M).

Para comprender las propiedades fisicoquímicas de la unión anticuerpo-antígeno debemos de considerar un sistema en el cual el antígeno es monovalente (hapteno simple) y

todos los anticuerpos son específicos para ese antígeno. Imaginemos que las moléculas en solución están chocando constantemente, formándose y disociándose complejos antígeno-anticuerpo, hasta alcanzar un equilibrio dinámico. La afinidad es una medida de la fuerza de unión entre el anticuerpo y el antígeno, y se puede definir a través de la constante del equilibrio de asociación (K_a) de la reacción de asociación que se muestra a continuación:



según la ley de acción de masas

$$K_a = \frac{[\text{AbH}]}{[\text{Ab}][\text{H}]}$$

en donde $[\text{Ab}]$ es la concentración molar de sitios libres de combinación en el anticuerpo y $[\text{H}]$ la concentración molar de antígeno libre. Si la interacción entre este antígeno y el anticuerpo tiene una alta afinidad, el equilibrio se desplaza hacia la derecha y la K_a aumenta. A una concentración de antígeno dada $[\text{H}]_0$ en donde la mitad de los sitios del anticuerpo se encuentran unidos al antígeno, podemos decir lo siguiente:

$$[\text{AbH}] = [\text{Ab}], \text{ entonces } K_a = \frac{1}{[\text{H}]_0}$$

es decir la constante de afinidad K_a es igual al recíproco de la concentración de antígeno libre en el punto en que la mitad de los sitios del anticuerpo están ocupados. De aquí se desprende que a una mayor afinidad, se necesita una menor cantidad de antígeno para saturar la mitad de anticuerpos. La afinidad también puede darse en términos de la constante de disociación K_d en la reacción de disociación siguiente:



K_d es el recíproco de K_a , es decir $1/K_a$, por lo tanto a una mayor afinidad, K_d disminuye. Las unidades para K_d son Moles/L (M), K_a tendría unidades de M^{-1} . Las constantes de disociación varían desde 10^{-5} M hasta 10^{-10} M, los valores mayores a 10^{-5} M probablemente no tengan mucha importancia biológica.

El valor de K_a está relacionado con el cambio en la energía libre (ΔG del sistema) por un lado entre el antígeno y el anticuerpo en estado libre y por el otro, en el complejo según la ecuación:

$$\Delta G = -RT \ln K_a$$

R siendo la constante universal de los gases, T la temperatura absoluta y \ln logaritmo natural.

Existen distintos métodos para determinar la constante de afinidad, como ejemplos se encuentra la diálisis en equilibrio, la inmunoprecipitación, el ELISA y métodos fluorescentes (Friguet y col., 1985)

II. 1.3. Funciones biológicas de los anticuerpos.

Las cadenas ligeras son importantes en la determinación de la especificidad de los anticuerpos de esta manera forman parte de la función biológica de estos, pero son las cadenas pesadas, las responsables de la función efectora de los anticuerpos. Las secuencias compartidas son las responsables de las propiedades fisicoquímicas y antigenicas similares de los anticuerpos del mismo isotipo, por lo tanto diferentes funciones efectoras de los anticuerpos son mediadas por distintos isotipos y subtipos. Las inmunoglobulinas son moléculas bifuncionales, el Fab permitiendo la unión al antígeno y el Fc responsable de las funciones efectoras. Las siguientes funciones efectoras están mediadas por el Fc de las inmunoglobulinas

a) Funciones mediadas a través de la unión de los anticuerpos a sus receptores para Fc.

- Hipersensibilidad inmediata liberación de mediadores de la inflamación por medio de la activación del FcεRI (se discutirá en detalles en otro capítulo)
- Oponización de partículas (células, bacterias, etc) para facilitar su fagocitosis (a través del reconocimiento de anticuerpos IgG por los receptores FcγR's)
- Citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (ADCC) que permite eliminar células recubiertas de anticuerpo IgG que se unen a los receptores FcγR's y permiten la lisis de la célula "blanco".

- Regulación de células B. aumento o inhibición de la activación de células B a través de los FcγR's
- b) Activación del Complemento por la vía clásica, a través de la unión del componente C1q a la porción Fc de complejos de IgM o IgG
- c) Inmunidad neonatal mediada por la IgG por el paso transplacentario de IgG

Tabla 1. Propiedades de las Inmunoglobulinas de ratón (tomado de Goding, 1996).

Propiedades	IgM	IgD	IgG	IgE	IgA
					
Concentración en suero	0.1-1.0 mg/ml	1-10 µg/ml	1-20 mg/ml	0.1-1.0 µg/ml	1-3 mg/ml
Peso Molecular	900,000	180,000	160,000	190,000	170,000-500,000
Cadenas Pesadas	μ	δ	γ	ϵ	α
Cadenas ligeras	κ o λ	κ o λ	κ o λ	κ o λ	κ o λ
Subclases	1	1	4	1	2
Peso Molecular cadena pesada secretada	80,000	65,000	55,000	80,000	70,000
membrana	84,000	70-75,000	65,000	"	"
Estequiometría (Ig secretada)	($\alpha 2 \times 2$) ₂ 5, ($\mu 2 \times 2$) ₂ 6 ($\mu 2 \times 2$) ₂ 5, ($\mu 2 \times 2$) ₂ 6	($\delta 2 \times 2$) ₂ ($\delta 2 \times 2$) ₂	$\gamma 2 \times 2$ $\gamma 2 \times 2$	$\epsilon 2 \times 2$ $\epsilon 2 \times 2$	($\alpha 2 \times 2$) ₂ 1-3 ($\alpha 2 \times 2$) ₂ 1-3
Estequiometría (Ig de membrana)	$\mu 2 \times 2$ $\mu 2 \times 2$	$\delta 2 \times 2$, $\delta 1 \times 1$ $\delta 2 \times 2$, $\delta 1 \times 1$	$\gamma 2 \times 2$ $\gamma 2 \times 2$	"	$\alpha 2 \times 2$ $\alpha 2 \times 2$
Carbohidratos	9-12 % ^a	12-15 % ^a	2-3 % ^a	12 % ^a	7-11 % ^a
Domínios de cadena pesada (#)	5	4	4	5	4
Grupos prostéticos	cadena J	---	---	---	cadena J
Paso a placenta	---	---	* (todas las subclases)	---	---
Citotoxicidad mediada por complemento	+	---	GI débil o --- otras +	---	---
Vida media en suero (días)	1 día	Menor a un día	G1, G2a, G3 4 días y G2b 2 días	menor a un día	1 día
Unión a proteína A	---	---	+	---	---
Unión a proteína G	---	---	+	---	---
E ₂₀ 1% 1cm	1.4	1.4	1.4	1.4	1.4
Propiedades	1er anticuerpo en las respuestas. ABO, factor reumatoide	Mayor clase en superficie de linfocitos, menor clase en suero	mayor clase en suero, mayoría de anticuerpo en las infecciones. Respuesta secundaria	responsable de las reacciones alérgicas, liberación de histamina y serotonina	mayor clase en secreciones (lágrimas, saliva, ...)

II. 1.4. Genética de Inmunoglobulinas.

Los genes que codifican para las cadenas ligeras y pesadas de las inmunoglobulinas están localizados en diferentes cromosomas, tanto en el ratón como en el humano (Figura 3). Se distinguen 3 complejos o agrupaciones de genes (locus) el complejo que codifica para la cadena ligera κ , el de la cadena λ y uno para las cadenas pesadas (Brack, 1978, Roitt, 1994, Abbas, 1994) En este caso nos enfocaremos a los genes de Igs del ratón.

El complejo κ esta formado por un gen para la región constante y varios genes para la región variable. Los genes de la región variable constan de tres partes: en el extremo 5' encontramos un primer exon que codifica para el "péptido líder", le siguen los genes que codifican para el dominio variable de la cadena, y finalmente aparecen los genes de unión o genes "J" que codifican para los últimos aminoácidos de la región variable. Después de cierta distancia aparece el gen que codifican para la región constante (Figura 3)

El complejo λ contiene 4 genes para la región constante y sólo 3 genes para las regiones variables. En este caso los genes J están intercalados entre los distintos genes de las regiones constantes (Figura 3)

El complejo de las cadenas pesadas contiene cientos de genes para las regiones variables, de 4-6 genes J y un gen para las regiones constantes de cada clase de cadena pesada. Todas las clases comparten los genes de las regiones variables. Cada gen para la región constante está dividida en segmentos, cada segmento codificando para un dominio de Ig distinto. Además de los genes J (y sólo presentes en este complejo), se encuentran varios genes de diversidad (D). Están situados entre los genes variables y los genes J de la cadena pesada y codifican para la mayor parte de la tercera región hipervariable de las cadenas pesadas (Figura 3)

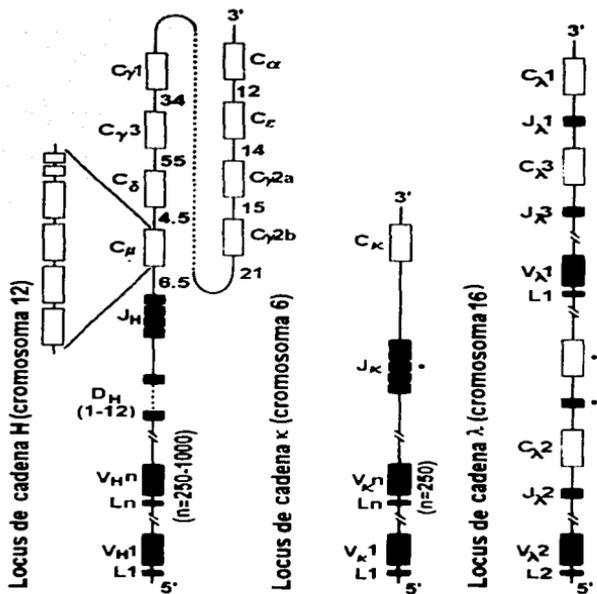


Figura 3. Organización de los genes de inmunoglobulinas de ratón. Los números en *italica* representan la longitud aprox de los segmentos de ADN en kilobases (Kb). Los asteriscos indican pseudogenes no funcionales. Cada gen C_H está representado como un rectángulo compuesto de varios exones, sólo se muestra la estructura de exones para la cadena μ . Los segmentos de genes están indicados de la manera siguiente: *L*, líder (secuencia líder), *V*, variable, *D*, diversidad, *J*, unión, *C*, constante (Tomado de Abbas, 1994)

Mediante mecanismos de recombinación de los genes de inmunoglobulinas, se puede generar la gran diversidad de anticuerpos. El mecanismo es complejo y requiere de varias etapas mencionadas a continuación (Kataoka, 1980, Kim, 1981, Abbas, 1994 y Roitt, 1994)

El rearreglo del ADN en los loci de los genes de Igs se da en un orden preciso. Para cada molécula de inmunoglobulina, el primer rearreglo ocurre en los genes que codifican para la cadena pesada, e involucra la unión de un segmento D con un segmento J con la delección del ADN que se encuentra entre los dos segmentos (el ADN que se encuentra antes y después de los segmentos unidos permanece intacto). El siguiente paso involucra la unión de uno de los genes V al complejo DJ, lo cual da como resultado el gen VDJ (ocurre en células precursoras que serán linfocitos B). En este paso todos los segmentos comprendidos entre D y el gen variable son eliminados irreversiblemente. Un gen de la región constante no es seleccionado sino hasta el procesamiento del transcrito primario del ARNm (mediante "splicing" del intrón entre el complejo VDJ y el gen más cercano de la región constante), obteniéndose finalmente una proteína μ en el citoplasma de la célula, fenotipo del linfocito pre-B. Si el rearreglo de la proteína μ fue productivo, se inhibe el rearreglo del alelo del otro cromosoma (exclusión alélica), además de que se estimula el rearreglo de los genes de las cadenas ligeras.

Este siguiente paso consiste en la unión de un segmento V con un segmento J de uno de los alelos κ , formándose el complejo VJ que se encuentra separado de la región constante por un intrón. Mediante el "splicing" del intrón del transcrito primario, se une el gen constante al complejo VJ, formando el ARNm que dará origen a la cadena κ . Si el rearreglo es productivo la cadena ligera formada se ensambla con la cadena μ en el retículo endoplásmico para formar la molécula de IgM de membrana. La expresión de IgM de membrana es una característica fenotípica del linfocito B inmaduro. De la misma manera, el rearreglo de la cadena ligera κ (casi siempre el primero) inhibe el rearreglo del alelo del otro cromosoma (exclusión alélica) pero además también inhibe el rearreglo del gen λ (exclusión del isotipo de la cadena ligera). La célula tiene entonces cuatro posibilidades de rearreglos productivos de la cadena ligera (dos de cada cadena κ o λ). Como se mencionó

anteriormente, estos rearrreglos involucran mecanismos de eliminación de ADN entre varios segmentos de genes, seguido por una unión de los segmentos de interés; el ADN escindido es eliminado por lo que los complejos VDJC y VJC formados inicialmente permanecen y son los que dan lugar a la molécula de Ig. Esta "recombinación" la llevan a cabo enzimas llamadas recombinasas que después de reconocer secuencias específicas (secuencias de heptámeros y nonámeros) entre los genes V y J (igual para DJ y VDJ), escinden el segmento de ADN que no es el importante y unen los segmentos de genes V y J requeridos.

Para la generación de la diversidad de anticuerpos (la creación del repertorio de anticuerpos) contribuyen distintos mecanismos genéticos

- Múltiples genes germinales la existencia de varios genes V germinales (con secuencias distintas) para las cadenas pesadas y ligeras contribuye a las diferentes especificidades de los anticuerpos. Además los distintos genes J y D que codifican para algunas porciones del sitio de unión a antígeno, también son responsables de generar diversidad.
- Diversidad combinatoria la combinación al azar de diferentes segmentos de genes V, D y J genera diversas especificidades de anticuerpos. Cada clona de células B y su progenie expresa una combinación única de genes V, D y J. La mayor diversidad se encuentra en la unión de las regiones V y C de ambas cadenas ligeras y pesadas que forman la tercera región hipervariable o CDR3 (que es una porción importante para la unión del antígeno en la molécula de Ig). Cada clona de células B produce un sólo sitio activo.
- Diversidad de unión
 - Rearreglo de ADN impreciso (la recombinación entre las secuencias de nucleótidos de los genes V, J y D puede llevarse a cabo en varios nucleótidos en la secuencia germinal, dando lugar a que aún usando la misma combinación de genes se genere un sitio diferente)
 - Diversificación de la región "N" adición de nuevos nucleótidos en la unión de genes VJ o VDJ rearrreglados mediante un proceso al azar que lleva a cabo una transferasa TdT (o Desoxirribonucleotidil terminal transferasa)

- Combinación de diferentes cadenas ligeras y pesadas en distintas células B: dado que la región variable de cada una de las cadenas que participan en el reconocimiento del antígeno, cada combinación de cadena pesada y ligera, genera un sitio de unión diferente
- Mutaciones somáticas en los genes V: estas mutaciones pueden producir cambios en la especificidad del sitio de unión al antígeno

La hipótesis de la selección clonal, propuesta por Burnet en 1957, explica porque el sistema inmune produce respuestas específicas para el antígeno inmunizante, generando la diversidad de los anticuerpos. De los mecanismos genéticos mencionados anteriormente, se desprende que cada individuo contiene múltiples clones de linfocitos, cada clona derivada de un sólo precursor y conteniendo el mismo receptor, distinto para cada clona. Cuando el sistema inmune encuentra por primera vez un antígeno, este es reconocido por una clona pre-existente de linfocitos B inmaduros que expresan IgM e IgD de membrana. La activación de la clona de células B lleva a la producción de anticuerpos y a la generación de células B de memoria. Después de ser estimulada por el antígeno, la célula B pierde la IgD y empieza a secretar IgM. Este polímero pentamérico permite una unión fuerte al antígeno (aún cuando su afinidad sea baja, la avidez de la IgM es alta), además de que activa eficientemente al complemento. Esta respuesta se da a los 2-3 días después del primer contacto con el antígeno y es llamada respuesta primaria (Figura 4). Después de un nuevo contacto con el antígeno y con la participación de citocinas producidas por los linfocitos T, se da la respuesta secundaria. Se lleva a cabo un cambio de isotipo de Ig o "switch", la célula B secreta ahora otra clase de inmunoglobulina (principalmente IgG) con la misma especificidad. La IgG también activa complemento además de que ayuda a la fagocitosis y a la ADCC. El mecanismo para el cambio de isotipo de la cadena pesada está dado por una recombinación del segmento VDJ previamente rearrreglado, con un gen de la región constante (el ADN entre los segmentos es eliminado). Las citocinas producidas por los linfocitos T intervienen en la proliferación de las células B y en la producción de anticuerpo, en este último caso, las distintas citocinas (IL-4, IFN- γ ,...) pueden inducir selectivamente el "switch" a un isotipo particular de Ig.

Durante la respuesta secundaria, los genes de la región V de las cadenas pesadas y ligeras sufren mutaciones somáticas al azar, que son las responsables de la maduración de la afinidad de los anticuerpos. Se van seleccionando las células que sufrieron mutaciones en estos genes, y cuyas Igs de membrana tienen mayor afinidad para unirse al antígeno cuya concentración va disminuyendo en el organismo. Con el tiempo y el constante contacto con el antígeno, los anticuerpos producidos tienen cada vez una mayor afinidad, es decir que interactúan mejor con su antígeno. Esta respuesta es entonces más rápida, más vigorosa y eficiente. Si no existieran más contactos con el antígeno, la respuesta va disminuyendo pero permanecen células B y T de memoria (memoria inmunológica) que sobreviven años y que pueden ser activadas y proliferar al entrar en contacto con el antígeno.

