



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

BIOTECNOLOGIA

LAS INMUNOGLOBULINAS DE LA
OBTENCION A LA APLICACION

TRABAJO ESCRITO VIA CURSOS
DE EDUCACION CONTINUA

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
QUIMICA FARMACEUTICA BIOLOGA

P R E S E N T A

GUADALUPE MONCADA CLAUDIO



MEXICO, D. F.



EXAMENES PROFESIONALES
FACULTAD DE QUIMICA

2004



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. RAÚL AGUILAR CABALLERO

Vocal Prof. JOSÉ LUIS DOMÍNGUEZ TORIX

Secretario Prof. ENRIQUE GÓMEZ MORALES



1er. Suplente Prof. AMALIA GUADALUPE BRAVO

LINDORO

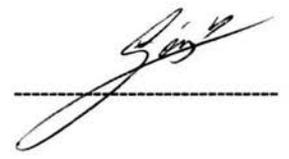
2do. Suplente Prof. ZOILA NIETO VILLALOBOS

Sitio donde se desarrollo el tema:

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Nombre completo y firma del asesor del tema :

Dr. ENRIQUE GÓMEZ MORALES



Nombre completo y firma del sustentante:

GUADALUPE MONCADA CLAUDIO



A mi padre con gratitud, respeto y cariño, gracias
por el apoyo recibido durante mi formación.

A la memoria de mi madre, por el amor
incondicional que me dio y por haber sembrado
en mí su entusiasmo y amor a la vida.

A la memoria de mi hermana Margarita que fue
un ejemplo a seguir con respeto y cariño.

A mis hermanos: Andrea, Ma. Isabel, Ma. Teresa
y José Luis con cariño.

A la memoria del maestro Guillermo
González Vargas por su tolerancia y
gran amistad.

A la memoria de la Sra. Inés Vargas
por su influencia para lograr mi objetivo.

A mis amigos por su paciencia y apoyo
incondicional.

ÍNDICE

RESUMEN	1
OBJETIVO	2
IMPORTANCIA	2
CONTRIBUCIÓN	2
INTRODUCCIÓN	3
GENERALIDADES	4
HISTORIA DE LAS INMUNOGLOBINAS	6
ESTRUCTURA DE LAS INMUNOGLOBINAS	7
FIGURA DE LAS INMUNOGLOBINAS	8
CARACTERÍSTICAS GENERALES DE LOS ANTICUERPOS	9
REACCIÓN ANTIGENO ANTICUERPO	10
BIOTECNOLOGÍA DE LOS ANTICUERPOS MONOCLONALES	11
VENTAJAS E INCONVENIENTES DE LOS ANTICUERPOS MONOCLONALES	16
APLICACIÓN DE ANTICUERPOS MONOCLONALES	18
COMENTARIOS	21
CONCLUSIONES	21
BIBLIOGRAFÍA	22

RESUMEN DEL PROYECTO

Cuando una sustancia extraña (antígeno) al cuerpo de un vertebrado penetra o se inyecta, éste tiene la capacidad de responder a ésta agresión por medio de la producción de inmunoglobulinas o anticuerpos a la cual se le conoce como respuesta inmune.

La combinación del antígeno-anticuerpo desencadena ciertos procesos de neutralización y eliminación de la sustancia extraña.

Existen dos tipos principales de linfocitos: T y B. Los linfocitos B y sus descendientes directos las células plasmáticas son responsables de la producción de inmunoglobulinas en el organismo del hombre y de los animales superiores. Existen más de un millón de estirpes de linfocitos B, cada uno de los cuales producen anticuerpos dirigidos, sólo contra uno de los varios determinantes que puede poseer un antígeno por lo que los anticuerpos obtenidos a partir de inmunización de animales son verdaderas mezclas heterogéneas de anticuerpos.

Las inmunoglobulinas han constituido una herramienta importante en la biotecnología, ya que se ha aprovechado una de sus características, como es la especificidad para identificar y marcar determinadas células o moléculas de una mezcla.