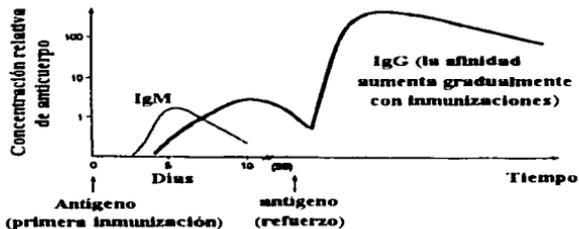


Figura 4. Maduración de la afinidad. Respuesta primaria (IgM) y respuesta secundaria (IgG). La concentración relativa de anticuerpo es la presente en suero (tomado de Goding, 1993)

II. 2. Anticuerpos monoclonales.

II. 2.1. Generalidades.

Un inmunogeno, aun con un grado alto de pureza, tiene varios determinantes antigénicos o epitopes, que durante una respuesta inmune, son reconocidos por una mezcla heterogénea de anticuerpos (respuesta policlonal), cada uno de ellos dirigido en contra de un epitope (ademas, pueden existir varios anticuerpos que interaccionen con un epitope con distintas afinidades) Los anticuerpos monoclonales producidos por células originadas de una clona única de linfocitos B, estaran dirigidos en contra de una sola región del antígeno, no importando la pureza de este último. En el año de 1975, Kohler y Milstein, basados en estudios de tumores de células plasmáticas (mieloma) y fusiones celulares, reportaron la generación de hibridomas productores de anticuerpos monoclonales con la especificidad deseada (Kohler y Milstein, 1975, 1976)

La immortalización de células productoras de anticuerpos específicos para un determinado antígeno es posible mediante la fusión de las células plasmáticas de un ratón inmunizado con ese antígeno con células de mieloma (células transformadas que se pueden cultivar *in vitro*) (Figura 6) La fusión de las membranas celulares, mediante el virus Sendai, polietilenglicol (Pontecorvo, 1976, Galfré y Milstein, 1981) o un pulso eléctrico (Hewish y Werkmeister, 1989) permite obtener células multinucleadas o heterocariotes. Los núcleos de los heterocariotes se fusionan y después de una división, las células genéticamente poco estables pierden cromosomas (Ringertz y Savage, 1976, Abbot y Povey, 1995) Los híbridos se seleccionan mediante crecimiento en medio HAT que contiene aminopterina, un antagonista del ácido fólico que bloquea la síntesis de guanosina (Figura 5) Existe una ruta que permite esta síntesis pero involucra a la enzima HGPRT (hipoxantina guanina fosforibosil transferasa) Las células de bazo que contienen HGPRT, sólo crecen unos días en cultivo y las células del mieloma no contienen HGPRT (fueron seleccionadas con 8-azaguanina) por lo tanto, únicamente las células híbridas resultantes de

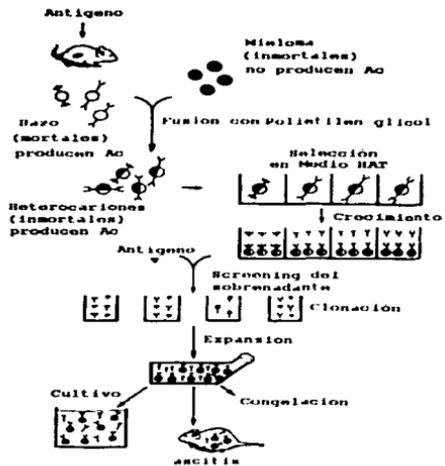


Figura 6. Producción de hibridomas (Tomado de Campbell, A.M., 1991)

II. 2.2. Usos de los anticuerpos monoclonales.

La posibilidad de generar anticuerpos homogéneos en cantidades virtualmente ilimitadas, abrió una gama muy amplia de aplicaciones de los anticuerpos monoclonales, como se discute abajo

Los distintos usos de los anticuerpos monoclonales, podemos dividirlos en aplicaciones terapéuticas y como herramientas en diversas técnicas bioquímicas para la investigación

En un inicio, el uso de los anticuerpos monoclonales estaba restringido al diagnóstico en diferentes laboratorios, como reactivos específicos para la identificación de parásitos, virus, bacterias y otros patógenos tanto en el área clínica como en la investigación. En la investigación inmunológica, una de las aplicaciones más importantes que han tenido, a sido la generación de diferentes anticuerpos monoclonales que reconocen moléculas de membrana de distintas células, los cuales han permitido la identificación y separación de poblaciones celulares para el estudio de sus funciones. Estas moléculas de membrana (moléculas CD o Cluster Differentiation) son numeradas de la misma manera en todo el mundo. Así mismo, en el diagnóstico de investigación, los monoclonales también se usan para identificar otro tipo de proteínas celulares como oncogenes, receptores, factores de crecimiento, mensajeros,

En cuanto al uso en la clínica, además del diagnóstico de enfermedades cabe mencionar la importancia de los anticuerpos monoclonales para el desarrollo de los sistemas estandarizados o kits, cada vez más sensibles para la detección de aditivos en alimentos y bebidas, trazas de drogas y medicamentos, y de material potencialmente explosivo, etc

En el caso del diagnóstico clínico, uno de los usos de los anticuerpos monoclonales es en imagenología para detectar tumores, sitios de inflamación e infecciones. Este

diagnóstico consiste en emplear un anticuerpo marcado radioactivamente, que sea específico para antígenos tumorales, células que intervienen en la respuesta inflamatoria y moléculas que sean características de infecciones. Es importante entonces tomar en cuenta para cada sistema, tanto a la molécula acarreadora (el anticuerpo monoclonal) como al radioisótopo. La inmunoglobulina no debe tener actividad biológica que pueda provocar efectos secundarios, para el radioisótopo se deben considerar vida media corta, emisión reducida, toxicidad mínima y metabolismo conocido. El uso de los anticuerpos monoclonales en inmunoensayos como el ELISA y la inmunoelectroforesis es cada vez mayor y permite una mayor sensibilidad en la medición de proteínas de importancia clínica.

Los anticuerpos monoclonales revolucionaron los inmunoensayos, además de que establecieron nuevos métodos para la investigación. Para entender el uso cada vez mayor de los anticuerpos monoclonales, es necesario mencionar las ventajas y desventajas de estos anticuerpos, para después mencionar algunos ejemplos del uso de ellos como herramienta bioquímica. La obtención de anticuerpos homogéneos específicos para un antígeno impuro, esto en grandes cantidades y fácil de purificar con buenos rendimientos, permitió realizar métodos cada vez más sensibles y con una menor unión inespecífica. Además se obtienen más fácilmente fragmentos $F(ab')$ que reducen la interferencia en el ensayo de otras sustancias que pudieran unirse por el Fc . Los anticuerpos monoclonales no forman buenos complejos de precipitación y en algunos métodos su alta especificidad puede no reconocer pequeñas variaciones que ocurren en epitopes lábiles.

La sensibilidad de los ensayos ha sido considerablemente aumentada gracias al uso de los anticuerpos monoclonales y al acoplamiento de varias moléculas a este anticuerpo. Se utilizan cada vez más distintos compuestos acoplados al anticuerpo como son enzimas (fosfatasa alcalina, peroxidasa de rábano), moléculas fluorescentes (fluoresceína) moléculas luminiscentes (isoluminol, acridinium) y otras sustancias que actúan indirectamente (avidina, estreptavidina, biotina). Las técnicas más utilizadas son las de RIA (Radioinmunoensayo introducido por Yalow y Berson, 1960) e IRMA (ensayo Inmuno radiométrico o técnica de sandwich, introducido por Addison y Hales, 1971) con sus distintas variantes.

Una nueva generación de inmunoensayos y metodologías están surgiendo gracias a los anticuerpos monoclonales, tanto como herramientas para la investigación como para laboratorios clínicos y, en un futuro podemos esperar un mayor uso de anticuerpos monoclonales en áreas de monitoreo ambiental y análisis de alimentos

Sería erróneo pensar que los anticuerpos monoclonales reemplazaran a la serología convencional. El uso de los monoclonales no es recomendado, por ejemplo para la detección de antígenos desnaturalizados o alterados. La fina especificidad, el grado de reactividad, la afinidad y las propiedades físicas de los anticuerpos monoclonales pueden ser seleccionados para las necesidades individuales, de tal forma que, al menos en teoría, es posible obtener un anticuerpo monoclonal idóneo para cada aplicación

Por otro lado, las aplicaciones terapéuticas de los anticuerpos monoclonales son cada vez más prometedoras, aún cuando existen muchos obstáculos por vencer y descubrimientos por realizarse. En teoría, los anticuerpos monoclonales pueden llegar a sitios específicos en el cuerpo humano, de esta manera pueden realizar las funciones que nosotros deseamos en lugares localizados. Es entonces que se deben considerar ciertos criterios en la selección de un anticuerpo monoclonal, dependiendo de la función que este va a cumplir. Un anticuerpo monoclonal que puede no funcionar para tratamiento, puede ser útil en diagnóstico

La utilización de los anticuerpos monoclonales en procedimientos terapéuticos es diverso. Existen diferentes estrategias posibles para aprovechar los anticuerpos monoclonales en tratamientos de enfermedades humanas (Tabla 2). La primera consiste en enfocar una respuesta inmune contra un sitio en especial. En este caso el anticuerpo monoclonal con actividad biológica se une a la célula "blanca" y permite que se fije el complemento, lo cual resulta en la lisis directa (por el complejo de ataque de la membrana) o indirecta (opsonización y lisis por células competentes) y provoca la destrucción de la célula. Los factores importantes que se deben de considerar son la expresión del antígeno (para el que es específico el anticuerpo) su accesibilidad, heterogeneidad, densidad,

estabilidad; características farmacocinéticas del anticuerpo y características del tejido "blanco": vascularidad, volúmen sanguíneo e integridad de los epitelios

Tabla 2. Uso de anticuerpos monoclonales: estrategias terapéuticas en humanos (Tomado de Goding, 1996).

<p>1. Por su actividad inmunológica intrínseca</p> <p>Lisis por complemento Opsonización por complemento Neutralización Aclaramiento ADCC</p> <p> por células NK por neutrófilos por monocitos</p> <p>2. Como vehículo para</p> <p>Radioisótopos Átomos estables Medicamentos Interleucinas, factores de crecimiento Toxinas Péptidos Proteínas y enzimas Moléculas reguladoras Liposomas</p>	<p>3. Por su función reguladora en</p> <p>Hormonas Factores de crecimiento Interleucinas Moléculas reguladoras Idiotipos de superficie (B o T) Receptores</p> <p>4. Como vacuna</p> <p>Antiidiotipo Adjuvante</p> <p>5. Por su intervención farmacológica</p> <p>Alterar la farmacocinética Alterar la biodistribución Cambiar las propiedades de moléculas Depuración de otros anticuerpos</p>
--	--

La segunda estrategia es la de utilizar al anticuerpo como vehículo de moléculas que deben llegar a sitios específicos *in vivo*. Se deben de considerar para cada tratamiento, tanto las propiedades farmacológicas del anticuerpo como las de las moléculas que están siendo transportadas

La tercera estrategia consiste en utilizar anticuerpos monoclonales que reconocen moléculas o receptores que son de importancia crítica en la regulación de funciones celulares. Primero se deben conocer los mecanismos que intervienen en la regulación para después poder modularlos de manera positiva o negativa. La cuarta estrategia habla de las nuevas vacunas, principalmente del uso de los anticuerpos monoclonales antiidiotipo. Estos anticuerpos reconocen el idiotipo de anticuerpos contra cierto antígeno y parecen mimetizar ese antígeno. Se están realizando estudios para intentar inducir una respuesta inmune protectora a través de una inmunización con estos anticuerpos. Se cree también que estos anticuerpos pueden regular la respuesta inmune como lo propuso Jerne en 1974. Finalmente la última estrategia es la de eliminar del organismo (depuración) ciertos compuestos y alterar las propiedades de otras moléculas. Los anticuerpos pueden ser usados para variar la vida media en suero de medicamentos, cambiar la biodisponibilidad, etc.

A continuación se presentan ejemplos de enfermedades en las cuales el tratamiento con anticuerpos monoclonales parece prometedor (Tabla 3). Es necesario investigar los mecanismos e interacciones involucradas en las enfermedades y el agente terapéutico, así como nuevas tecnologías que lleven a la aplicación en un futuro, de los anticuerpos monoclonales como herramienta terapéutica.

Una limitación actual es que el uso de anticuerpos monoclonales murinos puede inducir una respuesta inmune en contra de los anticuerpos. Para eliminar este inconveniente se está tratando de establecer una metodología para producir anticuerpos monoclonales humanos.

Tabla 3. Aplicaciones terapéuticas de los anticuerpos monoclonales en enfermedades humanas (Tomado de Campbell, 1991, Birch y col. 1995)

Enfermedad	Estrategia terapéutica
Cáncer -tumores sólidos (melanoma, carcinoma, neuroblastoma, pulmón, pecho, colon) -hematopoyético (linfoma de células B y T, leucemia aguda linfocítica, mielocítica y de células plasmáticas)	-Respuesta inflamatoria localizada en células tumorales -Interferencia en el crecimiento y la regulación -Inmunidad antitumoral (Ac antiidiotipo) -Regulación negativa de clones malignos -Aumento de la respuesta combinando los Abs con interleucinas -Radioimmunoterapia -Terapia con inmunotoxinas
Transplantes -Medula ósea	-Eliminación de células malignas antes de un trasplante -Terapia con inmunotoxinas -Combinación de quimioterapia e inmunoterapia -Eliminación de células T normales para evitar la enfermedad injerto contra huésped
Infecciones -virales -por microorganismos	-Neutralización de virus y de microorganismos -Opsonización de virus y de microorganismos -Neutralización de las toxinas liberadas por los microorganismos
Intoxicación por Digoxina (en cardiología)	-Neutralización
Supresión Inmunológica -enfermedades autoinmunes (artritis reumatoide, esclerosis múltiple, lupus) -Rechazo de trasplantes	-Destrucción de células autoreactivas -Regulación de la respuesta inmune -Terapia con inmunotoxina
Función plaquetaria (angina, oclusión de arterias coronarias)	-Inhibición de la agregación plaquetaria

III. ANTECEDENTES.

III. 1. Transducción de señales mediada por receptores de membrana.

III. 1.1. Generalidades.

En la membrana celular existe una gran variedad de proteínas especializadas que permiten a la célula interactuar con el medio que la rodea, un grupo de estas proteínas son los denominados receptores, los cuales generalmente poseen tres dominios (uno extracelular, otro transmembranal y un dominio citoplásmico) y son capaces de detectar la presencia ó el cambio de concentración de alguna molécula (su ligando) en el exterior y traducir esta variación en el medio externo en una respuesta dentro de la célula

Uno de los mecanismos mas comunmente encontrados en la regulación positiva/negativa de la función de proteínas es la fosforilación - desfosforilación de algunos aminoácidos específicos dentro de la estructura de las proteínas. Esta es una forma de regulación que no involucra el ajuste de la velocidad con que se sintetizan proteínas o enzimas; además es una forma fácil y rápida de modular la actividad de enzimas en respuesta al cambio de condiciones externas o internas, para satisfacer necesidades metabólicas de la célula y adaptarse al entorno (transducción de señales por adenilato ciclasa, transducción por proteínas G, etc). En la transducción de señales mediada por proteínas de membrana puede presentarse la activación de proteínas cinasas que fosforilan diversos sustratos del citosol o del núcleo, estas cinasas o sus sustratos juegan un papel crítico en la regulación metabólica, en el control del crecimiento y división celular. Es importante aclarar que la fosforilación puede activar o inactivar proteínas. Existen dos clases de cinasas: las cinasas de tirosina y las cinasas de serina - treonina

Actualmente el estudio de los mecanismos por los que la unión de un ligando a su receptor es capaz de provocar una respuesta celular, es un área de investigación en constante avance.

III.1.2. La agregación de receptores como mecanismo inductor de activación.

En algunos sistemas, la unión receptor - ligando, produce un cambio conformacional del receptor, generando una cascada de señales al interior de la célula. En otros casos, la sola unión del receptor a su ligando no es suficiente para inducir la activación sino que es necesaria la agregación de dos o más receptores para inducir la respuesta celular (Metzger 1992, Heldin 1995). Lo anterior ha sido demostrado de dos formas: en primer lugar, la adición de ligando monovalente a las células no genera señal alguna. Por otra parte, al adicionar a las células anticuerpos dirigidos contra el receptor se observa una respuesta semejante a la provocada por el ligando polivalente.

Dentro de los receptores que son activados por entrecruzamiento existen algunos que poseen un dominio citoplásmico con actividad de cinasa tales como el receptor del factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF-R), el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGF-R), el receptor de insulina (IR), etc. Otros receptores cuyo dominio citoplásmico no tiene actividad de cinasa, pero están funcionalmente asociados a una enzima de este tipo, son los receptores para IL-1 a IL-10, GM-CSF, INF- α , β , γ , hormona de crecimiento, prolactina, los receptores multicadena de reconocimiento inmune (MIRs), etc.

III. 1.3. Fosforilación.

En varios casos de receptores con dominios de cinasa o con cinasas asociadas, se ha propuesto que la agregación es seguida por la "autofosforilación" de los receptores. Una

posibilidad es que en el monómero de receptor exista cierta actividad basal, la cual sea suficiente para fosforilar al receptor contiguo por transfosforilación (Heldin 1995) (Figura 7).

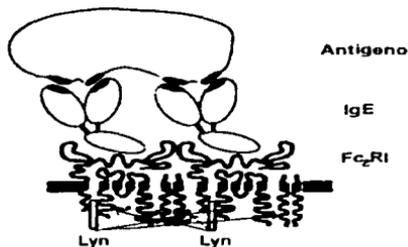


Figura 7. Transfosforilación

La fosforilación inicial ocurre principalmente en residuos de tirosina dentro del sitio regulador de la cinasa (del propio receptor o de la cinasa asociada) con lo que se puede aumentar o disminuir la actividad enzimática, además, fuera de los dominios de cinasa pero en el receptor, se fosforilan otras tirosinas que sirven de anclaje para otras proteínas que participan en la transducción de señales. Para que estas proteínas puedan anclarse a las tirosinas fosforiladas del receptor, deben contar en su estructura con dominios SH2 (Src Homology 2)

III. 1.4. Dominios SH2 y SH3.

Los dominios SH2 y SH3 participan en interacciones proteína-proteína y, aunque distintos estructuralmente, presentan ciertas características comunes: ambos forman estructuras compactas aisladas con sus extremos amino y carboxilo cercanos, de tal forma que quedan expuestos en la superficie de la proteína. Estos dominios no están restringidos a un tipo particular de moléculas, es decir, se localizan en distintas proteínas que participan en diferentes vías bioquímicas, tal es el caso de cinasas de proteínas o de lípidos, en fosfatasa, fosfolipasas, factores de transcripción y proteínas adaptadoras.

Los dominios SH2, constan de aproximadamente 100 aminoácidos y el sitio de unión de estos dominios, reconoce fosfotirosinas (PY), siendo de gran importancia para la unión los tres aminoácidos situados hacia el extremo carboxilo de la PY (PY-X-X-X). Dependiendo de la naturaleza de los aminoácidos que siguen a la PY de las secuencias a las que se unen, estos dominios se han clasificado en dos grupos. Los dominios SH2 pertenecientes al grupo I se unen a secuencias PY-hidrofílico-hidrofílico-hidrofóbico, mientras los del grupo II se unen a secuencias PY-hidrofóbico-X-hidrofóbico. Hay proteínas que pueden contener dos dominios SH2 con especificidades similares o diferentes, adicionalmente, un dominio SH2 puede unirse solamente a ciertas fosfoproteínas, esto dependerá de los aminoácidos cercanos a la PY, lo que da cierta especificidad a la unión (Songyang y col 1993). Esta especificidad determinada por los aminoácidos cercanos a la PY no es absoluta, por lo que podría haber en la célula más de un SH2 con afinidad por un mismo ligando. La unión de un dominio SH2 a una proteína fosforilada en tirosina, también depende de factores como concentración y localización del ligando en cuestión, sin olvidar que algunas proteínas cinasas presentan además otros dominios de unión (Cohen y col 1995).