Por otro lado la biotecnología ha resuelto obstáculos que se tenían en la producción de antisueros convencionales. A partir de la aparición de la publicación de G. Koheir & C. Milstein (1975), en la revista Nature, en la que estos autores reportaron la inmortalización de las células linfoides B de ratón, secretoras de inmunoglobulinas de especificidad determinada mediante su hibridación con células de mieloma de ratón. La posibilidad de clonar estos hibridomas, es decir, producirlos in vitro partiendo de una sola célula, permitía obtener cantidades ilimitadas de anticuerpos (inmunoglobulinas) monovalentes, secretados por cada estirpe de híbridos: Con los anticuerpos monoclonales, se abrió así un amplio campo en el terreno de la investigación biomédica, contribuyendo al estudio de la ontogenia de las células del sistema celular inmune y de la patogenia de muchas enfermedades, en las que está implicado el sistema inmune, e incluso, para el tratamiento de estas entidades en las que un grupo de células pueden ser responsables de ciertas lesiones.

En estos momentos hay cientos de ensayos clínicos con anticuerpos monoclonales para el tratamiento de diversas enfermedades, tales como el cancer.

Los anticuerpos monoclonales son utilizados con fines terapéuticos (antiinfecciosos, inmunosupresores, anticancerosos, etc) y de diagnóstico desde 1981 con los métodos de ensayo de inmunoabsorción unidos a una enzima (ELISA) y radioinmunoensayo (RIA), habiendo hoy en día más de cien pruebas específicas de diagnóstico "in vitro" inmunoquímico para microorganismos, hormonas y toxinas, medicamentos, drogas, pesticidas y células tumorales.

Con ésta biotecnología también se han encontrado otras alternativas de obtención de inmunoglobulinas, como es la de las plantas transgénicas que producen eficientemente proteínas heterólogas de plantas, bacterias, hongos o de origen animal.

Sin embargo, no conviene olvidar que esta tecnología presenta algunas limitaciones eventualmente importantes. En este sentido, cabe indicar que se requieren niveles notables de tecnología y de especialización profesional, los costos son generalmente muy elevados y el tiempo requerido en el proceso es mayor que el que se requiere para la obtención de anticuerpos policlonales.

BIOTECNOLOGÍA: LAS INMUNOGLOBULINAS DE LA OBTENCIÓN A LA APLICACIÓN

OBJETIVO

Documentar los métodos de producción de inmunoglobulinas y su utilidad en los avances biotecnológicos en los diferentes campos de la investigación.

IMPORTANCIA

La implementación de nuevas técnicas ha permitido diversificar las fuentes de obtención de inmunoglobulinas, logrando optimizar tanto la cantidad como la función (especificidad) de las mismas, estos hallazgos de la investigación biomédica han permitido un amplio conocimiento de las células del sistema inmune, dando como consecuencia producciones más eficientes de estas inmunoglobulinas, además de explorar diversas áreas de aplicación tanto en diagnóstico como en tratamiento de múltiples enfermedades.

CONTRIBUCIÓN

Esta tecnología ha resuelto obstáculos que eran insalvables en la producción de antisueros convencionales, los problemas relativos a la pureza, inmunogenicidad y concentración, de los inmunógenos en la generación de una respuesta adecuada en los animales, pueden ahora ser obviados por la posibilidad real de donar aquellos hibridomas, cuyo parental normal pertenece a la estirpe estimulada por la molécula deseada (2). Por último, como reactivos de laboratorio, los anticuerpos monoclonales no sólo son capaces de reconocer el antígeno deseado, sino que pueden ser seleccionados con otras propiedades de interés como citotoxicidad, capacidad de aglutinación, generación de respuestas biológicas, etc. (2)

INTRODUCCIÓN

El cuerpo humano tiene la capacidad para resistir casi todos los tipos de microorganismos o toxinas, que tienden a lesionar tejidos y órganos, ésta capacidad llamada inmunidad reconoce a los cuerpos extraños y los elimina de forma selectiva. Además es capaz de memorizar durante largos períodos, éstos procesos de reconocimiento y eliminación selectiva. Gran parte de la inmunidad depende, en general de un especial sistema productor de anticuerpos y linfocitos, que atacan y destruyen a los microorganismos específicos o las toxinas. (33)

Existen dos tipos principales de linfocitos: los linfocitos B y los linfocitos T. En algunos aspectos, los linfocitos son las células más importantes del sistema inmune. Los primeros son responsables de la inmunidad humoral es decir, los linfocitos B y sus descendientes directos, que reciben el nombre de células plasmáticas, son las células responsables de la producción de unos componentes del suero de la sangre, denominados inmunoglobulinas. (33)

En el organismo del hombre y de los animales superiores existen más de un millón de estirpes diferentes de linfocitos B, cada una de las cuales produce anticuerpos dirigidos, sólo contra uno de los varios determinantes que puede poseer un antígeno. Si bien entonces la producción de inmunoglobulinas en el organismo es estrictamente monoclonal, los antisueros preparados a partir de la sangre de los animales y que han sido utilizados convencionalmente en la inmunología, son verdaderas mezclas heterogéneas de anticuerpos, dirigidos contra todos los determinantes antigénicos de la molécula con que se inmunizó el animal, además de aquellos derivados de la constante y variada estimulación del sistema inmune por el ambiente. Por tal razón, los antisueros policlonales convencionales son irreproducibles de lote a lote.

Debido a la dificultad de cultivar exitosamente las células B normales, sin la pérdida de sus funciones secretoras (1), la posibilidad de obtener grandes cantidades de anticuerpos de especificidad única, no se hizo realidad hasta que aparecieron los métodos de fusión e hibridación celular entre linfocitos B normales y células tumorales de mieloma. Teniendo en cuenta que cada especie de anticuerpo es fabricada por linfocitos diferentes, la hibridación genera células con ésta misma propiedad y la purificación del anticuerpo sólo está limitada al procedimiento de clonaje. Desde el punto de vista de la inmunología básica, debe ser posible en principio aislar y describir todas las variantes de anticuerpos que un animal, teóricamente, sea capaz de producir. Éste simple principio básico hace de la técnica de hibridomas, una herramienta muy poderosa para abordar un amplio rango de problemas, para así trabajar por largos años en la búsqueda de soluciones tanto diagnósticas como terapéuticas.

GENERALIDADES

El sistema inmune es, en realidad, un sistema doble que entrelaza inmunidad celular e inmunidad humoral. Ambos sistemas son adaptativos y responden con mayor protagonismo de uno u otro, en función de la naturaleza del agente potencialmente agresor. Así, la inmunidad celular es particularmente efectiva frente a hongos, parásitos, infecciones virales intracelulares, células tumorales y tejidos extraños, por ejemplo, procedentes de un trasplante. Por el contrario, la respuesta inmune humoral predomina en las infecciones virales y bacterianas extracelulares.

Todas las células del sistema inmune tienen un origen hematopoyético. Las células sanguíneas inmunes que residen principalmente en el tejido, se originan de una célula madre pluripotencial. Las células madre capaces de autorrenovación y de diferenciación, en células progenitoras comprometidas para un desarrollo especializado, constituyen menos del 0.01% de las células de la médula ósea en individuos inmunológicamente maduros.

Las citoquinas producidas por células del estroma de la médula ósea, influyen sobre la diferenciación de las células madre en dos líneas celulares, ambas capaces de autorrenovación y evolución en varias líneas celulares diferentes. La célula madre linfoide adecuadamente estimulada, da origen a linfocitos T y B, y a grandes linfocitos granulares, descritos como células natural asesinas. (33)

Los linfocitos son las células que están implicadas en ambos sistemas inmunes. Son producidos en la médula ósea y emigran hacia diferentes órganos linfoides. (32)