Los dominios SH2 presentan una mínima afinidad por otros fosfoaminoácidos como fosfoserina (PS) y fosfotreonina (PT). Esto se explica por la estructura del dominio SH2, en la que hay una cavidad en donde se une PY, en esta cavidad existe un residuo de arginina

(R) altamente conservado, cuya carga positiva interactúa con el fosfato (con carga negativa) de PY. Esta arginina resulta inaccesible a PT y PS por ser estos últimos más cortos, además en esa cavidad hay múltiples sitios que forman puentes de hidrógeno con el fosfato y contactos hidrofóbicos con el anillo fenólico de la tirosina (Eick y col. 1993, Cohen y col. 1995) (Figura 8)

Los dominios SH3 han sido menos estudiados, sin embargo parecen ser también importantes en la transducción de señales. Estos dominios se unen a secuencias ricas en prolina (P) de aproximadamente 10 aminoácidos, muchas de las cinasas asociadas con receptores contienen dominios SH2 y SH3, en tanto que el SH2 permite la asociación al receptor y la modulación de la propia actividad enzimática, el SH3 promueve la asociación con el sustrato y estabiliza su unión. Como ambos dominios son mediadores de interacciones proteína-proteína, si una cinasa los posee, es capaz de formar complejos proteicos más estables (Cohen y col. 1995)

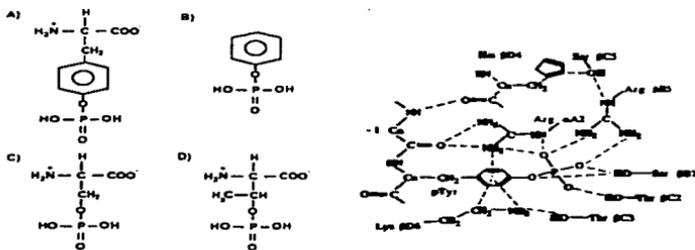


Figura 8. Izq. A) Fosfotirosina, B) Fenilfosfato, C) Fosfoserina y D) Fosfotreonina.
Der. Sitio de unión de la fosfotirosina al dominio SH2

III. 1.5. Receptores Multicadena de Reconocimiento Inmune (MIRRs)

Un grupo de receptores que participan en la activación de células del sistema inmune inducida por antígeno, son los receptores multicadena de reconocimiento inmune (MIRRs, Multichain Immune Recognition Receptors) Este grupo incluye TCR, BCR, FcR's, etc. Los MIRRs comparten una serie de características funcionales y estructurales. Funcionalmente, todos estos receptores intervienen en procesos de activación celular mediados por antígeno y se requiere la agregación de estos receptores para que proceda la activación, también se ha visto que los procesos bioquímicos intracelulares más tempranos en la cascada de señales inducida por la agregación, son semejantes. Hay hidrólisis de fosfolípidos de inositol que generan diacilglicerol (DAG) e inositol 1,4,5-trifosfato (IP₃), siendo este último el responsable de la liberación de Ca⁺⁺ del lumen del retículo endoplásmico hacia el citoplasma, además de la liberación de Ca⁺⁺ intracelular hay entrada de Ca⁺⁺ extracelular contribuyendo al aumento de la concentración citoplásmica. Por otra parte, también se ha observado la fosforilación de proteínas y activación de cinasas.

Estructuralmente los MIRRs, como lo indica su nombre, son receptores compuestos por varias cadenas polipeptídicas asociadas y el dominio extracelular de algunas de estas cadenas pertenece a la familia de las inmunoglobulinas. Adicionalmente, la presencia de un motivo estructural común en el dominio citoplásmico de algunas cadenas es una característica estructural y funcional muy importante. Este motivo fue descrito por Reth (Reth 1989) y la secuencia consenso que lo define es D/E-X₂-Y-X₂-L/I-X₇-Y-X₂-L/I, actualmente este motivo es conocido como ITAM (Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motif) (Figura 9).

Numerosos estudios han demostrado que para la transducción de señales mediada por MIRRs resulta esencial la fosforilación en tirosinas de los ITAMs (revisado por Ortega 1995). Los resultados de estos estudios pueden resumirse de la siguiente forma:

- a) La delección de los ITAMs anula la activación mediada por receptores.
- b) Mutaciones en las tirosinas de los ITAMs anulan la activación
- c) Receptores quiméricos con diferentes dominios extracelulares pero iguales en su parte citoplásmica (ITAM intacto) provocan una estimulación igual a la de un receptor intacto
- d) Al tratar células con inhibidores de cinasas, no se fosforilan los ITAMs y no hay activación

Se piensa que la agregación de receptores induce la fosforilación de residuos de tirosina de los ITAMs, y que estas fosfotirosinas funcionan como punto de anclaje para cinasas de tirosinas con dominios SH2, que al unirse a los ITAMs fosforilados incrementan su actividad catalítica

En este grupo localizamos a los receptores de células T (TCR), de células B (BCR) que reconocen directamente al antígeno y a los receptores de membrana para inmunoglobulinas (Fc γ RI, Fc γ RII, Fc γ RIII y Fc ϵ RI) que reconocen a la porción Fc de las inmunoglobulinas (Ig's) y así también reconocen de manera indirecta al antígeno reconocido por la Ig específica

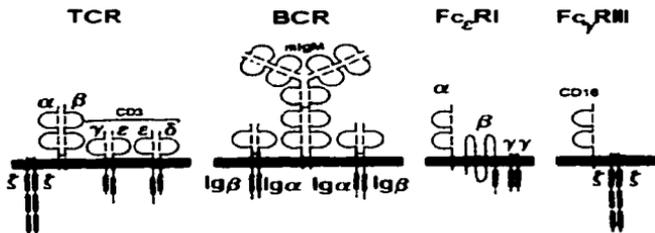


Figura 9. Receptores Multcadena de Reconocimiento Inmune.

Los rectángulos negros verticales representan a los ITAMs

Los receptores Fc γ R son una familia heterogénea de moléculas que reconocen la porción Fc de las distintas IgG y participan en una amplia gama de funciones efectoras tales como: fagocitosis, secreción de citocinas y mediadores inflamatorios, activación de respuesta oxidativa, citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos(ADCC), etc (revisado por Ravetch y Kinet 1991) Estos receptores tienen dominios extracelulares de unión al ligando muy similares, pero difieren en sus dominios transmembranal y citoplásmico En base a distintos criterios se clasifican en tres grupos Fc γ RI, Fc γ RII y Fc γ RIII, dentro de cada grupo existen a su vez varias isoformas (Tabla 4)

El Fc γ RI (CD64) es el único capaz de unir IgG monomérica por lo que se le considera de alta afinidad por su ligando Se han identificado tres genes distintos que codifican para este receptor en humanos, sin embargo, la isoforma que se expresa en células hematopoyéticas es solo la Fc γ RIa Este receptor es una glucoproteína (seis sitios de glicosilación en humanos) con dominio extracelular en el que se localizan tres dominios de inmunoglobulina y tiene un peso molecular aparente de 72kDa en humano y 67kDa en ratón Se encuentra asociado a un dímero de cadenas γ y las cuales contienen un dominio ITAM que, como se mencionó anteriormente, es importante para la transducción de señales

El Fc γ RII (CD32) tiene baja afinidad por el ligando, tiene dos dominios de inmunoglobulina en su parte extracelular Puede poseer dos o tres sitios de glucosilación, y presenta un peso molecular aparente de 40kDa A diferencia de los otros Fc γ R, no se ha visto que este tipo de receptor se asocie a otras subunidades Existen tres genes que codifican para este receptor denominados Fc γ RIIA, Fc γ RIIB y Fc γ RIIC que dan lugar a seis transcritos a1, a2, b1, b2, b3 y c La isoforma a2 probablemente es soluble ya que no posee dominio transmembranal, en cambio la isoforma a1 presenta un motivo ITAM (con 15 aminoácidos de separación entre las tirosinas en lugar de 10) Las isoformas b1 y b2 presentan un motivo que inhibe la señalización por BCR denominado ITIM

(Immunoreceptor Tyrosine-based Inhibition Motif) con la secuencia T/S-X₂-Y-X₂-L (Figura 11).

El FcγRIII (CD16) existe en dos isoformas provenientes de genes distintos, una de las isoformas denominada FcγRIIIA es una glucoproteína que en su porción extracelular presenta dos dominios para inmunoglobulinas, y se expresa en la membrana en asociación con dímeros de cadenas γ o ζ, tanto las cadenas γ como las ζ contienen motivos ITAM. La otra isoforma, FcγRIIIB, no posee dominio transmembranal y está unido a la membrana por un enlace glicosil-fosfatidil-inositol (GPI) (revisado por Santana y col 1996).

El receptor de alta afinidad para IgE (FcεRI) es un complejo tetramérico compuesto por una cadena α, otra β y un homodímero de cadenas γ (Paolini y col 1994). La cadena α es una glucoproteína que en su porción extracelular posee dos dominios de inmunoglobulina, siendo el segundo el sitio de unión para la IgE. El peso molecular aparente es de entre 45-65 kDa. La cadena β atraviesa cuatro veces la membrana, sus extremos C-terminal y N-terminal están en el citoplasma, el peso aparente de esta cadena es de 32 kDa y contiene un ITAM en la parte citoplásmica. Las cadenas γ son muy homólogas a las cadenas ζ, su peso aparente es de 7-9 kDa y contienen un motivo ITAM.

Tabla 4. Características de Receptores para IgG de humanos. (Adaptada de Hulett y Hogarth 1994)

Características	hFcγRIIA	hFcγRIIB	hFcγRIC	hFcγRIIA	hFcγRIIB	hFcγRIIC	hFcγRIIIA	hFcγRIIIB
Isoformas	hFcγRIa	hFcγRIb1, hFcγRIb2	hFcγRIc	hFcγRIIIa, hFcγRIIIa 2	hFcγRIIb1, b2, b3	hFcγRIIc	hFcγRIIIa	hFcγRIIIB
Alelos	---	---	---	LR, HR	---	---	---	NA1/NA2
Localización en los cromosomas	1q21.1	1q21.1	1q21.1	1q23-24	1q23-24	1q23-24	1q23-24	1q23-24
Domínios de Ig's	1	2	2	2	2	2	2	2
Receptor	TM	TM, S	S	TM, S	TM	TM	TM	anclado a GPI
Sub-unidades asociadas	cadena y del FcγRI	?, ---	---	?	?	?	cadena y del FcγRI	---
							cadena ζ del TCR	
PM (kDa) aparente backbone	72 40	ND 22	ND 24	40 31	40 29, 27	40 31	50-80 33	50-80 29
Afinidad por IgG ^a	10^5 - 10^7 M ⁻¹	ND, < 10^7 M ⁻¹	ND	< 10^7 M ⁻¹	< 10^7 M ⁻¹	ND	2×10^7 M ⁻¹	< 10^7 M ⁻¹
Especificidad por hIgG	3>1>4>>2	ND	ND	LR 1>1 = 2>>>4 HR 3>1>>2>4	3>1.4.2 ^b	ND	ND	1 = 3>>>2 = 4
Distribución celular	monocitos macrófagos neutrófilos ^c eosinófilos ^d	ND	ND	monocitos macrófagos neutrófilos plaquetas celulas de Langerhans	monocitos (Ib1, Ib2) macrófagos celulas B (Ib1, Ib2)	monocitos macrófagos neutrófilos celulas B	macrófagos celulas NK, celulas T $\gamma\delta$, subpoblacion de monocitos	neutrófilos eosinófilos ^d
Regulación de la expresión	IFN- γ \uparrow , IL-10 \uparrow , G-CSF \uparrow , IL-4 \downarrow	ND	ND	IL-4 \downarrow	ND	ND	TGF- β \downarrow , IL-4 \downarrow	TNF- α \downarrow , IFN- γ , GM-CSF, G-CSF \uparrow

Nota: TM, transmembranal. S, soluble, ND, no determinado

^a IgG monomérica

^b expresión inducible con IFN- γ

^c expresión regulada positivamente con IL-10 o IFN- γ , regulada negativamente con IL-4. Expresión también regulada positivamente en neutrófilos con G-CSF.

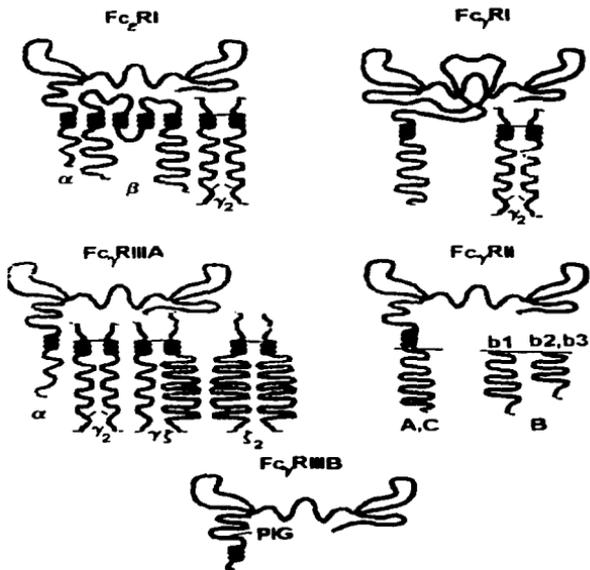


Figura 10. Representación esquemática de los FcR's.

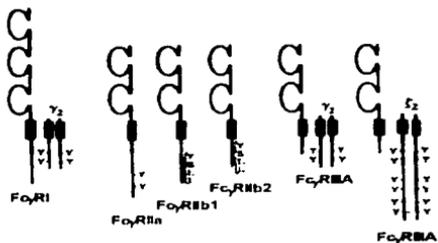


Figura 11. Representación esquemática de los Fc γ R's y sus cadenas asociadas. Los motivos ITAM que contienen los residuos de tirosina (Y) están señalados. El motivo YSLL corresponde al ITIM

El receptor de antígenos de células T (TCR) está conformado por las cadenas de unión a ligando $\alpha\beta$ o $\gamma\delta$, el complejo CD3 (formado por cadenas γ, δ, ϵ) y un dímero de cadenas ζ - ζ o ζ - η . Las cadenas $\alpha\beta$ o $\gamma\delta$ son responsables de reconocer al péptido antigénico expuesto por una célula presentadora a través de moléculas codificadas en el complejo principal de histocompatibilidad (MHC), mientras que el CD3 y las cadenas ζ y η son responsables de la transducción de señales. Las cadenas $\alpha\beta$, γ, δ, ϵ forman parte de la familia de las inmunoglobulinas por sus dominios en la porción extracelular. Por otra parte las cadenas $\gamma, \delta, \epsilon, \zeta$ y η tienen dominios ITAM (Romeo y col. 1992, Irving y col. 1991).

El receptor de antígenos de células B (BCR) consiste de una inmunoglobulina de membrana asociada a un heterodímero de cadenas $I\alpha$ e $I\beta$, las cuales tienen en su porción

citoplasmática motivos ITAM. Las cadenas Igr α e Igb β son producto de genes diferentes (Campbell y col. 1991).

III. 1.6. Cinasas asociadas a los MIRR.

Se han encontrado dos tipos de cinasas asociadas a estos receptores luego de la activación; el primer grupo son las cinasas de la familia Src (Fyn, Lyn, Lck, Blk y Yes) y las de la familia Syk-Zap70. Diferentes cinasas de las familias antes mencionadas se asocian a los receptores; esto depende de cual MIRR se trate y del tipo celular. Sin embargo, en ciertos casos se ha visto que una cinasa de la misma familia puede suplir en funciones a la otra. Un ejemplo, si el receptor Fc ϵ RI al que se asocia Lyn se transfecta a células T que expresan Lck pero no Lyn, se observa a Lck asociada al receptor (Adamczewski y col. 1995, Paolini y col. 1995), además si Lyn no es funcional puede ser sustituida por otra cinasa de la misma familia.

Las cinasas de la familia Src presentan sitios de miristilación en su extremo N-terminal que permiten el anclaje de la cinasa a la membrana, también poseen un dominio SH2 y uno SH3. El dominio catalítico se encuentra en el extremo C-terminal y su actividad es regulada por el estado de fosforilación de una tirosina en el sitio activo de la enzima (Flaswinkel y col. 1995). Algunos estudios han sugerido que las cinasas están asociadas al receptor aún en el estado no activado. No es claro como sucede ya que se pensaba que solo podían asociarse al receptor por sus dominios SH2, aunque se ha sugerido que la unión se puede dar por una región en el extremo N-terminal de la cinasa (Pleiman y col. 1993). Por otro lado, se propone que la fosforilación de una cadena del receptor por su cinasa asociada es estéricamente imposible (Ortega 1995) y que el papel de la agregación es permitir que las cinasas asociadas al receptor puedan fosforilar los ITAMs del receptor contiguo (fosforilación cruzada). La fosforilación de los ITAMs permite que otras cinasas se unan al receptor ya fosforilado. Estas segundas cinasas son las de la familia Syk-Zap70 que contienen dos dominios SH2 en su extremo N-terminal seguidos del dominio catalítico, que

no es regulado por el estado de fosforilación de una tirosina en el extremo C-terminal. Estas cinasas no poseen sitios de miristilación ni dominios SH3 (Flaswinkel y col 1995)

III.1.7. Un modelo del papel de la fosforilación en tirosina en la transducción de señales por el Fc γ RI.

La transducción de señales mediada por los diferentes MIRR'S esta siendo estudiada intensamente por varios grupos de investigación. Estos estudios han revelado que los mecanismos de activación son semejantes. El interés del laboratorio donde realizamos este trabajo se centra en los receptores para Fc de las inmunoglobulinas. Dentro de este grupo de receptores se ha visto, hasta el momento, que los primeros eventos desencadenados por la agregación de Fc γ R y Fc ϵ R son semejantes pero adelante en la cascada intervienen diferentes protagonistas por lo que la respuesta final varía. El Fc ϵ RI es el receptor más estudiado así que lo usaremos como ejemplo de modelo de transducción de señales mediadas por FcRs.

Se piensa que al ocurrir la agregación de receptores, la cinasa Lyn previamente asociada es capaz de fosforilar a los ITAMs, a las cadenas β y de otro receptor (Yamashita y col 1994 . Jouvin y col 1994) con lo que ahora Lyn puede unirse por medio de su dominio SH2. Syk es capaz de unirse a la cadena γ fosforilada, esta unión trae consigo un aumento de su actividad catalítica. Al activarse, Syk puede fosforilar una serie de sustratos (Figura 12) como PLC γ (Scharenberg y Kinet 1995), Vav (intercambiador de GTP/GDP), MAPK (mitogen activated protein kinase), PKC (proteína cinasa C), etc. Esto trae como consecuencia un incremento en la hidrólisis de fosfolípidos de inositol, el incremento en la concentración intracelular de calcio, inducción de genes y respuestas como la liberación de mediadores de la inflamación (preformados y síntesis de novo) y producción de citocinas (Figura 13)

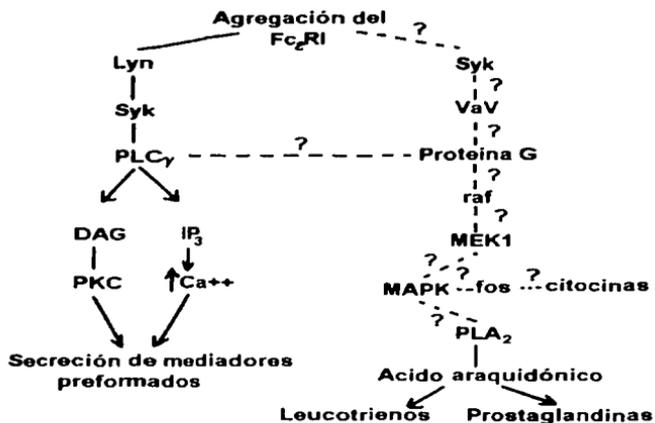


Figura 13. Esquema mostrando los posibles eventos bioquímicos que se han propuesto luego de la activación de la cinasa Syk. Los eventos no comprobados están representados por una línea punteada

IV. JUSTIFICACIÓN.

El interés del grupo de investigación del Dr.E. Ortega se centra en la transducción de señales mediada por los FcγR en células hematopoyéticas. Existen varios tipos e isoformas de los receptores para IgG, estos son moléculas que presentan gran homología en sus regiones extracelulares, sin embargo las regiones intracelulares presentan diferencias notables entre si y pueden o no tener cadenas asociadas

Puesto que los ligandos que reconocen estos receptores son los mismos, y las vías de transducción son similares, se piensa que la existencia de tantas variedades de este receptor confiere a la célula la capacidad de responder adecuadamente bajo diferentes circunstancias

En primer lugar, aunque al agregarse los FcγRI, FcγRIIa y FcγRIIIa presentan fosforilación en tirosina de los ITAMs y activación de cinasas de tirosina, los complejos proteicos ensamblados a consecuencia de la agregación pueden ser distintos, esto depende de la estructura y el contexto en el que se encuentre el ITAM, así como la especificidad (no absoluta) de la interacción de los dominios SH2 de diversas proteínas con los ITAMs fosforilados

En segundo término, las células hematopoyéticas pueden expresar uno o más tipos de estos receptores, por lo que al inducirse la agregación por el ligando pueden formarse agregados heterogéneos

Los anticuerpos monoclonales anti-fosfotirosina son una herramienta fundamental para el estudio de la composición de los complejos de activación ensamblados luego de la agregación de los diferentes FcγR

Existen en el mercado anticuerpos anti-fosfotirosina Sin embargo, seria muy conveniente contar con anticuerpos monoclonales anti-PY propios, ya que requerimos del anticuerpo con distintos marcajes o acoplados a enzimas Dado el elevado costo de los anticuerpos comerciales, junto con las altas cantidades que requerimos, hacen poco conveniente el depender del anticuerpo comercial. Ademas del aspecto económico, el tiempo que demoran surtiendo el pedido puede ser de meses, y no siempre se obtienen los anticuerpos en condiciones optimas. Dado la ubicuidad de procesos de fosforilacion de proteínas en diversas rutas bioquimicas, es posible suponer que un anticuerpo específico para PY podría redundar en beneficios para otros grupos de investigación del país.