Existen dos grandes grupos de linfocitos: T y B. Los linfocitos que pasan por el timo reciben la denominación de linfocitos T, y son responsables de la inmunidad celular. Los otros son los linfocitos B, que deben tal calificativo de un órgano linfoide presente en las aves, pero no en los mamíferos, conocido como *Bolsa de Fabricio (bursa de Fabricius)*. Los linfocitos B producen una serie de proteínas, los anticuerpos o inmunoglobulinas, que reaccionan específicamente con los antígenos. A este tipo de inmunidad se le conoce como inmunidad humoral. (31)

El sistema inmune humoral es una auténtica fortaleza que defiende el organismo de cualquier elemento invasivo. Los centinelas o primera línea de defensa de ésta fortaleza, son los macrófagos que circulan de forma permanente por el torrente circulatorio. Cuando detectan presencia de sustancias extrañas o antígenos (inmunógenos), los macrófagos responden fagocitando a dichos antígenos. (33)

Los antígenos son macromoléculas (moléculas de alto peso molecular) con un elevado grado de complejidad estructural. Para que una molécula tenga capacidad antigénica, es preciso que sea ajena al organismo y que tengan un peso molecular

superior a 10,000 daltons. No obstante, existen excepciones, como ocurre en la patogénesis de las llamadas enfermedades autoinmunes y con los haptenos. (33)

Los haptenos son moléculas de peso molecular relativamente bajo, incapaces de estimular por sí mismos la producción de anticuerpos. Sin embargo, son capaces de unirse a moléculas más grandes (transportadoras), confiriéndoles un poder antigénico del que antes carecían. Ejemplo de ello, son diversos medicamentos y pesticidas.

Las células plasmáticas son responsables de la producción y liberación de grandes cantidades de anticuerpos específicos, frente al antígeno en cuestión. Por el contrario, las células de memoria no producen anticuerpos, pero sirven de almacén de memoria antigénica, reteniendo durante mucho tiempo (éstas células tienen una supervivencia muy prolongada) el anticuerpo de superficie. (33)

Sí posteriormente se vuelve a tener contacto con el antígeno anterior, los linfocitos B de memoria, son capaces de montar de forma rápida y eficiente una respuesta potente y persistente. Precisamente, ésta respuesta secundaria es determinante para la obtención de grandes cantidades de anticuerpos y es el motivo por el cual se recomienda realizar una inmunización de "recuerdo" tras una primera inmunización, en los protocolos de generación de anticuerpos. (32)

La unión de los anticuerpos con los antígenos induce una "marca" específica en el agente extraño, permitiendo su destrucción mediante fagocitosis o por activación del sistema del complemento.

HISTORIA DEL ESTUDIO DE LAS INMUNOGLOBULINAS

El conocimiento del sistema inmunológico era limitado, primero se conoció la producción de anticuerpos en respuesta a la infección o a la inmunización. Durante la década de 1930, el inmunólogo Karl Landsteiner demostró la gran especificidad de las reacciones de los anticuerpos. (31)

Los experimentos de Kabat & Tiselius (1939): demostraron que la llamada fracción γ -globulínica de las proteínas del suero, eran las responsables de la actividad del anticuerpo (por eso, a los anticuerpos se les ha denominado durante mucho tiempo como γ -globulinas). (32)

Porter y Edelman (por separado, en los años 50 y 60), realizaron diversos experimentos usando ultracentrifugación para separar las γ -globulinas, obteniendo una fracción que poseía un coeficiente de sedimentación de 7 S, a la que llamaron IgG, con un peso molecular de unos 150,000 Da. Porter sometió la IgG a digestión breve con la enzima papaína, tras de lo cual realizó con los fragmentos resultantes una separación cromatográfica en carboximetil-celulosa, dedujo que cada molécula de IgG había sido escindida por la papaína en dos fragmentos idénticos, capaces de unirse al antígeno (fragmentos Fab) y un fragmento cristalizante (Fc). (32)

Nisonoff realizó experimentos parecidos a los de Porter, pero en lugar de digerir la IgG con papaína, empleó pepsina; del ulterior análisis cromatográfico dedujo que la pepsina había roto cada molécula de IgG en un fragmento capaz de unir Ag pero con doble valencia [fragmento F(ab')₂], y una serie de fragmentos pequeños no cristalizables, procedentes del Fc original. (32)

Edelman sometió la IgG a un tratamiento reductor con mercaptoetanol (que provoca la rotura de los puentes disulfuro), con posterior electroforesis desnaturante de los péptidos resultantes. Sus resultados indicaban que la IgG estaba compuesta de dos tipos de cadenas polipeptídicas, una pesada (cadena H) y otra ligera (cadena L).

Ensamblando todos estos resultados se obtenía el primer modelo de la estructura de una inmunoglobulina: cada molécula de IgG está compuesta de:

- Dos cadenas H, cada una de unos 50,000 Da.
- Dos cadenas L, cada una de unos 25,000 Da.
- Cada cadena L está unida a una cadena H por un puente disulfuro.
- A su vez, las dos cadenas H están unidas entre sí por puentes disulfuro.

ESTRUCTURA GENERAL DE LAS CADENAS DE INMUNOGLOBULINAS

CADENAS L

Cuando se comparan distintas proteínas de Bence-Jones se observa que los 100 a 110 primeros aminoácidos difieren entre unas y otras, mientras que los 100-110 últimos son prácticamente idénticos. Ello permite distinguir dos regiones claramente diferenciables en las cadenas ligeras:

- región carboxi-terminal, constante (región C)
- región amino-terminal, variable (región V)

Además, existen dos posibles versiones de cadenas L, según dos variantes en la región C:

- cadenas kappa (κ)
- cadenas lambda (λ)

En una misma Ig existen dos cadenas kappa o dos cadenas lambda, pero nunca una de cada tipo.

CADENAS H

La cadena pesada posee unos 440 aminoácidos, cada cadena pesada posee una región amino-terminal de 100 a 110 aminoácidos, cuya composición es variable. El resto de la cadena H, muestra en humanos cinco patrones básicos de secuencia, distinguibles entre sí, que configuran cinco tipos de cadenas pesadas según la porción constante. La longitud de ésta porción constante suele ser de 330 aminoácidos, salvo en dos tipos, que poseen 440 aminoácidos.

Cada uno de los tipos de cadena pesada recibe una denominación a base de la letra griega y determinan lo que se denomina clases o isotipos de inmunoglobulinas.

Existen cinco tipos diferentes de anticuerpos o inmunoglobulinas (Ig): IgA, IgD, IgE, IgG e IgM, de las cuales las IgG desarrollan un papel preponderante en la respuesta inmune.