V. OBJETIVOS.

V. 1. Objetivo General.

Producir anticuerpos monoclonales murinos de la clase IgG específicos para fosfotirosina

V. 2. Objetivos Particulares.

- Revisión bibliográfica del tema (FcγR's y transducción de señales intracelulares mediadas por estos)
- Obtención de anticuerpos monoclonales murinos anti-fosfotirosina Preparación del inmunógeno, inmunización de ratones, ensayos de ELISA para detectar los anticuerpos anti-fosfotirosina, fusiones celulares, obtención de hibridomas
- Producción de anticuerpos monoclonales anti-fosfotirosina Producción *in vitro* e *in vivo*
- Purificación de los anticuerpos monoclonales anti-fosfotirosina
- Caracterización Ensayos de ELISA y Western-Blots

VI. MATERIALES Y METODOS.

VI.1. Material biológico.

Se utilizaron ratones hembras de 8 a 10 semanas de edad, de la cepa Balb/c obtenidos del Bioterio del Instituto de Investigaciones Biomédicas. Los animales se mantuvieron en el bioterio en condiciones controladas de temperatura, ciclos luz/obscuridad, y alimentación.

Las células de mieloma murino Sp2/O, fueron obtenidas del ATCC y se mantuvieron en medio D-MEM complementado, a 37 °C y en atmósfera húmeda con 5% CO₂.

Las células THP-1, línea celular de monocitos humanos obtenida de ATCC, fueron mantenidas en medio D-MEM complementado, a 37 °C y en atmósfera húmeda con 5% CO₂.

VI. 2. Reactivos y Preparación de Soluciones.

Se presentan en el Apéndice

VI. 3. Metodología.

VI. 3.1. Producción de anticuerpos monoclonales anti-fosfotirosina.

VI. 3.1.1. Preparación del inmunógeno PY-Ala-Gly-KLH.

El antígeno (fosfotirosina) en este caso es un hapteno por lo que fue necesario acoplarlo a una proteína acarreadora para volverlo inmunogénico. Se utilizó una hemocianina (KLH) como proteína acarreadora por su alto peso molecular (4.5×10^5 -

1. Disolver 160 mg de fosfotirosina (0.64 mmol) en 3 mL de agua desionizada añadiendo pequeños volúmenes de NaOH 2N. Tener cuidado de no añadir más NaOH de la necesaria.
 2. Agregar 47 mg de glicina (0.65 mmol) y 56 mg de alanina (0.64 mmol), disolver agitando y ajustar el pH a 5.7.
 3. Añadir agua desionizada hasta un volumen final de 4 mL.
 4. Agregar 10 mg de KLH (disuelto en glicerol al 50 %) y agitar vigorosamente a temperatura ambiente.
 5. Añadir 472 mg de EDAC (2.56 nmol) en alícuotas de 80 mg durante 1 hora, manteniendo el pH en 6 con HCl 1 M.
 6. Agitar durante una hora, manteniendo el pH en 6.
 7. Dejar agitando toda la noche.
 8. Dializar 48 h a 4°C en 1L de PBS 1X con varios cambios. Si durante la diálisis, algo del conjugado se precipita, se debe colectar el precipitado y almacenar a -20°C.
- Nota: no usar reactivos o amortiguadores que contengan grupos nucleofílicos como ésteres de metilglucina o cationes de amonio porque reaccionan con el agente acoplante.

VI. 3.1.2. Selección del donador de linfocitos.

Se pueden usar como especies para obtener linfocitos, al ratón o a la rata. Ya que los mielomas que tenemos son murinos, utilizamos al ratón. Los mielomas murinos más comunes son de la cepa Balb/c, por lo que se prefiere usar esta cepa como donadora. Los híbridos serán crecidos entonces en ratones Balb/c.

VI. 3.1.3. Inmunización.

Los ratones se inmunizaron de acuerdo al siguiente esquema:

1. Mezclar el antígeno PY-A-G-KLH (conc. 1.2 mg/mL) con Adyuvante Completo de Freund hasta obtener una emulsión (10 µg de antígeno / 100 µL de emulsión).
2. Inocular a los ratones por vía subcutánea (100 µL / ratón).

3. Dos semanas después, preparar la emulsión del paso #1 pero ahora con Adyuvante Incompleto de Freund, e inocular a los ratones por la misma vía
- 4 Repetir la inmunización (paso #3) tres veces más Realizar un ensayo de ELISA anti-PY para detectar la presencia de anticuerpos en el suero de los ratones Si ya existen títulos altos, se procede al paso #5, en caso contrario repetir el paso #4 hasta obtener anticuerpos
- 5 Los animales se mantienen sin inocular un mínimo de 4 semanas
- 6 Utilizar el ratón para la fusión (sección VI 3 1 5)

VI. 3.1.4. Selección de la línea celular del mieloma.

Las líneas celulares de mieloma que hay en el laboratorio son P3-NS1-Ag-4-1 (NS-1) y Sp2/0-Ag-14 . Las dos líneas son resistentes a 8-azaguanina (20 µg/mL) y sensibles al medio con HAT Las células NS-1 han sido muy populares pero actualmente no son tan usadas ya que producen una cadena ligera inactiva Las Sp2/0 no producen cadenas de inmunoglobulinas y mostraron un buen crecimiento, por lo que fueron usadas para la fusión Las células Sp2/0 fueron amablemente donadas por el laboratorio del Dr. Librado Ortiz-Ortiz, Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM

VI. 3.1.5. Fusión celular.

La fusión fue inducida mediante el PEG, que permite obtener una frecuencia alta de fusión y una gran reproducibilidad, además de que es fácil de manipular, no es caro y se puede obtener comercialmente (Pontecorvo. G., 1976) El protocolo de fusión que utilizamos es esencialmente el propuesto por Galfré y col. (1977 y 1981) con algunos cambios

A) Tres o cuatro días antes de la fusión, reinmunizar al ratón hiperinmune dos días consecutivos por vía intraperitoneal con 10 µg de antígeno (KLH -A-G-PY) en 100 µL de PBS 1x.

B) El día de la fusión:

- 1 Colocar los medios HAT y MF en baño de agua a 37°C.
- 2 Introducir los instrumentos quirúrgicos en etanol al 70%.
- 3 Preparar 3 mL de PEG al 41.6% (p/v) en MF, este fue esterilizado por filtración con membrana de 0.22 μ y se mantuvo a 37°C.
- 4 Colectar las células de mieloma en fase logarítmica de crecimiento; lavarlas una vez, por centrifugación, con MF 5' a 1000 rpm / 37°C.
- 5 Agregar 15 mL de MF a 37°C a una caja Petri microbiológica estéril.
- 6 Lavar nuevamente las células de mieloma y ajustar la concentración a 2×10^7 células/mL en MF.
- 7 Sacrificar al ratón y sumergirlo en etanol al 70%.
- 8 Hacer un corte en el costado izquierdo del ratón y retirar la piel.
- 9 Bañar al ratón con etanol al 70% y llevarlo a la campana de flujo laminar.
- 10 Esterilizar los instrumentos quirúrgicos a la flama del mechero (PRECAUCION) y enfriarlos en el medio contenido en la caja Petri.
- 11 Hacer un corte pequeño en el costado izquierdo del animal para exponer la cavidad peritoneal. Extraer el bazo y colocarlo en la caja Petri (con MF).
- 12 Sacar al ratón de la campana lo antes posible.
- 13 Esterilizar dos pinzas al mechero, enfriarlas en el medio de la caja Petri y disgregar el bazo.
- 14 Transferir la suspensión de células a una caja pretratada para cultivo de tejidos (100x20 mm). Incubar de 20-30' a 37°C / 5% CO₂, para permitir la adherencia de los macrófagos al plástico.
- 15 Colocar las células de bazo que no se adhirieron a la caja Petri en un tubo cónico estéril de 15 mL y dejarlas reposar 5' en hielo.
- 16 Contar las células de bazo.
- 17 Juntar las células de bazo y mieloma en un tubo cónico estéril de 50 mL en una proporción de 10:1 (evitamos tomar los grumos luego de los 5' en hielo).
- 18 Centrifugar 5' a 1000 rpm.
- 19 Decantar TODO el sobrenadante y descompactar el botón celular muy suavemente.

20. Agregar 2 mL de PEG al 41.6% (p/v) muy lentamente a lo largo de 2', agitando con suavidad periódicamente (adicionarlo gota a gota resbalado por la pared del tubo)
21. Ya adicionado el PEG, resuspender suavemente por pipeteo durante 1', dejar reposar 1' y adicionar 5 mL de MF a lo largo de 5'
22. Adicionar 10 mL de MF a lo largo de 5' y luego 15 mL de MF en las mismas condiciones (agitando suavemente)
23. Centrifugar 5' a 1000 rpm, eliminar el sobrenadante y resuspender muy suavemente en 40 mL de medio HAT (a 37°C)
24. Tomar una gota de esta suspensión de células y ponerla en un porta objetos, agregar una gota de azul tripan, mezclar y observar al microscopio el porcentaje de células viables
25. Distribuir la suspensión de células del paso 23 en 4 placas para cultivo de 96 pozos e incubar en atmósfera húmeda con 5% de CO₂ a 37°C

VI. 3.1.6. Procedimiento Post-Fusión.

1. Tres a cuatro días después de la fusión, retirar la tercera parte del volumen de cada pozo y reponerlo con medio HAT, calentado a 37°C
2. Seis a ocho días después, retirar la mitad del medio y reemplazarlo con medio HAT
3. Revisar al microscopio periódicamente. Diez a catorce días después de la fusión pudimos apreciar clonas a simple vista y el medio tomó un tono amarillo, en este momento colectamos el medio para detectar anticuerpos con la especificidad deseada (ELISA)
4. Dividir en más pozos las clonas cuyos sobrenadantes resultaron positivos y luego expandir las células de esos pozos a superficies de cultivo más grandes determinando periódicamente la producción del anticuerpo de interés
5. Congelar en nitrógeno líquido, las células de pozos cuyos sobrenadantes resultaron positivos tan pronto como es posible
6. Probar la especificidad y el isotipo del anticuerpo presente en los sobrenadantes y clonar a partir de los pozos que contienen los anticuerpos con las características deseadas (específicos para PY y de clase IgG)
7. Progresivamente cambiar el medio HAT por HT y éste último por medio de cultivo

D-MEM complementado con SFB al 10 %.

VI. 3.1.7. Selección de clonas productoras de anticuerpos anti-fosfotirosina.

VI. 3.1.7.1. Pruebas para detectar anticuerpos anti-fosfotirosina.

Para este fin, utilizamos la técnica de ELISA (Enzyme linked immunosorbent assay) que fue estandarizada previamente en el laboratorio. Este método tiene como ventajas que es fácil de realizar, se obtienen resultados cuantitativos mediante un lector de ELISA y los reactivos no son caros. Es el método ideal para ensayos en los cuales el antígeno es puro, como en este caso.

El principio es que los anticuerpos presentes se unen al antígeno que se encuentra en el soporte, se lava el material que no se unió y se revela mediante un anticuerpo anti-inmunoglobulina de ratón (IgG) conjugado a una enzima (fosfatasa alcalina en este caso) que actúa sobre un sustrato produciendo un compuesto colorido (Snyder y col., 1972). El protocolo que empleamos fue el siguiente:

1. A una placa para ELISA agregar 50 μ L / pozo de una solución 2 μ g / mL de antígeno PY-Ala-Gly-BSA en amortiguador de carbonatos 50 mM (pH 9). A otros pozos agregar sólo BSA al 3 % y seguir con el protocolo.
2. Incubar dos horas a temperatura ambiente.
3. Lavar dos veces con TBS 1X.
4. Agregar 150 μ L de la solución de bloqueo (TBS 1X con BSA 3%) e incubar a 4°C toda la noche.
5. Lavar 2 veces con TBS 1X-Tween 0.1 %.
6. Agregar 50 μ L de la muestra /pozo e incubar una hora a temperatura ambiente (por duplicado). Las muestras pueden ser sobrenadante de hibridomas, diluciones de suero y ascitis, así como los controles positivos y negativos. Los controles usados fueron: a) control positivo: PY20 (anticuerpo monoclonal murino específico para PY, obtenido comercialmente), b) control negativo: medio de cultivo, anticuerpo goat anti-mouse, TBS.

7. Lavar dos veces con TBS y dos con TBS-Tween 0.1 %
8. Agregar el anticuerpo especifico para la cadena gamma o Goat α -mouse gamma chain (segundo anticuerpo), acoplado a fosfatasa alcalina diluido 1:1000 en TBS-BSA 3 % ; 50 μ L / pozo e incubamos 90' a 37°C
9. Lavar tres veces con TBS-Tween 0.1 %
10. Disolver el sustrato (p-nitrofenilfosfato) en amortiguador FA (1 mg/mL) y agregar 50 μ L de sustrato/pozo
11. Incubar 30' a temperatura ambiente
12. Detener la reaccion con NaOH 2 N, 50 μ L/pozo.
13. Medir la absorbancia a 405 nm en el lector para placas de ELISA.

VI. 3.1.7.2. Determinación del isotipo.

Por otra parte, para la selección de los hibridomas productores de anticuerpos anti-fosfotirosina tambien realizamos una prueba para detectar el isotipo de los anticuerpos. Existen varias técnicas pero nuevamente escogimos una prueba de ELISA. Utilizamos dos protocolos para la determinación del isotipo (Mouse Monoclonal Antibody Isotyping Reagents, Directions for use, Sigma Immunochemicals)

La determinación del ELISA de captura indica el isotipo (clase de Igs) de cualquier anticuerpo en solución

ELISA anti-ISOTIPO (CAPTURE ELISA)

1. En una placa para ELISA colocar 100 μ L /pozo de una dilución 1 1000 de cada uno de los seis anticuerpos α -isotipo (obtenidos en cabra) α -IgA, α -IgM, α -IgG1, α -IgG2a, α -IgG2b y α -IgG3, por duplicado
2. Incubar dos horas a temperatura ambiente
3. Lavar dos veces con TBS 1X
4. Agregar 100 μ L/pozo de la muestra problema e incubar dos horas a 37°C.
5. Lavar dos veces con TBS 1X

6. Lavar dos veces con TBS-Tween 0.01 %.
7. Preparar el anticuerpo (de cabra) específico para la cadena gamma acoplado a fosfatasa alcalina diluido 1:500 en TBS-BSA 3 %, agregar 50 μ L del anticuerpo/pozo e incubar una hora a 37°C.
8. Lavar tres veces con TBS-Tween 0.01 %
9. Disolver el sustrato (p-nitrofenilfosfato) en amortiguador FA (1 mg/mL), y agregar 50 μ L del sustrato/pozo
10. Incubar 30' a temperatura ambiente
11. Detener la reacción con NaOH 2N, 50 μ L/pozo
12. Medir la absorbancia a 405 nm en el lector para placas de ELISA.

El ELISA sandwich determina solamente el isotipo del anticuerpo específico para el antígeno empleado, en este caso BSA-PY

ELISA anti-isotipo (ANTIGEN MEDIATED o SANDWICH)

1. A una placa para ELISA agregar 50 μ L / pozo de una solución 2 μ g / mL de antígeno PY-Ala-Gly-BSA en amortiguador de carbonatos 50 mM (pH 9) A otros pozos agregar sólo BSA al 3 % y seguir el protocolo
2. Incubar dos horas a temperatura ambiente
3. Lavar dos veces con TBS 1X
4. Agregar 50 μ L de la muestra /pozo e incubar una hora a temperatura ambiente (por duplicado) Las muestras pueden ser sobrenadante de hibridomas, diluciones de suero y ascitis, y los controles positivos y negativos Los controles usados fueron: a) control positivo PY20 (anticuerpo monoclonal murino específico para PY comercial), b) control negativo medio de cultivo, anticuerpo goat anti-mouse, TBS
5. Incubar 60' a temperatura ambiente
6. Lavar 2 veces con TBS 1X y dos veces con TBS 1X-Tween 0.1 %
7. Agregar 100 μ L /pozo de una dilución 1:1000 de cada uno de los seis anticuerpos

α -isotipo (obtenidos en cabra): α -IgA, α -IgM, α -IgG1, α -IgG2a, α -IgG2b y α -IgG3, por duplicado.

8. Incubar 120' a temperatura ambiente.

9. Lavar 2 veces con TBS 1X y dos veces con TBS 1X-Tween 0.1 %.

10. Agregar 50 μ L/pozo de anticuerpo (de conejo) específico para cabra (rabbit anti-goat) acoplado a fosfatasa alcalina dilución 1:1500 en TBS-BSA 3 %.

11. Incubar 60' a 37°C.

12. Lavar 3 veces con TBS-Tween 0.1 %.

13. Disolver el sustrato (p-nitrofenilfosfato) en amortiguador FA (1 mg/mL), y agregar 50 μ L de sustrato/pozo.

14. Incubar 30' a temperatura ambiente.

15. Detener la reacción con NaOH 2 N, 50 μ L/pozo.

16. Medir la absorbancia a 405 nm en el lector para placas de ELISA.

VI. 3.1.8. Clonación.

Tan pronto como se detectó la producción de anticuerpos de la especificidad deseada en los sobrenadantes de los hibridomas, realizamos la clonación de las células productoras para realmente obtener anticuerpos monoclonales y no permitir que crecieran las clonas no productoras. Existen varios métodos como clonación en agar suave (Coffino et al., 1972, revisado por Metcalf, 1977) y clonación por dilución limitante. Se empleó la técnica de clonación por dilución limitante ya que tiene mayores ventajas que la clonación en agar suave (como el probar directamente los sobrenadantes, entre otras). La técnica de dilución limitante (Lefkovits and Waldmann, 1979, Coller and Coller, 1983) permite una elevada eficiencia de clonación cuando se colocan 10, 3 y 0.5 células de hibridoma por pozo en placas de 96 pozos. Cuando se crecen células en poca densidad, el crecimiento sigue la distribución de Poisson $f(0) = e^{-\lambda}$, siendo $f(0)$ la fracción de pozos sin crecimiento y λ el número promedio de clonas por pozos.

Con el fin de aumentar la eficiencia en la clonación, colocamos células de bazo de ratón que alimentan a las clonas que se están multiplicando (llamadas células

"alimentadoras" o "feeder cells"). Observamos las clonas como macrocolonias alrededor de 7 a 14 días después de la clonación. Se deben de probar los sobrenadantes de estas monoclonas para asegurar la producción de anticuerpos específicos para PY con la actividad y del isotipo deseados y, se recomienda clonar nuevamente para garantizar la monoclonalidad. Empleamos el siguiente protocolo de clonación por dilución limitante.

1. Un día antes de la clonación, colocar células "alimentadoras" del bazo de un ratón Balb/c en una caja Petri para cultivo de tejidos (ver obtención de células de bazo en la sección VI 3.1.5). Dejar reposar las células de 15 a 20 y tomar el sobrenadante sin resuspender el cual se coloca en placas de 96 pozos (aprox. 200,000 células/pozo). De esta manera eliminamos los fibroblastos.
2. Resuspender suavemente los pozos de los híbridos positivos y llevarlos a 1 mL con medio HT.
3. Contar las células.
4. Colocar las siguientes diluciones: 3, 1 y 0.3 células híbridas/pozo con células "alimentadoras" (es decir 30, 10 y 3 células híbridas/mL).
5. Incubar las placas en atmósfera húmeda con 37°C / 5 % CO₂.
6. A los tres días retirar la cuarta parte del medio y reponerlo con medio HT.
7. Cada tres días retirar la mitad del medio y reponerlo.
8. Cuando se observen colonias macroscópicas, realizar las pruebas de ELISA (sección VI. 3.1.7) para detectar las monoclonas positivas. Expandir estas últimas clonas tanto *in vitro* como *in vivo*.

VI.3.1.9. Cultivos a gran escala.

Fue necesario expandir las clonas probadas *in vitro* para obtener grandes cantidades de anticuerpo anti-fosfotirosina. La expansión se realizó de manera gradual, manteniendo el crecimiento exponencial y evitando el sobrecrecimiento que podría provocar estrés y aumentar el riesgo de tener células no productoras.

VI. 3.1.10. Criopreservación de los hibridomas.

En cuanto tuvimos aproximadamente 10^7 células híbridas, congelamos algunos viales en nitrógeno líquido en caso de emergencia (el riesgo de sobrecrecimiento de los híbridos no productores siempre está latente). La preservación a -70°C sólo permite conservar las células viables de 1 a 2 meses, mientras que el nitrógeno líquido las conserva varios años, con buenos rendimientos de recuperación después de la descongelación. Los protocolos empleados para la congelación y descongelación son los siguientes

Congelación	Descongelación
1 Centrifugar las células a 1000 rpm/5' a -4°C (las células deben estar en fase de crecimiento log)	1 Sacar el vial del tanque de nitrógeno líquido e inmediatamente introducirlo en un recipiente con agua a 37°C
2 Retirar el sobrenadante, romper el pellet con suavidad y resuspender las células en SFB con 10 % de DMSO	2 En la campana, bañar el vial con etanol al 70 % y abrirlo
3 Inmediatamente alcuotear en viales de criopreservación 1.5 ml. de la suspensión de células	3 Resuspender las células con una pipeta Pasteur y pasarlas a un tubo de centrifuga estéril con medio a 37°C
4 Llevar los viales al ultracongelador (-70°C), los cuales se conservan aquí durante algunos días	4 Centrifugar a 1000 rpm/5' a temperatura ambiente
5 Finalmente almacenar en tanque de nitrógeno líquido	5 Retirar el sobrenadante, romper el pellet con suavidad, resuspender las células en medio a 37°C y las pasamos a una botella con medio a 37°C
	6. Incubar las células a 37°C / 5 % de CO_2 .

VI. 3.1.11. Crecimiento de los hibridomas.

Las cantidades de anticuerpos que se obtienen en sobrenadante de cultivos son de 5-50 µg/mL, mientras que la cantidad obtenida a partir de liquido de ascitis o suero pueden ser de 2-10 mg/mL (Goding, 1996) Expandimos las clonas productoras tanto en medio de cultivo en la incubadora (*in vitro*) como en animales (*in vivo*) Es necesario para la expansión en animales crecer los hibridomas en ratones histocompatibles (en nuestro caso de la cepa Balb/c), aún cuando por este método (*in vivo*) se obtienen otras inmunoglobulinas, por lo que es necesaria la purificación del anticuerpo deseado Se prefiere el liquido de ascitis al suero ya que se obtiene una mayor cantidad de liquido (2-5 mL de ascitis contra 0.5-1 mL de suero) Utilizamos el siguiente protocolo para el crecimiento de los hibridomas en animales

1. Inocular un ratón Balb/c (de mas de 12 semanas) por via intraperitoneal con 0.5 mL de pristán (2,6,10,14-tetrametil acido decanoico), 7 a 10 dias antes de inocular las celulas híbridas (esto mejorará la probabilidad de la formación de ascitis, Hoogenraad et al , 1983)
2. Inocular por via intraperitoneal 10^6 - 10^7 celulas híbridas en PBS 1X /ratón 3 Cuando se observe un aumento de volumen en la cavidad peritoneal del animal, recolectar el liquido de ascitis por punción con aguja del #20
4. Centrifugar para separar las celulas y guardar el liquido a -20°C

VI. 3.1.12. Purificación de anticuerpos monoclonales.

La técnica de purificación por afinidad se basa en la unión de los anticuerpos anti-fosfotirosina de clase IgG1, a la proteína G inmovilizada en perlas de Agarosa Los anticuerpos IgM, IgA, IgE y componentes del suero no se unen a la matriz, por lo que son eliminados en los lavados La IgG purificada se eluye de la proteína G mediante un cambio de pH La técnica de purificación que empleamos para el anticuerpo específico para fosfotirosina fue la siguiente

1. Lavar 1.5 mL de perlas (proteína G-agarosa) 1 vez con TBS 1X.
2. Lavar las perlas con la solución "B" (Glicina 0.2 M, pH=2.8), 2 veces.
3. Lavar las perlas con TBS 1X, 3 veces
4. Centrifugar el sobrenadante o líquido de ascitis 30' a 2500 rpm/ 4°C
5. Filtrar la muestra a través de membrana de 0.22 µm.
6. Agregar 1 mL de la solución "A" (Tris 2M, pH=8.2)/ 50 mL de muestra
7. Incubar 1 mL de perlas de Agarosa-proteína G (del paso 3) con el volumen de muestra del paso 6, toda la noche a 4°C con agitación
8. Empacar la muestra con perlas en una columna y realizar 10 lavados con la solución "C" (Tris 0.1M-NaCl 0.2M, pH 8.2) Medir la absorbancia y empezar a eluir cuando la absorbancia a 280 nm es menor de 0.01 de D.O
9. Eluir los anticuerpos con la solución "B" y recoger los eluatos en tubos que contengan unas gotas de la solución "A" para neutralizar el pH. Almacenar los anticuerpos a 4°C con azida de sodio al 0.01%, pero durante periodos largos es mejor almacenarlos a -20°C en PBS con glicerol al 50%
10. Obtener la absorbancia de las fracciones eluidas a 280 nm en el espectrofotómetro. Las fracciones se guardan a -20°C sin azida de sodio
11. Inmediatamente ajustar el pH de la columna con 5 a 6 lavados con la solución "A" y 6 a 8 lavados con la solución "C"
12. Guardar la columna en esta solución a 4°C y si fuera por periodos largos, entonces agregar azida de sodio al 0.02%

VI. 3.2. Caracterización de los anticuerpos monoclonales anti-fosfotirosina.

VI. 3.2.1. Determinación del isotipo.

- El protocolo que utilizamos se encuentra en la sección VI.3.1.7.2.

VI. 3.2.2. Determinación de la constante de afinidad.

Calculamos la constante de afinidad a partir de la determinación de la constante de disociación (K_d) del complejo antígeno-anticuerpo en solución, en equilibrio, mediante el método de Friguet y col. Para esto determinamos la concentración aproximada del anticuerpo ACM, en el sobrenadante utilizando la técnica de ELISA (sección VI 3.1.7.1). Posteriormente, para conocer la constante de afinidad, realizamos un ensayo de competencia por el anticuerpo entre antígeno soluble y antígeno adsorbido a la fase sólida en un ELISA; usamos concentraciones equivalentes de cada anticuerpo. El procedimiento fue el siguiente:

1. Preparar una placa con el antígeno PY-Ala-Gly-BSA (sección VI 3.1.7.1, pasos 1-4)
2. Lavar 2 veces con TBS 1X-Tween 0.1 %
3. Agregar 50 μ L de la solución del anticuerpo y 50 μ L de cada solución de fosfoaminoácido / cada concentración (por triplicado). Utilizar concentraciones de 54 hasta 1.55×10^{-8} mM del fosfotirosina, fosfoserina o fosfotreonina
4. Incubar 15-30' a temperatura ambiente
5. Agregar la mezcla del paso 3 a cada pozo e incubar 60' a temperatura ambiente
6. Continuar con los pasos 7-13 de la sección VI 3.1.7.1
7. En las gráficas de D.O. contra concentración de inhibidor, se determinó la concentración de cada fosfoaminoácido que inhibe la unión en un 50%. Esta será la concentración necesaria para el 50% de saturación, la cual está relacionada a la K_d (ver Sección VII.2.2.3.).

VI.3.2.3. Especificidad de los anticuerpos (comparación entre la capacidad de distintos fosfoaminoácidos para inhibir la unión de ACM₂ a antígenos fosforilados).

Conocimos la especificidad del anticuerpo ACM₂ por la fosfotirosina mediante el ensayo de competencia descrito en la sección VI 3 2 2

VI.3.2.4. Detección de proteínas fosforiladas en tirosina mediante Western-Blot.

Los anticuerpos monoclonales anti-fosfotirosina serán utilizados para detectar la presencia de residuos de fosfotirosina en proteínas celulares desnaturalizadas, mediante la técnica de Western-Blot que se revelará con el anticuerpo anti-fosfotirosina (blot anti-fosfotirosina) Debemos de conocer la capacidad de reconocimiento de la fosfotirosina por el anticuerpo en las condiciones de estos ensayos Realizamos la determinación con el anticuerpo monoclonal anti-fosfotirosina presente en sobrenadante El protocolo para el inmunoblot anti-fosfotirosina que empleamos es

VI. 3.2.4.1. Inmunoblot anti-fosfotirosina.

1 Realizar una separación de proteínas por electroforesis en geles al 10% de concentración de acrilamida (SDS-PAGE) Utilizamos cámaras Hoeffler, Tall Mighty Small Las dimensiones de los geles fueron de 8.5x7 cm y 0.75 mm de espesor Aplicamos 120 V al gel concentrador por 30' y 150 V al gel separador por 90', en amortiguador de corrida

2 Transferir las proteínas separadas a papel de nitrocelulosa de 0.45 μ (BioRad), mediante una electrotransferencia en cámara húmeda (BioRad) 1h a 100V, en amortiguador de transferencia

Utilizamos dos sistemas de revelado distintos para comparar la sensibilidad y especificidad de cada uno

a) Revelado por fosfatasa alcalina

3 Bloquear la(s) membrana(s) de nitrocelulosa, toda la noche a 4°C, con agitación en la solución de bloqueo (1) (para eliminar el pegado inespecífico)

4. Lavar 3 veces la(s) membrana(s), 5' c/u con solución de lavado.
 5. Incubar la(s) membrana(s) 120', en 10-20 mL de la solución con el anticuerpo primario específico para PY (PY20 o sobrenadante de ACM₂).
 6. Lavar 3 veces la(s) membrana(s), 5' c/u, con solución de lavado.
 7. Incubar la(s) membrana(s) 90', en 10-20 mL de la solución con el anticuerpo secundario diluido 1 1000 en solución de bloqueo (3) (anticuerpo de cabra, específico para la cadena gamma, acoplado a fosfatasa alcalina)
 8. Lavar 3 veces la(s) membrana(s), 5' c/u con solución de lavado
 9. Agregar la solución de revelado (sustrato precipitable de fosfatasa alcalina) (una pastilla de BCIP/NBT disuelta en 10 mL de agua bidestilada) / membrana.
 10. Esperar las bandas y enjuagar el blot
- b) Revelado por quimioluminiscencia
3. Bloquear la(s) membrana(s) de nitrocelulosa toda la noche, a 4°C con agitación, en la solución de bloqueo (2) (para eliminar el pegado específico)
 4. Lavar 1 vez la(s) membrana(s), 15' c/u, con solución de lavado.
 5. Bloquear la(s) membrana(s), 60', con agitación a temperatura ambiente, en solución de bloqueo (3) (para eliminar el pegado inespecífico)
 6. Lavar 1 vez la(s) membrana(s), 15' c/u, dos lavados más de la(s) membrana(s), 5' c/u con solución de lavado
 7. Incubar las membranas 90' en 10-20 mL de la solución con el anticuerpo primario específico para PY (PY20 o sobrenadante de ACM₂)
 8. Lavar 1 vez la(s) membrana(s) 15' c/u, 4 lavados más de la(s) membrana(s) 5' c/u con solución de lavado.
 9. Incubar 90' en 10-20 mL de solución con el anticuerpo secundario diluido 1 1000 en solución de bloqueo (3) (anticuerpo de cabra Fc específico acoplado a peroxidasa)
 10. Lavar 1 vez la(s) membrana(s) 15' c/u, 4 lavados más de la(s) membrana(s) 5' c/u con solución de lavado
 11. Revelar con ECL. (Walker, G.R., 1975; Kauffman, S.H., 1987)

VI.3.2.5. Reconocimiento de proteínas celulares fosforiladas en tirosina por el anticuerpo monoclonal.

El objetivo principal de la producción de los anticuerpos monoclonales anti-fosfotirosina es su uso como herramientas para detectar cambios que ocurren en la fosforilación en tirosina de proteínas celulares (Cooper y col., 1983, Abelson y col., 1991.) Por lo que tanto, consideramos importante evaluar si el anticuerpo ACM₂ puede reconocer proteínas fosforiladas en inmunoblot

VI. 3.2.5.1. Tratamiento de células THP-1 con pervanadato.

1. Preparar al momento, la solución de pervanadato (ortovanadato 1 mM y H₂O₂ 1 mM). Colocar 100 µL de ortovanadato 1 mM y 58.8 µL de H₂O₂ 1 mM / mL de células e incubar a 37°C, durante 15'
2. Colectar las células THP-1, colocar la cantidad de células deseada / mL de medio D-MEM con SFB al 10%, en tubos eppendorff
3. Agregar el pervanadato e incubamos 5' a 37°C
4. Detener la estimulación con 500 µL de TBS 1X frío
5. Centrifugar 1 pulso en la microfuge y retirar TODO el sobrenadante
6. Agregar 15 µL de amortiguador de lisis con inhibidores de proteasas y de fosfatasa / 300,000 células durante 15' a 4°C
7. Centrifugar 15' a 14000 rpm en frío
8. Tomar el sobrenadante y transferirlo a otro tubo eppendorff, agregando 50 µL de amortiguador de muestra 4X reductor / 300,000 células.
9. Hervir las muestras durante 5' y almacenarlas a -20°C

VI. 3.2.5.2. Inmunoblot anti-fosfotirosina.

Usamos la técnica de revelado por quimioluminiscencia mencionada en la sección VI. 3.2.4.1., con las siguientes modificaciones

Paso 7. La incubación con el anticuerpo primario fue de 1 hora

Paso 9. La incubación del anticuerpo secundario fue de 40' y la dilución 1:1500 en TBS-Tween 0.05 %-BSA 1%

VII. RESULTADOS.

VII. 1. Producción del anticuerpo anti-fosfotirosina.

Luego de la fusión, seleccionamos los pozos con crecimiento celular en los que se estaban produciendo anticuerpos anti-fosfotirosina de la clase IgG, lo cual se determinó mediante el ensayo de ELISA anti-PY (sección VI 3 1 7 1) De esta selección obtuvimos 12 pozos que denominamos con la letra A y un número consecutivo (Tabla 5) Utilizamos un anticuerpo comercial anti-fosfotirosina como control positivo, PY20 (Glenny, J y col 1988) En esta selección comprobamos que los anticuerpos producidos en cada pozo reconocen BSA-PY y no BSA, adicionalmente descartamos la posibilidad de interferencias debidas a factores como el segundo anticuerpo y el medio de cultivo Como muestra la Tabla 5, de las 12 clonas positivas detectadas en los primeros ensayos, algunas se perdieron por contaminación de los pozos de cultivo, y otras aparentemente dejaron de producir anticuerpos Unas más no lograron mantenerse reproduciéndose en cultivo Únicamente la denominada A2 logró mantenerse en crecimiento y continuó produciendo anticuerpo

Realizamos la clonación del pozo denominado A2 por dilución limitante (sección VI.3 1 8), durante este procedimiento se congelaron células (sección VI.3 1 1 0) Periódicamente probamos el sobrenadante de cada pozo y botella con células en crecimiento tanto de la expansión como de la clonación, para asegurar que se mantenía la producción del anticuerpo

La clona resultante fue nombrada ACM₂, expandimos esta clona tanto *in vitro* como *in vivo* (sección VI 3 1 1 9. y VI 3 1.11.) Se determinó el isotipo del anticuerpo ACM₂ con el fin de emplear la técnica adecuada de purificación (sección VI.2.1.) A partir del sobrenadante y del líquido de ascitis purificamos el anticuerpo (sección VI 3 1 1 2.)

Por cromatografía de afinidad en columnas de Proteína G-Agarosa, obtuvimos aproximadamente 3 mg de proteína a partir de 500 ml de sobrenadante de ACM₂. Se probaron las fracciones eluidas con una concentración mayor a 1 mg/ml en un ensayo de ELISA (sección VI 3 1 7 1) y los valores de densidad óptica que obtuvimos fueron 4 veces menores a los del PY20 (1µg/ml), además probamos el sobrenadante sometido a purificación y la lectura de densidad óptica fue de 1/3 de la lectura del sobrenadante antes de purificar (datos no mostrados) Por otra parte, muestras del sobrenadante sin purificar y del anticuerpo purificado, sometidas a una electroforesis (SDS-PAGE al 12%), mostraron las mismas bandas, las cuales corresponden a las cadenas ligera y pesada del anticuerpo (datos no mostrados)

Debido a que en el proceso de purificación, la recuperación del anticuerpo con actividad es muy baja, (ver discusión) y, como el resultado del sobrenadante es comparable con el del anticuerpo de referencia (PY20) en los ensayos de ELISA, decidimos en adelante, usar el sobrenadante de ACM₂ como fuente de anticuerpos anti-PY

Tabla 5. Pozos con células productoras de anticuerpos anti-PY.