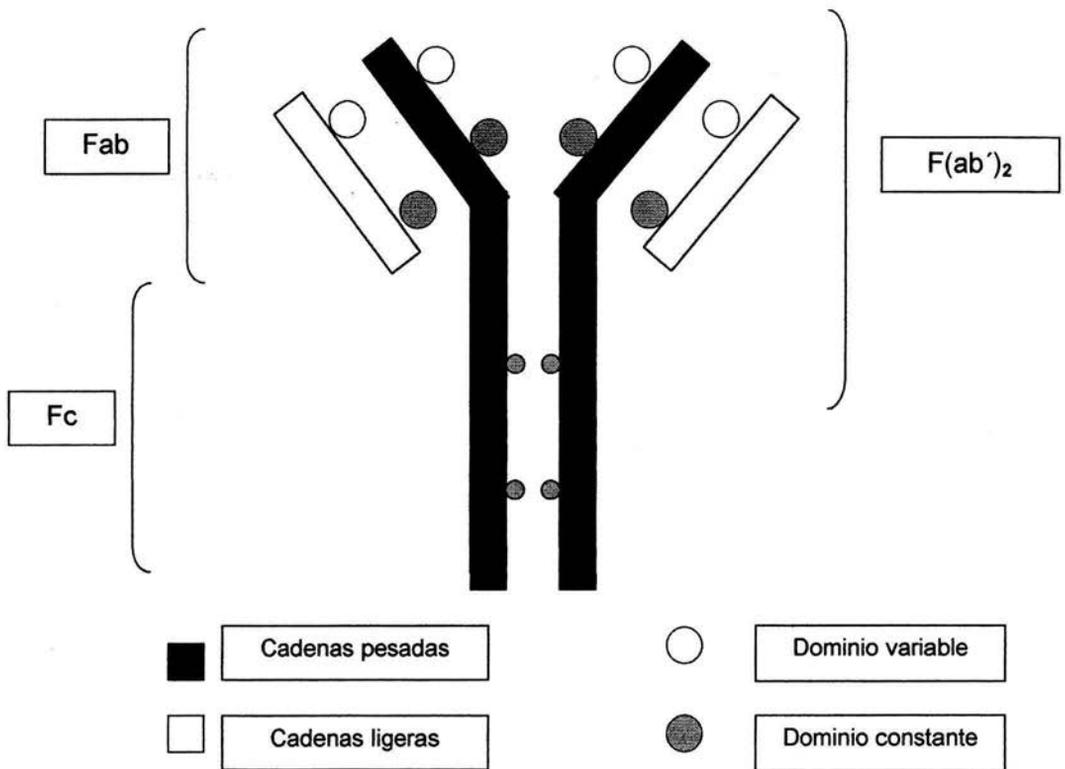


Figura 1

Diagrama que muestra la estructura de una inmunoglobulina. Las cadenas pesadas y ligeras están compuestas de dominios variables y constantes, unidos por puentes disulfuro. (40)

CARACTERÍSTICAS GENERALES DE LOS ANTICUERPOS

Como se ha indicado, el elemento esencial de la inmunidad humoral es la formación de unas proteínas altamente selectivas denominadas anticuerpos o inmunoglobulinas, en respuesta a la presencia de antígenos.

Los tipos de anticuerpos varían en la estructura y en el peso molecular. El tipo más ligero es el de las IgG, con pesos moleculares en torno a 150,000, mientras que las más pesadas son las IgM, con alrededor de 900,000. Las cadenas de los anticuerpos están ligadas por puentes disulfuro (-S-S-), cuyo número y posición varían según los diferentes subtipos. (40)

Los anticuerpos son proteínas y en el caso de las IgG están formadas por dos parejas de cadenas peptídicas, que conjuntamente adoptan una forma similar a una Y. Las cadenas peptídicas de cada pareja son idénticas entre sí, pero difieren en el peso molecular con las cadenas de la otra pareja, reconociéndose de ésta manera cadenas pesadas y ligeras. (40)

En la fracción amino terminal (-NH₂) del anticuerpo se localiza un corto segmento de aminoácidos conocido como región variable. La secuencia específica de aminoácidos de ésta región variable, es diferente para cada anticuerpo y específica para un determinado antígeno. Dentro de cada región variable hay lo que se conoce como región hipervariable, que es la responsable de unirse específicamente al antígeno, como una llave en su correspondiente cerradura. (40)

Por su parte, las fracciones carboxi terminal (-COOH) de las cadenas pesadas y ligeras del anticuerpo, forman lo que se denomina la región constante, y su secuencia de aminoácidos es común con el resto de los anticuerpos de una misma clase.

La digestión de anticuerpos con determinadas enzimas (papaína) produce dos tipos de fragmentos proteicos. Uno de ellos cristaliza de forma espontánea, por lo que recibe el nombre de fragmento cristalizable o Fc, sin apenas capacidad de unión al antígeno. Este fragmento cristalizable se corresponde con la región constante del anticuerpo. El otro fragmento es el de unión al antígeno o Fab (*Fragment antigen-binding*, en inglés).

Los anticuerpos se unen a los antígenos a través de la región hipervariable del anticuerpo, con un pequeño segmento del antígeno denominado determinante antigénico o epítipo, formando así el complejo antígeno-anticuerpo.