POZOS	PRODUCCION DE ANTICUERPOS ANTI-PY*	OBSERVACIONES
A1	++++	Muere
A2	+++++-	Crece bien y da lecturas elevadas en la selección por ELISA
A3	++	Dejó de producir anticuerpos
A4	+++	Dejó de producir anticuerpos
A5	+++	Dejó de producir anticuerpos
A6	++++	Contaminada
A7	+	Contaminada
A8	+++	Dejó de producir anticuerpos
A9	++	Muere
A10	++	Muere
A11	++	Dejó de producir anticuerpos
A12	+++	Contaminada

La producción de anticuerpos fue determinada mediante ensayos de ELISA. La cantidad de + es una representación de los valores de densidad óptica obtenidos.

VII. 2. Caracterización del anticuerpo anti-fosfotirosina ACM₂.

VII. 2.1. Determinación del isotipo.

La determinación del isotipo se realizó por dos métodos diferentes con el fin de asegurar un resultado correcto (sección VI 3 1 7 2). Una de las determinaciones nos indica el isotipo de cualquier anticuerpo en solución (ELISA captura, Figura 14A), mientras que la otra (ELISA sandwich, Figura 14B) nos determina solamente el isotipo del anticuerpo en contra del antígeno empleado, en este caso BSA-PY. Como se puede observar en las figuras, el anticuerpo ACM₂ es IgG1 mientras que el PY20 es IgG2b

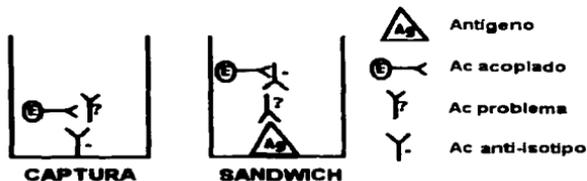
Se utilizaron los siguientes controles en las dos determinaciones.

- ELISA CAPTURA

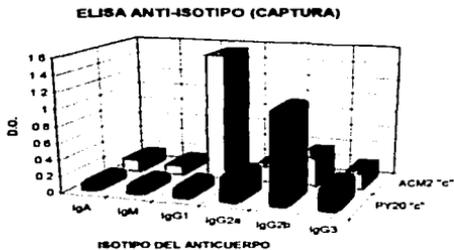
- sin anticuerpo anti-isotipo lectura de 0 095
- sin muestra lectura de 0 097

- ELISA SANDWICH

- sin antígeno lectura de 1 370
- sin muestra lectura de 1 036



A)



B)

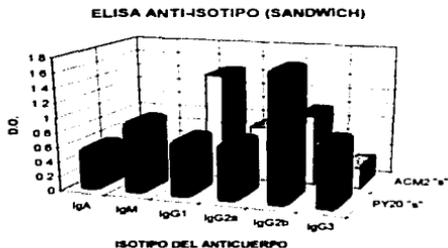


Figura 14. Representación gráfica del ensayo para determinar el isotipo.
"c": datos del ELISA de captura, "s": datos del ELISA de sandwich. Los datos que se muestran provienen de un experimento representativo de un total de tres realizadas

VII. 2.2. Determinación de la constante de afinidad y especificidad del anticuerpo (reactividad con distintos fosfoaminoácidos).

VII. 2.2.1. Obtención de la concentración de ACM₂.

Para conocer aproximadamente la concentración de ACM₂ en el sobrenadante, comparamos los valores de densidad óptica en ELISA de un rango de concentraciones de ACM₂ y PY20, para luego realizar una curva patrón de PY20 cuya concentración es conocida (Figura 15) A partir de la curva patrón interpolamos los datos correspondientes a lecturas de ACM₂ (Figura 15 B y C)

$$Y = A + B \cdot X \quad (1)$$

$$\text{a partir de la ecuación (1), } X = \frac{Y - A}{B} \quad (2)$$

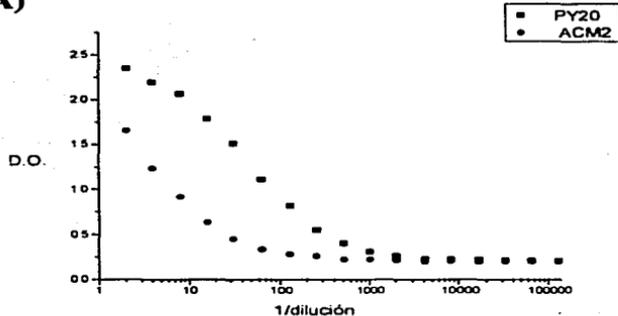
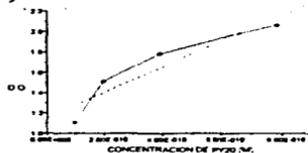
La lectura de densidad óptica del sobrenadante sin diluir es de 1.995, si reemplazamos este valor en la ecuación (2), tenemos

$$X = \frac{1.995 - 1.156}{1260624679.979} = 6.655 \times 10^{-10} \text{ M}$$

La concentración aproximada de ACM₂ en sobrenadante de cultivo es entonces de 6.655×10^{-10} M, y es comparable en densidad óptica con la dilución 1 8000 del PY20 (7.8×10^{-10} M).

VII. 2.2.2. Especificidad del anticuerpo.

Para investigar si los anticuerpos anti-fosfotirosina pudieran mostrar reacción cruzada con fosfoserina y fosfotreonina, determinamos la capacidad de PY, PS y PT, para inhibir la unión del anticuerpo a BSA-PY en ELISA. Como muestra la Figura 16, la unión de ambos anticuerpos es inhibida por concentraciones muy bajas de PY (2×10^{-1} M), mientras que PT y PS sólo son inhibitorias a concentraciones de 1.8×10^{-2} M para ACM₂ y de 4.5×10^{-3} M para PY20.

A)**B)****C)**

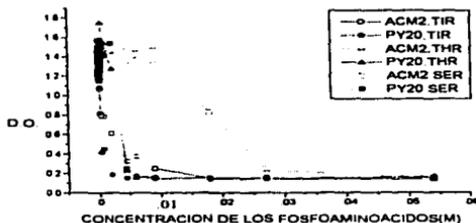
Regresión Lineal:
 $Y = A + B \cdot X$

$A = 1.156$
 $B = 1260624679.97952$
 $R = 0.93177$

Figura 15. Determinación de la concentración de ACM₂.

A) Se realizaron diluciones consecutivas 1:2 en TBS 1X de los anticuerpos ACM₂ (sobrenadante sin diluir) y PY20 (6.25×10^{-6} M igual a una dilución 1:1000 a partir de una solución de 1 mg/ml). Este es el resultado del experimento más representativo. B) Curva patrón de PY20 obtenida a partir de la gráfica A tomando solo los valores con tendencia lineal. C) Datos de la regresión lineal de B.

A)



B)

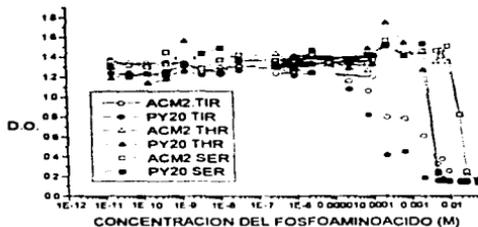


Figura 16. Especificidad de anticuerpos anti-fosfotirosina.

A) Se compara el reconocimiento de fosfotirosina, fosfoserina y fosfotreonina por ACM₂ y PY20 B) Datos de A con escala logarítmica Fosfoaminoácidos TIR fosfotirosina, THR: fosfotreonina y SER fosfoserina Las gráficas son resultado del experimento más representativo de un total de cinco experimentos

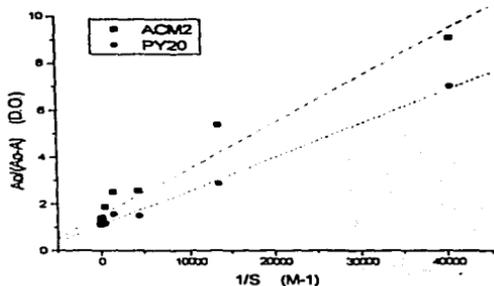
VII. 2.2.3. Determinación de la constante de afinidad.

Usando concentraciones equivalentes de ACM₂ y PY20 se realizó un ensayo de competencia entre el antígeno en fase sólida (BSA-PY) y fosfotirosina en solución (a partir de datos de la Figura 16), del cual se calculó la constante de disociación (Kd) según una simplificación del método de Friguet y col (Figura 17) Se obtuvo el valor de la constante de afinidad de los anticuerpos mediante el cálculo de la constante de disociación ya que $K_a = 1/K_d$

A partir de la ecuación de Klotz,

$$\frac{A_0}{A_0 - A} = \frac{1}{S} * K_d + 1$$

donde A₀ es la concentración de anticuerpo total, A es la concentración de anticuerpo libre y S la concentración de antígeno. La pendiente de la gráfica en la Figura 17 corresponde al valor de K_d. Los valores calculados de K_a para PY se encuentran en la Tabla 6. También se calcularon los valores de K_a de los anticuerpos para fosfotreonina y fosfoserina a partir de datos de la Figura 16 (mostrados en la Tabla 6)



Regresión lineal ACM2:
 $Y = A + B \cdot X$

A=1.51
 B=0.0002
 R=0.97713

Regresión lineal PY20:
 $Y = A + B \cdot X$

A=1.10176
 B=0.00014
 R=0.99734

Figura 17. Determinación de la constante de afinidad (Friguet y col., 1985).

En la gráfica, A_0 es la D.O. para el anticuerpo en ausencia de antígeno, A es la D.O. a diferentes concentraciones de antígeno y S es la concentración del antígeno. Resultados del experimento más representativo de cinco determinaciones.

Tabla 6. Constantes de afinidad.

	Kd (M⁻¹)	Ka (M)
PY20 TIROSINA	1.4x10⁻⁴	7.14x10³
PY20 TREONINA	3.27x10⁻²	3.05x10¹
PY20 SERINA	3.21x10⁻²	3.11x10¹
ACM₂ TIROSINA	2x10⁻⁴	5x10³
ACM₂ TREONINA	4.09x10⁻¹	2.44
ACM₂ SERINA	2.48x10⁻¹	4.02

Los parámetros son el resultado de la regresión lineal con base a datos de la Figura 16:

$$Y = A + B \cdot X$$

Resultado de experimento representativo de cinco determinaciones

VII. 2.3. Detección de proteínas fosforiladas en tirosina mediante Western-Blot.

Realizamos un inmunoblot anti-fosfotirosina (sección VI 3 2 4 1.) con el fin de detectar al antígeno utilizado en los ensayos de ELISA (Figura 18) La banda con un peso molecular de 60-70 KDa corresponde a la BSA-PY El inmunoblot fue revelado por dos métodos con diferente sensibilidad, en los cuales observamos el mismo resultado Como se puede apreciar en la Figura 18, para los dos métodos, ninguno de los anticuerpos reconoce a la proteína acarreadora (BSA) y el segundo anticuerpo (anticuerpo anti-IgG murina acoplada a enzima) no interfiere con el resultado

VII. 2.4. Reconocimiento de proteínas celulares fosforiladas en tirosina por el anticuerpo monoclonal.

En vista del uso principal que se piensa dar al anticuerpo producido, es de gran importancia comprobar si ACM₂ puede reconocer proteínas celulares fosforiladas en tirosina. Para este fin se realizó un inmunoblot anti-fosfotirosina (sección VI 3 2 5 2) con células monocíticas THP-1 tratadas con pervanadato de sodio (sección VI 3 2 5 1) (Figura 19), el cual es un inhibidor de fosfatasa, específicamente de fosfatasa de fosfotirosina

Las bandas reconocidas por ambos anticuerpos corresponden a proteínas fosforiladas en tirosina ya que no hubo reconocimiento de fosfotreonina, ni fosfoserina (acopladas a una proteína acarreadora) en Western-Blot, por ninguno de los anticuerpos anti-fosfotirosina (datos no mostrados)

El patrón de bandas específicas dado por ambos anticuerpos es semejante, además, se distinguen claramente las diferencias, en cuanto a proteínas fosforiladas en tirosina, entre células no tratadas y células tratadas con pervanadato

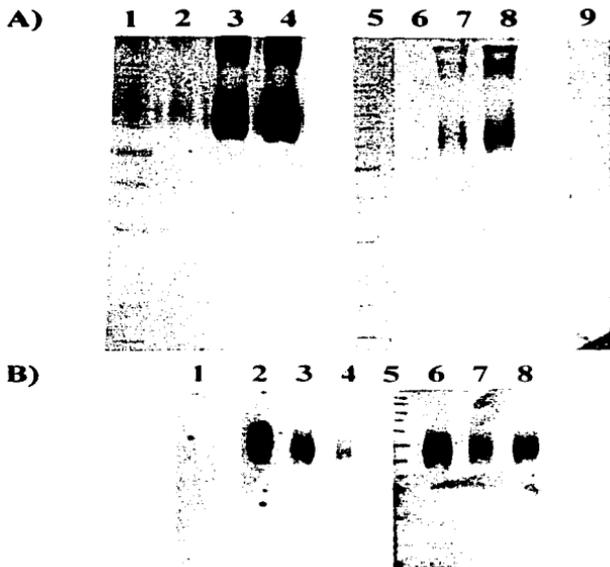


Figura 18. Detección de proteínas fosforiladas en tirosina por Western-Blot.

- A) Carriles 1-4 revelados con PY20 (1) Pesos moleculares, (2) BSA, (3) BSA-PY 20 ng y (4) BSA-PY 40 ng, carriles 5-8 revelados con ACM₂ (5) Pesos moleculares, (6) BSA, (7) BSA-PY 20 ng y (8) BSA-PY 40 ng, Carril 9 revelado sólo segundo anticuerpo BSA-PY 40 ng. Se utilizó un segundo anticuerpo anti-IgG de ratón acoplado a fosfatasa alcalina.
- B) Carril 1 revelado sólo segundo anticuerpo BSA-PY 40 ng, carriles 2-4 revelados con ACM₂; (2) BSA-PY 40 ng, (3) BSA-PY 20 ng y (4) BSA-PY 10 ng, (5) Pesos moleculares, carriles 6-8 revelados con PY20 (6) BSA-PY 20 ng, (7) BSA-PY 10 ng y (8) BSA-PY 40 ng. Se utilizó un segundo anticuerpo anti-IgG de ratón acoplado a peroxidasa. Al revelar por quimioluminiscencia, el tiempo de exposición para ACM₂ fue de 5' mientras que para PY20 y sólo segundo anticuerpo éste fue de 15".

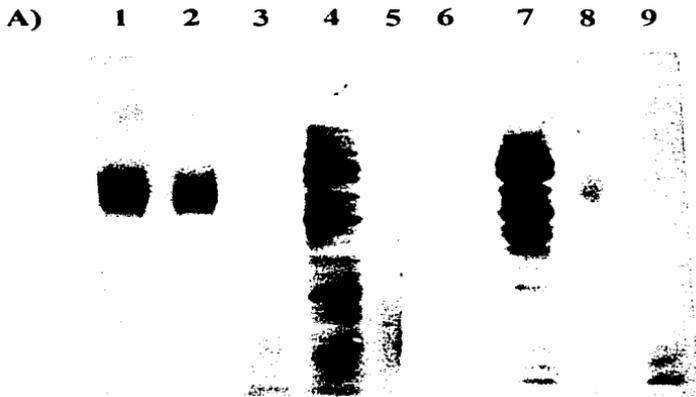


Figura 19. Detección de proteínas fosforiladas en tirosina de células tratadas con pervanadato (Western-Blot revelado mediante quimioluminiscencia).
 Carriles 1-4 revelados con ACM₂ (tiempo de exposición 2''): (1) BSA-PY 60 ng, (2) BSA-PY 40 ng, (3) Células sin tratamiento 25 μ l de lisado total (L.T.) y (4) Células tratadas 25 μ l de L.T.; carril (5) Pesos moleculares, carriles 6-8 revelados con PY20 (tiempo de exposición 2''): (6) Células sin tratamiento 25 μ l de L.T., (7) Células tratadas 25 μ l de L.T. y (8) BSA-PY 20 ng; carril 9 revelado sólo con segundo anticuerpo: (9) Células tratadas 25 μ l de L.T.

VIII. DISCUSION.

VIII. 1. Producción de anticuerpos monoclonales anti-fosfotirosina.

El primer paso para la producción de anticuerpos monoclonales específicos para fosfotirosina, involucró un esquema de inmunización que permitiese obtener anticuerpos de alta afinidad. Mediante inmunizaciones repetidas se promueve una respuesta secundaria en que se producen principalmente anticuerpos de clase IgG, que además tienen una mayor afinidad que los producidos en la respuesta primaria (en la que la mayoría son IgM). La constante presencia del antígeno en el animal conlleva a la maduración de la afinidad de los anticuerpos.

Para la producción de anticuerpos monoclonales existen protocolos ya establecidos, sin embargo, resulta muy importante estandarizar estos protocolos en base a las condiciones de trabajo de cada laboratorio y los reactivos con los que se cuenta. La obtención de anticuerpos monoclonales está sujeta a innumerables factores, algunos de los cuales dependen a su vez del azar. Si las condiciones de fusión tales como la concentración de PEG, tiempo de fusión, cantidades de células, etc. no son las adecuadas, las células mueren en el proceso. Por otra parte, si pensamos que de los millones de células de bazo sólo una fracción se fusiona con las células del mieloma y que son todavía menos los híbridos viables, que pueden o no producir el anticuerpo deseado, podemos decir que la obtención del anticuerpo monoclonal con ciertas características es cuestión de probabilidad.

El método de selección de las células productoras del anticuerpo deseado es por lo tanto de vital importancia. El objetivo principal de la producción de los anticuerpos monoclonales anti-fosfotirosina es su uso como herramientas para detectar, mediante Western-Blot, cambios que ocurren en la fosforilación en tirosina de proteínas. En este caso, se utilizaron dos métodos de selección, el Dot-Blot y el ELISA. El primero se basa en el mismo principio de identificación del antígeno que en el Western-Blot mientras que el segundo, tiene una mayor sensibilidad y es más sencillo aunque no detecta al antígeno en

las mismas condiciones. Los resultados de los dos métodos son equivalentes, es decir, con ambos ensayos se detectaron anticuerpos específicos para fosfotirosina (datos no mostrados). Sin embargo, se decidió utilizar el método de ELISA como método de selección por ser más práctico y por que se requiere menor tiempo para obtener el resultado, utilizándose el hapteno acoplado a BSA en vez de KLH para evitar detectar anticuerpos específicos para la proteína acarreadora.

Inicialmente se detectó la producción de anticuerpos anti-fosfotirosina en varios pozos, pero en la mayor parte de los casos las células perdieron esta capacidad. Esto puede explicarse de distintas maneras: una posibilidad es el "estrés" provocado por una gran cantidad de células, otra es la presencia de contaminación por micoplasma, y otra posibilidad es el sobrecrecimiento de las células no productoras. Otras células productoras mueren, una posibilidad es que algunas de las células presentaron un crecimiento acelerado que no detectamos oportunamente, por lo que sobrepoblaron el pozo y la falta de nutrientes provocó su muerte, o quizá el rearrreglo cromosómico no fue favorable. Finalmente sólo las células del pozo A2 conservaron la capacidad de producir anticuerpos.