En la actualidad la fácil manipulación de los anticuerpos mediante diversas técnicas moleculares, ha permitido mejorar el conocimiento de la organización estructural y funcional de las inmunoglobulinas y, en definitiva, la ingeniería genética ha conducido a la aparición de una enorme biblioteca de nuevas proteínas de gran trascendencia en investigación, diagnóstico y terapéutica.

REACCIÓN ANTÍGENO-ANTICUERPO

Con el fin de desarrollar adecuadamente su papel esencial en la defensa inmune, los anticuerpos deben ser extremadamente versátiles. Continuamente el sistema inmune está detectando la presencia de una amplia variedad de elementos extraños (bacterias, virus, toxinas, etc) y como consecuencia de ello la diversidad de anticuerpos debe ser enorme, con el fin de contrarrestar una amplia gama de posibilidades desconocidas e inesperadas. A través de un complejo proceso de montaje, se estima que los linfocitos B son capaces de producir entre 100 millones y 10,000 millones de anticuerpos diferentes. (32)

La reacción entre el antígeno y su anticuerpo se caracteriza esencialmente por su especificidad, esto se debe a una potente capacidad de reconocimiento a escala molecular.

Si, por ejemplo, un ratón recibe albúmina procedente de una vaca, los linfocitos del ratón producirán anticuerpos frente a la albúmina de vaca, que reaccionarán sólo frente a este tipo de albúmina o frente a otro muy similar. Este proceso es denominado respuesta policlonal, debido a la existencia de diferentes grupos o clones de linfocitos B del sistema inmune y también a la compleja naturaleza de los antígenos. El término policlonal deriva del griego *polys* (muchos) y *klon* (brote o retoño). (32)

La respuesta policlonal sugiere que diferentes clones de linfocitos B producen cinco tipos diferentes de anticuerpos frente a varios epítopes con diversas afinidades. Cuando un agente patógeno ataca a un animal vertebrado, todo un ejército de diferentes anticuerpos se ponen en marcha para neutralizar al agente.

Frente a lo dicho, un anticuerpo monoclonal es producido por un único clon específico de linfocitos B, pertenece a una clase y subclase determinadas y tiene una especificidad única frente a un antígeno determinado.

BIOTECNOLOGÍA DE ANTICUERPOS MONOCLONALES

Al iniciar este milenio se están cumpliendo quince años de que apareciera la publicación de G. Köhler & C. Milstein (3) en la revista Nature, en la que estos autores reportaron la inmortalización de células linfoides B de ratón, secretoras de inmunoglobulinas de especificidad predeterminada mediante su hibridización con células de un mieloma de ratón. La posibilidad de clonar estos hibridomas, es decir, reproducirlos *in vitro* partiendo de una sola célula, permitía obtener cantidades ilimitadas de anticuerpos monovalentes secretados por cada estirpe de híbridos: los *anticuerpos monoclonales*. Si bien los primeros hibridomas de linfocitos, habían sido reportados en 1970, fue realmente el artículo de Köhler y Milstein el que llamó la atención al hecho de que la fusión celular podía servir como método para la producción de reactivos biológicos de especialidad nunca antes imaginada. Con estos hallazgos se abrió así un amplio campo en el terreno de la investigación biomédica, contribuyendo al estudio de la ontogenia de las células del sistema celular inmune y de la patogenia de muchas enfermedades en las que está implicado el sistema inmune, e incluso, para el tratamiento de éstas entidades, en las que un grupo de células pueden ser responsables de ciertas lesiones.

En estos momentos hay en proceso cientos de ensayos clínicos con anticuerpos monoclonales, la mayoría para el tratamiento de diversas formas de cáncer. Esto quiere decir que en la década de 2000-2010 se producirá inexorablemente, un fuerte incremento de la terapéutica basada en el empleo de anticuerpos.