La técnica recomendada para purificar inmunoglobulinas de clase IgG a partir de sobrenadante de cultivos celulares, es la cromatografía de afinidad en columnas de proteína A o G. La unión de la inmunoglobulina a estas proteínas depende de la subclase a la que pertenece. Con el fin de elegir la técnica correcta de purificación se determinó la subclase del anticuerpo ACM₂. Ya que el anticuerpo resultó ser IgG1 se decidió usar la columna de proteína G puesto que esta subclase no se une a la proteína A pero sí a la proteína G (Goding, 1996). Después de la purificación, los valores de densidad óptica obtenidos para el anticuerpo (a una concentración de 1 mg de proteína/mL), en el ensayo de ELISA, fueron menores que los del sobrenadante original del cual se purificó el anticuerpo. Para explicar lo anterior existen dos posibilidades: que el anticuerpo no se une a la columna o que durante o después de la purificación está perdiendo su actividad. El hecho de que el sobrenadante después de la purificación tenga baja concentración de anticuerpo, indica que la mayor parte del anticuerpo se unió a la columna y, dado que los valores de D.O. del

"anticuerpo purificado" son tan bajos, esto sugiere que el anticuerpo está perdiendo actividad durante la purificación.

Como en los ensayos de ELISA el sobrenadante de ACM₂ rinde valores de densidad óptica similares a los de PY20 (1 µg/ml), y ya que no es necesario que el anticuerpo esté puro para demostrar su uso en la detección de proteínas fosforiladas en tirosina, se decidió seguir adelante empleando el sobrenadante de ACM₂ antes de buscar purificar mediante otras técnicas

VIII. 2. Caracterización del anticuerpo anti-fosfotirosina ACM₂.

La caracterización se realizó a partir del sobrenadante obtenido de la expansión *in vitro* de la clona ACM₂

VIII.2.1. Comparación semi-cuantitativa de la constante de afinidad y especificidad del anticuerpo.

VIII. 2.1.1. Determinación de las constantes de afinidad de ACM₂ y PY20 por fosfoaminoácidos.

Para comprender como obtuvimos Ka (Figura 17) a partir de la gráfica de la Figura 16, recordemos que

$$K_d = \frac{[Ac][Ag]}{[AgAc]} \quad (1)$$

y en el equilibrio, $[AgAc] = [Ac]u$, por lo tanto, sustituyendo en (1):

$$K_d = \frac{[Ac][Ag]}{[Ac]u} \quad (2)$$

De lo anterior, $\frac{K_d}{[Ag]} = \frac{[Ac]}{[Ac]u}$ y como $[Ac]l = [Ac]l - [Ac]u$,

obtenemos:

$$\frac{[Ac]f}{[Ac]u} - 1 = \frac{Kd}{[Ag]f} \quad (3)$$

Dividiendo (3) entre $[Ac]f$ y rearreglando, tenemos que:

$$\frac{1}{[Ac]u} = \frac{Kd}{[Ag]f[Ac]f} + \frac{1}{[Ac]f} \quad (4)$$

que es la representación matemática del equilibrio dada por la ecuación de Klotz (Klotz, 1953). Si consideramos que en el ensayo de inhibición, la densidad óptica obtenida es proporcional a la concentración de anticuerpo libre,

$$\frac{[Ac]f}{[Ac]f} = \frac{A}{A_0}$$

siendo A_0 la absorbancia medida para el anticuerpo en ausencia de antígeno y A , el valor de la absorbancia del anticuerpo para cada concentración de antígeno. Entonces, tenemos las siguientes definiciones

$$[Ac]u = [Ac]f \cdot \frac{A_0 - A}{A_0} \quad (5)$$

$$[Ag]f = [Ag]t - [Ac]f \cdot \frac{A_0 - A}{A_0} \quad (6)$$

Reemplazando (5) y (6) en la ecuación de Klotz,

$$\frac{A_0}{(A_0 - A) \cdot [Ac]f} = \frac{Kd}{([Ag]t - [Ac]f \cdot \frac{A_0 - A}{A_0})} + \frac{1}{[Ac]f} \quad (7)$$

multiplicando (7) por $[Ac]f$, nos queda:

$$\frac{A_0}{A_0 - A} = \frac{Kd}{[Ag]t - [Ac]f \cdot \frac{A_0 - A}{A_0}} + 1 \quad (8)$$

Considerando que $[Ag]t > 10 [Ac]f$, la concentración del antígeno libre puede ser aproximado a la concentración total de antígeno, por lo que la ecuación (8) es

independiente de la concentración de anticuerpo total ($[Ac]_t$ tiende a cero). Nos queda entonces:

$$\frac{A_0}{A_0 - A} = \frac{Kd}{[AR]_f} + 1 \quad (9)$$

que se ajusta a la ecuación de una recta y nos permite obtener la Kd y finalmente la Ka de los anticuerpos (Figura 17)

De la Tabla 6, podemos ver que la Ka del anticuerpo de referencia es mayor a la de ACM_2 (se realizaron varias determinaciones donde los valores de Ka para $PY20$ variaban, pero siempre con el mismo orden de magnitud y siempre mayores a los de ACM_2). De acuerdo a nuestros resultados, podemos decir que la constante de afinidad de ACM_2 por PY es menor que la de $PY20$

Por el mismo método, se calcularon las constantes de afinidad de los anticuerpos para fosfoserina y fosfotreonina. Los resultados de la Tabla 6 muestran que ACM_2 tiene menor afinidad que $PY20$ por estos dos fosfoaminoácidos, lo cual significa que ACM_2 es más específico para fosfotirosina

Es evidente que los valores de Ka calculados de esta manera, no pueden considerarse exactos, ya que durante la incubación en la placa de ELISA, el equilibrio establecido previamente entre el anticuerpo y el antígeno soluble, puede modificarse por efecto del antígeno multivalente adsorbido en la placa. De hecho los valores de afinidad para fosfotirosina de ambos anticuerpos son muy bajos, si estos valores de Ka fueran reales, no permitirían que la unión antígeno-anticuerpo fuese estable a los lavados durante las condiciones de los ensayos de ELISA y Western-Blot. Sin embargo, dado que se utilizó el mismo método para ambos anticuerpos, podemos considerar la existencia de errores sistemáticos, por lo tanto, aunque no tengamos certeza del valor real de Ka , podemos concluir que es menor la afinidad de ACM_2 por PY comparada con la de $PY20$, pero la diferencia es menor de un orden de magnitud. Por otra parte, considerando que ACM_2 es menos afín para PT y PS que $PY20$, concluimos que el anticuerpo monoclonal producido es más específico para PY .

Otra aproximación del valor de K_a puede obtenerse de la Figura 16 si consideramos un antígeno monovalente y una población homogénea de anticuerpos formando complejos inmunes, siendo la concentración del antígeno mucho mayor que la del anticuerpo. Cuando se tiene el 50% de saturación de los sitios de unión de los anticuerpos,

$$[Ac]f = [Ac]u = \frac{[Ac]t}{2}$$

ahora sustituyendo en

$$K_a = \frac{[A_R Ac]}{[A_R]f * [Ac]f} \quad (10)$$

obtenemos

$$K_a = \frac{[A_R Ac]}{[A_R]f * \frac{[Ac]t}{2}} \quad (11)$$

y como $[Ac]u = \frac{[Ac]t}{2} = [A_R Ac]$ tenemos ahora,

$$K_a = \frac{[Ac]t / 2}{[A_R]f * [Ac]t / 2} = \frac{1}{[A_R]f} \quad (12)$$

Es decir, K_a es el inverso de la concentración de antígeno libre en el punto de 50% de saturación. A partir de la Figura 16 podemos comparar cualitativamente las afinidades de ACM_2 y $PY20$. Es evidente que requerimos una menor concentración de hapteno libre para inhibir la unión de $PY20$ a la placa, que para inhibir la unión de ACM_2 . Dado que K_a tiene una relación inversa con la concentración de hapteno necesaria para una inhibición del 50%, esto nos indica que la afinidad de $PY20$ por PY es mayor que la afinidad de ACM_2 .

Existen métodos con los que se puede determinar el valor real de la constante de afinidad. Sin embargo, para cumplir los objetivos de este trabajo es suficiente la comparación relativa de las afinidades del anticuerpo producido y del comercial.

Consideramos más importante demostrar la utilidad de ACM₂ para los ensayos previstos, para un conocimiento exacto de su afinidad por PY.

VIII. 2.1.2. Especificidad del anticuerpo.

Dada la similitud entre serina, treonina y tirosina fosfato era importante demostrar que el anticuerpo producido reconociera específicamente a la fosfotirosina para poder decir que la fosforilación que pudiera ser detectada por ACM₂ realmente estuviera ocurriendo en tirosina y no indistintamente en cualquiera de los tres hidroxiaminoácidos fosforilados. Esta es la razón por la que se enfrentó a ACM₂ con dichos aminoácidos en un ELISA (Figura 16)

El anticuerpo de referencia es específico para PY al igual que ACM₂ sólo que PY20 reconoce mejor a PY. Sin embargo la especificidad de ACM₂ es mayor puesto que reconoce a PT y PS sólo a concentraciones muy elevadas, de estos fosfoaminoácidos

Una manera de explicar la especificidad del anticuerpo producido es pensar que los sitios de unión de ACM₂ y el dominio SH2 son muy similares dado que ambos se unen a PY y presentan poco reconocimiento por PT y PS. Tal vez la PY tiene una reactividad cruzada con PT y PS, debido a sus similitudes en estructura, lo cual puede repercutir en la especificidad del anticuerpo. Por otra parte, podría ser que el anticuerpo de referencia sea una molécula que reconozca a PY pero preferentemente al grupo fosfato, con lo que se puede explicar que este anticuerpo se una a PT y PS más que a ACM₂.

VIII. 2.2. Detección de proteínas fosforiladas en tirosina mediante Western-Blot.

Siendo el método de ELISA más sensible que el Western-Blot, existía la posibilidad de que no se detectara el antígeno por el segundo método. Los resultados de detección de fosfotirosina mediante Dot-Blot demostraron que ACM₂ reconoce al antígeno, y como el Dot-Blot es una técnica similar al Western-Blot, sólo faltaba entonces comprobar que el anticuerpo reconociera a PY por esta técnica. Previamente se establecieron las condiciones

óptimas y la concentración de PY20 necesaria para una buena detección de proteínas fosforiladas en tirosina, por lo que la menor intensidad de las bandas detectadas por ACM₂ (Figura 18) puede explicarse de distintas maneras. Por un lado, el sobrenadante de ACM₂ tiene una concentración de 3.32×10^{-10} M (dilución 1:2) mientras que la del PY20 es de 6.24×10^{-9} M, por lo que aun cuando todo el anticuerpo ACM₂ se uniera al antígeno, quedarían determinantes antigenicos libres, que en el caso del PY20 estarían siendo reconocidos. Tomando en cuenta los resultados de afinidad, otra explicación menos probable es que siendo ACM₂ menos afin, se una en menor cantidad al antígeno. Esta segunda explicación resulta menos probable ya que hay gran diferencia en la intensidad de las bandas (Figura 18) y no así entre los valores calculados de K_a (Tabla 6)

Se utilizaron dos metodos para revelar los resultados de este ensayo, en el primero se empleó fosfatasa alcalina y en el segundo quimioluminencia, en ambos casos se obtuvieron resultados similares, sin embargo se eligió el metodo de revelado mediante quimioluminencia por su mayor sensibilidad, ya que permitiría detectar proteínas celulares (poco concentradas) que con el otro metodo pasarían inadvertidas

VIII. 2.3. Reconocimiento de proteínas celulares fosforiladas en tirosina por el anticuerpo monoclonal.

La fosforilación de proteínas en residuos de tirosina tiene un papel central en la transducción de señales a través de los FcγR's. Debido a lo anterior, nos interesaba que el anticuerpo producido (ACM₂) fuera capaz de detectar residuos de tirosina fosforilados en proteínas celulares

El pervanadato de sodio es un inhibidor de fosfatasa, específicamente de fosfatasa de fosfotirosina (Leis y Kaplan, 1982, Swarup y col., 1982). Las fosfatasa son la contraparte bioquímica de las cinasa en la regulación del estado de fosforilación de las proteínas celulares, por lo que al inhibirlas ya no existe una regulación del estado de fosforilación, con lo que se favorece que diversas proteínas de células tratadas con este

agente esten en su estado fosforilado En un inmunoblot previo al de la Figura 19 (datos no mostrados), observamos gran cantidad de bandas correspondientes a células tratadas, pero ninguna banda en células no tratadas y reveladas con PY20, en cambio, observamos practicamente las mismas bandas para el control de segundo anticuerpo y para células tratadas y no tratadas reveladas con ACM₂ (aunque se observan menos bandas que en las células tratadas y reveladas con PY20) Cabe hacer notar que el tiempo de exposición (revelado por quimioluminiscencia) para revelar con PY20 fue de 15'' mientras que para ACM₂ y segundo anticuerpo fue de 30' Es posible que PY20 sea poco específico y detecte a los tres fosfohidroxiaminoácidos (como se muestra en los resultados de ELISA), sin embargo ninguno de los dos anticuerpos fue capaz de detectar a PT y PS en inmunoblot (datos no mostrados) Quedan ahora dos posibilidades para explicar las diferencias en el bandeado dado por ambos anticuerpos, si se piensa en afinidad, los resultados podrian indicar que PY20 es mas afin y tal vez esa sea la explicacion, sin embargo las diferencias en las constantes de afinidad calculadas no son tan grandes Otra posibilidad es explicar los resultados anteriores mediante las diferencias de concentracion entre los anticuerpos empleados, es decir, el PY20 se usa en inmunoblot casi 19 veces más concentrado que ACM₂ presente en el sobrenadante

En la Figura 19 se muestra un inmunoblot anti-fosfotirosina en el que se utilizó líquido de ascitis en lugar de sobrenadante de ACM₂, para revelar con una mayor concentración de anticuerpo Este resultado nos indica que lo observado anteriormente se debió a diferencias de concentración entre los anticuerpos

Observamos un patrón de fosforilacion muy similar con los dos anticuerpos en los carriles de células tratadas con pervanadato, y en los carriles de células sin tratar, aparecen unas bandas (bandas de aprox. 55, 22, 20 KDa y otras, no muy claras entre 20-30 KDa) que también se observan en el carril del control del segundo anticuerpo. Este control tiene células tratadas reveladas únicamente con segundo anticuerpo, por lo que concluimos que las bandas en los carriles de células sin tratamiento se deben a un reconocimiento inespecifico del segundo anticuerpo De esto se desprende que todas las demás bandas que se observan en los carriles de células tratadas son proteínas fosforiladas en tirosina

IX. CONCLUSIONES.

Se produjo un anticuerpo monoclonal murino de isotipo IgG1, específico para fosfotirosina el cual podrá ser utilizado de manera equivalente al anticuerpo comercial, para investigar proteínas fosforiladas involucradas en las distintas vías de señalización, con la ventaja de tenerlo más disponible y a un menor costo. Las características de ACM₂ son las siguientes

- El anticuerpo producido demostró ser capaz de reconocer proteínas fosforiladas en tirosina tanto en ensayos de ELISA como en blots, aún cuando se usó a concentraciones más bajas que PY20
- El anticuerpo tiene una menor afinidad que el comercial pero una mayor especificidad

X. PERSPECTIVAS.

La producción de anticuerpos monoclonales anti-fosfotirosina tiene como objetivo el conocimiento más profundo de las vías de transducción de señales en las células. Con ellos se pretende averiguar que proteínas fosforiladas en tirosina (cadenas de los receptores, cinasas, fosfatasas, y sustratos de las mismas) integran el complejo de activación luego de la agregación de los diferentes FcγR, específicamente FcγRI y FcγRII de células monocíticas.

XI. APENDICE.

I. Reactivos.

NOMBRE	MARCA	NOMBRE	MARCA
Acido bórico	Baker	Hepes	Sigma
Acetamida	Bio Rad	Hipoxantina	Sigma
Adyuvante de Freund	Gibco	HCl	Merck
Alanina	Sigma	KI.H	Sigma
Aminoácidos no esenciales	Gibco	Lo. he. decremada	Camtton
Aminopterina	Sigma	Leupeptina	Sigma
Aprotina	Sigma	Pesos moleculares (ladder)	Gibco
R-Adzguanina	Sigma	Medio D-MEM	Gibco
Azida de sodio	Sigma	Mercaptotanol	Research
Azul de bromofenol	Bio rad	Metanol	Merck
BCIP/NBT	Sigma	NaHCO ₃	Merck
Bis-Acrlamida	Bio rad	NaOH	Merck
BSA	Sigma	p-Nitrofenilfosfato	Sigma
Carbonato de sodio	Merck	Nitrocelulosa	Bio rad
Ciprovina	Bayer	Oxoxaradato de sodio	Sigma
Cloruro de magnesio	Baker	PEG	Sera
Cloruro de sodio	Baker	Penicilina G	Gibco
Cloruro de calcio	Baker	Pepstatina	Sigma
Azul de Coomassie	Research Organics	Persulfato	Bio rad
Dietanolamina	Sigma	Piruvato	Gibco
DMSO	Merck	PMSF	Sigma
ECL (substrato)	Pierce	Ponceau	Sigma
EDAC	Sigma	Protgina G	Gibco
EDTA	Gibco	Prostat	Sigma
Estreptomicina	Sigma	SDS	Bio rad
Fosfofenina	Sigma	Suero Fetal Bovino	Gibco
Fosfotirosina	Sigma	TF-MED	Bio rad
Fosfotreonina	Sigma	Timidina	Sigma
Fluoruro de sodio	Sigma	Trizma base	Sigma
Glicerol	Sigma	Triton X-100	Sigma
Glicina	Sigma	Tween 20	Sigma
Glucosa	Sigma		
Glutamina	Sigma		

Anticuerpos

Nombre	Marca
Anti-Ig de cabra acoplado a fosfatasa alcalina (de conejo)	Sigma
Anti-Fc de IgG de ratón acoplado a peroxidasa (de cabra)	Sigma
Anti-fosfotirosina (PY20) (de ratón)	St Cruz y Transduction
Anti-isotipo (de cabra)	Sigma
Anti-cadena gamma de IgG de ratón acoplado a FA (de ratón)	Zymed

2. Preparación de soluciones.

-Medio de cultivo D-MEM:

Disolver el contenido de un sobre en agua desionizada, agregar y disolver 3.7g de NaHCO₃. Ajustar el pH a 7.1 y aforar a 1000 ml. Esterilizar por filtración y guardar protegido de la luz a temperatura ambiente como una prueba de esterilidad

-Solución Stock de glutamina (100X):

L-glutamina 200 mM 2 922 g
Disolver en PBS a 37°C y aforar a 100 mL. Esterilizar por filtración y guardar a -20°C

-Solución Stock de antibióticos (100X):

Estreptomicina 1 mg/ml 100 mg
Penicilina-G 100000 U/ml. 598.8 mg
Disolver en PBS y aforar a 100 mL. Esterilizar por filtración y guardar a -20°C.

-Medio Mieloma (MM):

Suero Fetal Bovino (SFB) al 10 % 50 mL
Antibióticos 100X 5 mL
Glutamina 100X 5 mL
Aminoácidos no esenciales 100X 5 mL
Piruvato 100X 5 mL
Aforar a 500 mL con Medio D-MEM. Guardar a 4°C.

-Solución Stock de 8-Azaguanina (100X):

8-Azaguanina 20 mg
Disolver en agua desionizada y aforar a 100 ml. Esterilizar por filtración. Guardar a -20°C, protegido de la luz

-Medio de Mieloma con Azaguanina:

8-Azaguanina 100X 2.5 mL
Medio Mieloma 247.5 mL

-Medio de Fusión (MF):

Antibióticos 100X 5 mL
Glutamina 100X 5 mL
Aforar a 500 mL con medio D-MEM. Guardar a 4°C.

-Solución Stock de HT (100X):

Hipoxantina 136 mg
Timidina 39 mg
Disolver en agua desionizada a 70-80°C y aforar a 100 mL. Esterilizar por filtración.
Guardar a -20°C, protegido de la luz

-Solución Stock de Aminopterina (100X):

Aminopterina 1.8 mg
Disolver en agua desionizada, agregar unas gotas de NaOH 2 M y aforar a 100 mL con agua desionizada. Esterilizar por filtración. Guardar a -20°C

-Medio HAT:

Suero Fetal Bovino al 20 % 100 mL
Antibióticos 100X 5 mL
Glutamina 100 X 5 mL
aminoácidos no esenciales 100X 5 mL
Piruvato 100X 5 mL
HT 100X 5 mL
A 100X 5 mL
Aforar a 500 mL con medio D-MEM. Guardar a 4°C.

-Medio HT:

Suero Fetal Bovino 20 % (GIBCO) 100 ml
Antibióticos 100X 5 ml
Glutamina 100 X 5 ml
aa no esenciales 100X 5 ml
Piruvato 100X 5 ml
HT 100X 5 ml
Aforar a 500 ml con medio D-MEM. Guardar a 4°C.

-Medio D-MEM complementado:

Suero Fetal Bovino al 10 % (GIBCO) 50 mL
Antibióticos 100X 5 mL
Glutamina 100 X 5 mL
aminoácidos no esenciales 100X 5 mL
Piruvato 100X 5 mL
Aforar a 500 mL con Medio D-MEM. Guardar a 4°C.

-Amortiguador de dietanolamina (para Fosfatasa Alcalina):

Dietanolamina 0.5 M	50 mL.
Cloruro de magnesio 0.25 mM	51 mg.
Azida de sodio 3 mM	0.2 g.

Disolver en agua bidestilada, ajustar el pH a 9.8 y aforar a 500 mL.

-Amortiguador de carbonatos:

Carbonato de sodio 50 mM Na ₂ CO ₃	0.53 g.
--	---------

Disolver en agua bidestilada, ajustar el pH a 9.0 y aforar a 100 mL.

-Amortiguador TBS 20x:

Trizma® base 0.2 M	12.11 g.
Cloruro de sodio 3 M	87.66 g.

Disolver en agua bidestilada, ajustar a pH 7.5 y aforar a 500 mL.

-Amortiguador PBS 20x:

NaH ₂ PO ₄ H ₂ O	7.2 g
Na ₂ HPO ₄ 12H ₂ O	55.4 g
NaCl	175 g

Disolver en agua bidestilada, ajustar a pH 7.5 y aforar a 500 mL.

-Amortiguador TBS 1X-BSA 3 %:

TBS 20X	5 mL
BSA 3 %	3 g

Disolver la BSA en agua bidestilada, agregar el TBS y aforar a 100 mL.

-Amortiguador TBS 1X-Tween 0.1 %:

TBS 20X	50 mL
Tween 20 al 0.1 %	1 mL

Aforar a 1000 mL con agua bidestilada.

-Amortiguador TBS 1X-Tween 0.01 %:

TBS 20X	50 mL
Tween 20 al 0.01 %	0.1 mL

Aforar a 1000 mL con agua bidestilada.

-Amortiguador de boratos:

Acido bórico 0.1 M 61.844 g
Disolver en agua bidestilada y aforar a 1 L. Ajustar el pH a 8.8.

-Solución de PEG al 41.6 %:

Polietilenglicol (PEG) 1550 1.6 g
Medio de Fusión 2.4 mL
Se disuelve en baño de agua a 60°C y se esteriliza por filtración.

-Solución "A":

Trizma® base 2 M 24.22 g
Disolver en agua bidestilada, ajustar el pH a 8.2 y aforar a 200 mL.

-Solución "B":

Glicina 0.2 M 7.5 g
Disolver en agua bidestilada, ajustar el pH a 2.8 y aforar a 500 mL.

-Solución "C":

Trizma® base 0.1 M 12.11 g
Cloruro de sodio 0.2 M 11.7 g
Disolver en agua bidestilada, ajustar el pH 8.2 y aforar a 1000 mL.

-Sustrato soluble de Fosfatasa Alcalina:

p-nitrofenilfosfato 1 tableta
Disolver y aforar a 5 mL con amortiguador de FA. Proteger de la luz. Usar al momento (no más de 1 hora después de preparado).

-Amortiguador de Lisis (con inhibidores):

Triton 1% 1 mL
Glicerol 5% 5 mL
Trizma 10 mM 0.1211 g
NaCl 150 mM 0.8766 g
Ajustar pH a 7.6 y aforar a 100 mL con agua bidestilada.

Los inhibidores se agregan en el momento:

Leupeptina 100X 10 µL
Pepstatina 100X 10 µL
Aprotinina 100X 10 µL
EDTA 100X 10 µL

PMSF 100X	10 μ L
Ortovanadato de sodio 100X	10 μ L
NaF 30X	30 μ L

Llevar a 1 mL con amortiguador de lisis.

- Gel mediano SDS-PAGE al 10%:

Gel inferior		Gel Superior
3 975 mL	Acrilamida	650 μ L
5 025 mL	Agua bidest	3 06 mL
3 mL	Buffer (inferior o superior)	1 25 mL
20 μ L	Persulfato	20 μ L
10 μ L	TEMED	10 μ L

- Amortiguador de corrida:

Trizma	1 5 g
SDS	0 5 g
Glicina	7 2 g

Aforar a 500 mL con agua bidestilada Guardar a 4°C

- Amortiguador de transferencia en cámara húmeda:

Glicina	2 97 g
Trizma	5 82 g
SDS	0 037 g

Aforar a 800 mL con agua bidest Agregar unas horas antes 200 mL de metanol y guardar a 4°C

- Amortiguador de muestra 1X (Laemmli):

SDS 2 %
 Glicerol 10 %
 DTT 100 mM
 Trizma base 60 mM
 Azul de bromofenol 0 01 %
 Ajustar pH a 6 8

-Amortiguador de Lavado:

TBS 20X	50 mL
Tween 0 05 %	0 5 mL

Aforar a 1L con agua bidestilada.

-Solución de bloqueo (1):

TBS 1X	20 mL
BSA 3%	0.6 g

Disolver la BSA y aforar a 20 mL con TBS 1X.

-Solución de bloqueo (2):

TBS-tween 0.05 %	20 mL
BSA 1%	0.2 g
Leche 3%	0.6 g

Disolver la BSA, la leche y aforar a 20 mL con TBS 1X.

-Solución de bloqueo (3):

BSA 1%	0.2 g
TBS-Tween 0.05%	20 mL

-Amortiguador de anticuerpo:

TBS 1X	50 mL
Tween 0.05%	0.025 mL
BSA 1%	0.5 mL

XII. BIBLIOGRAFIA.

- Abbas, A K., Lichtman, A H. and Pober, J.S. (1994) "Cellular and Molecular Immunology". 2ed W.B Saunders Company USA
- Abbot, C and Povey, S. (1995). "Somatic cell hibrids" IRL Press, Oxford.
- Abelson, J N and Simon, M I (1991) Protein Phosphorylation *Methods in Enzymology* 201, 101.
- Adamczewski, M ,Numero, R P ,Kortezki, G A and Kinet, J.P (1995). Regulation by CD45 of the tyrosinephosphorylation of high affinity IgE receptor β and γ chains *J.Immunol* 154, 3047
- Addison, G M and Hales, C N (1971) En Kirkham K E Kinks, W.M. (ed) "Radioimmunoassay Methods" Edinburgh: Churchill, Livingstone.
- Bartel, A and Campbell, D (1959) Some immunochemical differences between associated and dissociated hemocyanin *Arch. Biochem. Biophys* 82, 2332.
- Birch, J R and Lennox, E S (eds) (1995) "Monoclonal antibodies: principles and applications" Wiley-Liss, New York.
- Brack, C, Hirama, M , Lenhard, S R and Tonegawa, S (1978) A complete immunoglobulin gene is created by somatic recombination. *Cell*, 15, 1.
- Campbell, A.M. (1991) "Monoclonal antibody and immunosensor technology". Elsevier Science Publisher, Amsterdam
- Campbell, K., Hager, E., Friedrich, J and Cambier, J (1991) IgM antigen receptor complex contains phosphoprotein products of B29 and mb-1 genes. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 88, 2745.
- Coffino, P., Bauml, R., Laskov, R. and Scharff, M. (1972). Cloning of mouse myeloma cells and detection of rare variants. *J. Cell. Physiol.* 79, 429.
- Cohen, G B, Ren, R. and Baltimore, D (1995). Modular binding domains in signal transduction proteins. *Cell*, 80, 237.

- Cohen, S. and Milstein, C. (1967). Structure and biologic properties of immunoglobulins. *Adv. Immunol.* 7, 1.
- Coller, H.A. and Coller, B.S. (1983). Statistical analysis of repetitive subcloning by the limiting dilution technique with a view toward ensuring hybridoma monoclonality. *Hybridoma.* 2, 91.
- Colman, P.M. (1991). Antigen-antigen receptor interactions. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 1, 232.
- Cooper, J.A. et al (1983). Detection and quantification of phosphotyrosine in proteins. *Methods Enzymol.* 99, 387.
- Davies, D.R. and Chacko, S. (1993). Antibody structure. *Acc. Chem. Res.* 26, 421.
- Eck, M.J., Shoelson, S.E. and Harrison, S.C. (1993). Recognition of a high-affinity phosphotyrosyl peptide by the Src homology-2 domain of p56^{lck}. *Nature* 362, 87.
- Edmunson, A.B., Ely, K.R., Abol, E.E., Schiifer, M. and Panagiotopoulos, N. (1975). Rotational allomerism and divergent evolution of domains in immunoglobulin light chains. *Biochemistry*: 14, 3953.
- Fahey, J.L. (1966). Antibodies and immunoglobulins. *JAMA* 194, 183.
- Flaswinkel, H., Barner, M. and Reth, M. (1995). The tyrosine activation motif as a target of protein tyrosine Kinases and SH2 domains. *Seminars in Immunol.* 7, 21.
- Franklin, S. (1964). Immune globulins: the structure and function and some techniques for their isolation. *Proc. Allergy.* 8, 58.
- Friguet, B., Chaffotte, A.F., Djavadi-Ohanian, L. and Goldberg, M.E. (1985). Measurements of the true affinity constant in solution of antigen-antibody complexes by enzyme-linked immunosorbent assay. *J. Immunol. Methods.* 77, 305.

- Galfré, G., G. Howe, S.C. Milstein, C. Butcher, G.W. and Howard, J.C. (1977). Antibodies to major histocompatibility antigens produced by hybrid cell lines. *Nature*. **266**, 550
- Galfré, G. and Milstein, C. (1981) Preparation of monoclonal antibodies: strategies and procedures *Methods Enzymol* **73**, 1
- Glenney, J.R., Zokas, L. and Kamps, M.P. (1988) Monoclonal antibodies to phosphotyrosine. *J. Immunol. Methods* **109**, 277
- Goding, J.W. (1993) "Monoclonal antibodies: principles and practice" Academic Press Limited London
- Goding, J.W. (1996) "Monoclonal antibodies: Principle and practice". 3ed. Academic Press Limited London
- Heldin, C. (1995). Dimerization of cell surface receptors in signal transduction *Cell* **80**, 213.
- Hewish, D.R. and Werkmeister, J.W. (1989) The use of an electroporation apparatus for the production of murine hybridomas. *J. Immunol. Methods*. **120**, 285.
- Hoogenraad, N., Helman, T. and Hoogenraad, J. (1983) The effect of pre-injection of mice with pristane on ascitis tumour formation and monoclonal antibody production. *J. Immunol. Methods*. **61**, 317
- Hulett, M.D. and Hogarth, M. (1994) Molecular basis of Fc receptor function. *Adv. in Immunol.* **57**, 1.
- Irving, B. and Weiss, A. (1991) The cytoplasmic domain of the T cell receptor ζ chain is sufficient to couple to receptor associated signal transduction pathways. *Cell*. **64**, 891.
- Jouvin, M.J., Adamczewski, M., Numero, R., Letourneur, O., Vallé, A. and Kinet, J.P. (1994). Differential control of the tyrosine kinases Lyn and Syk by the two signaling chains of the high affinity immunoglobulin E receptor. *J. Biol. Chem.* **268** (8), 5918.

- Kataoka, T., Kawakami, T., Takahashi, N. and Honjo, T. (1980) Rearrangement of immunoglobulin gamma 1 chain gene and mechanism for heavy-chain class switch *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **77**, 919
- Kauffman, S.H., Erwing, C.M. and Shaper, J. (1983) The erasable Western-blot *Analytical Biochemistry* **161**, 89.
- Keegan, A.D. and Paul, W.E. (1992) Multichain immune recognition receptors: similarities in structure and signaling pathways *Immunol. today.* **13**, 63.
- Kim, S., David, M., Sinn, E., Patten, P. and Hood, L. (1981) Antibody diversity: somatic hypermutation of rearranged BH genes *Cell* **27**, 573
- Kohler, G. and Milstein, C. (1975) Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity *Nature.* **256**, 495
- Kohler, G. and Milstein, C. (1976) Derivation of specific antibody-producing tissue culture and tumor lines by cell fusion *Eur. J. Immunol.* **6**, 511
- Kohler, G., Howe, S.C. and Milstein, C. (1976) Fusion between immunoglobulin-secreting and non-secreting myeloma cell lines *Eur. J. Immunol.* **6**, 292.
- Lefkowitz, I. and Waldmann, H. (1979) "Limiting Dilution Analysis of Cells in the Immune System" Cambridge University Press, Cambridge
- Leis, J.F. y Kaplan, N.O. (1982) An acid phosphatase in the plasma membranes of human astrocytoma showing marked specificity toward phosphotyrosine protein *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **79**, 6507
- Littlefield, J.W. (1964) Selection of hybrids from matings of fibroblasts in vitro and their presumed recombinants *Science.* **145**, 709
- Lotscher, H.-R., deJong, C. and Capaldi, R. (1984) Inhibition of the adenosinetriphosphatase activity of *Escherichia coli* F1 by the water-soluble carbodiimide 1-ethyl-3-(3-(dimethylamino)propyl) carbodiimide is due to modification of several carboxyls in the β subunit. *Biochem.* **23** (18), 4134.
- McGadey, J. (1970) A tetrazolium method for non-specific alkaline phosphatase. *Histochemie* **23**, 180

- Metcalfe, D. (1977). "Hematopoietic Colonies. In vitro cloning of normal and leukemic cells", *Recent Results in Cancer Research*. Berlin. 61.
- Metzger, J.H. (1992). Transmembrane signaling: the joy of aggregation. *J. Immunol.* 149, 1447.
- Ortega, E (1995). How does multichain immune recognition receptors signal? A structural hypothesis. *Mol. Immunol.* 32, 941.
- Padlan, E. (1994). Anatomy of the antibody molecule. *Mol. Immunol.* 31, 169.
- Paolini, R., Numero, R. and Kinet, J (1994) Kinase activation through the high-affinity receptor for immunoglobulin E. *Immunomethods.* 4, 35.
- Paolini, R., Renar, V., Viver, E., Ochiai, K., Jouvin, M.H., Malissen, B. and Kinet, J.P. (1995). Different roles for the Fc epsilon gamma chain as a function of the receptor context. *J. Exp. Med.* 181, 247.
- Pleiman, C.M., Clark, M., Timson, I., Winitz, S., Cogeshall, K., Johnson, G., Shaw, A.S. and Cambier, J.C (1993) Mapping of the sites on the Src family protein tyrosine kinases p55^{lck}, p59^{lyn} and p56^{lck} which interact with the effector molecules Phospholipase C γ 2, Microtubule associated protein kinase, GTPase activated protein and phosphatidylinositol 3 kinase. *Mol. Cell Biol.* 13 (9), 5877.
- Pontecorvo, G (1976) Production of indefinitely multiplying mammalian somatic cells hybrids by polyethylene glycol (PEG) treatment. *Somatic Cell Genet.* 1, 397.
- Ravetch, J. and Kinet, J. (1991) Fc receptors. *Ann. Rev. Immunol.* 9, 457.
- Reth, M. (1989). Antigen receptor tail clue. *Nature* 338, 383.
- Ringertz, N.R. and Savage, R.E. (1976) "Cell hybrids" Academic Press, New York.
- Roitt, I. (1994) "Essential Immunology" 8ed Blackwell Scientific Publications, London.
- Romeo, C., Amiot, M. and Seed, B. (1992). Sequence requirements for induction of cytotoxicity by the T cell antigen/Fc receptor ζ chain. *Cell.* 68, 889.

- Santana , C.,Noris , G., Espinoza, B and Ortega, E. (1996). Protein tyrosine phosphorylation in leukocyte activation through receptors for IgG *J. Leuk. Biol.* **60**, 433.
- Scharenberg , A.M. and Kinet. J.P (1995) Early events in mast cell signal transduction. *Chem Immunol.* **61**, 72
- Sell, S. (1987) "Immunology, Immunopathology, and Immunity". New York: Elsevier, Section 8 1-8 8
- Sell, S., Berkower, I y Max, E.E (1996) "Immunology, Immunopathology & Immunity". 5ed Appleton & Lange London
- Snyder, S.L., Wilson, I and Bauer, W (1972) The sub-unit of *Escherichia coli* alkaline phosphatase in IM tris *Biochem. Biophys. Acta* **258**, 178.
- Songyang ,Z., Shoelson ,S E , Chaudhuri, M , Gish, G ,Pawson, T.,Haser, W.G ,King , F.,Robrts , T.,Ratnofsky , S ,Lechleider ,R J ,Neel ,B G ,Birge , R.B ,Fajardo, J.E. , Chou , M.M.,Hanafusa , H ,Schaffhausen ,B and Cantley , L.C (1993) SH2 domains recognize specific phosphopeptide sequences *Cell* **72**, 767
- Spiegelberg, H L. (1974) Biological activities of immunoglobulins of different classes and subclasses *Adv. Immunol.* **19**, 259
- Swarup, G., Speeg, K V , Cohen, S and Garbers, D L. (1982) Phosphotyrosil-protein phosphatase of TCRC-2 cells *J. Biol. Chem* **257**, 7298
- Walker, G R., Feather, K D , Davis, P D and Hines, K K (1995) Supersignal CL-HRP A new enhanced chemiluminiscent substrate for the development of the horseradish peroxidase label in Western blotting applications *Journal of NIH research* **7**, 76
- Wilson, I A and Stanfield, R L. (1993) Antibody-antigen interactions. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **3**, 113
- Yamashita , T., Mao, S Y and Metzger , H (1994) Agregation of the high affinity IgE receptor and enhanced activity of p53/p56^{lck} protein tyrosine kinase. *Proc. Natl. Acad. Sc. USA.* **91**, 11251.

Yalow, R.S., Berson, S.A. (1960) Immunoassay of endogenous plasma insulin in man.
J. Clin Invest. 39, 1157.