Con ese acoplamiento se pueden conseguir múltiples fines, dependiendo de la naturaleza y efectos de ese antígeno específico. En cualquier caso, es fácil imaginar las consecuencias si ese antígeno está sobre una bacteria, un virus o una célula tumoral, por ejemplo. Ello supone un cambio sustancial en los paradigmas del desarrollo farmacéutico, al emplear las propias capacidades orgánicas como fuente de medicamentos, en lugar ser un mero tubo de ensayo donde actúan moléculas extrañas, como son la mayoría de los medicamentos "tradicionales".

La producción de anticuerpos monoclonales comienza con la sensibilización de un animal de laboratorio (casi siempre, ratones), al que se le ha inyectado previamente el antígeno, frente al que se pretende desarrollar el correspondiente anticuerpo. A las pocas semanas, cuando los linfocitos B comienzan a proliferar en respuesta al antígeno, se extirpa el bazo del animal, ya que éste órgano es una fuente primaria de linfocitos B.

Sin embargo, sólo algunos de los linfocitos B presentes en el bazo serán capaces de producir el anticuerpo buscado y, por otro lado, éstas células no pueden ser cultivadas "*in vitro*". Por todo ello, es preciso recurrir a determinadas técnicas, como la de los hibridomas, para la obtención de cantidades a gran escala de

anticuerpos monoclonales. La técnica fue desarrollada por Köhler y Milstein en 1975 y les supondría a ambos la concesión años después del premio Nobel de Medicina y Fisiología.

Ésta técnica consiste en la fusión "*in vitro*" de linfocitos B, provenientes del bazo, del ratón sensibilizado con el antígeno específico, con ciertas variantes celulares de mieloma (como la SP2/0), un tipo especial de tumor linfocitario, cuyas células son capaces de proliferar de forma indefinida, cuando son cultivadas "*in vitro*" bajo determinadas condiciones.

Una vez inmunizado el animal, las células parentales (linfocitos de bazo y mieloma de cultivo) se centrifugan juntas, se elimina el sobrenadante y se añade el agente fundente (polietilenglicol), de pesos moleculares (desde 1 000 a 6 000), que aglutina las células y modifica la composición fisicoquímica de la membrana, favoreciendo la fusión intercelular. Ésta suspensión se diluye en un medio de cultivo apropiado y se distribuye en alícuotas, en placas multipozos. El medio utilizado en ésta fase de la técnica contiene, además de antibióticos y suero animal, hipoxantina (fuente de purinas), aminopterina (un bloqueador de la vía endógena celular para la síntesis del DNA) y timidina (fuente de pirimidinas), en este medio sólo pueden reproducirse las células híbridas, pues el mieloma parental es deficiente de la enzima que permitiría evadir el bloqueo de la vía endógena, aprovechando la fuente de purinas añadida. Entre una a dos semanas ya es posible observar el crecimiento de los hibridomas formando discretas colonias, se procede entonces a eliminar la aminopterina del medio de cultivo, para favorecer la proliferación celular y se comienzan a ensayar los sobrenadantes de los pozos, individualmente, en la búsqueda del anticuerpo deseado. (7, 8)

Existen numerosos procedimientos potencialmente utilizables para detectar la presencia de anticuerpos monoclonales, secretados por los cultivos de hibridomas y para, posteriormente, caracterizar su reactividad. Se incluyen entre ellos la inmunofluorescencia indirecta, la microfluorometría de flujo, los radioinmunoensayos, las tinciones con inmunoperoxidasa, la formación de rosetas y los inmunoensayos enzimáticos de fase sólida. Este último es uno de los más empleados por su rapidez, posibilidad de automatización, consumo mínimo de muestra y sensibilidad (6, 16, 34, 35). La tendencia moderna es la generación de métodos ultrasensibles pero a la vez sencillos, capaces de procesar simultáneamente y en corto tiempo, una gran cantidad de muestras y cuyos detalles dependan del tipo de anticuerpo buscado. (36, 37)

Una vez localizados los cultivos que secretan el anticuerpo deseado, se realiza el clonaje repetido, que asegura su aislamiento y el carácter monoclonal de la preparación. El clon escogido se expande, entonces, en un cultivo, y se congela una muestra en nitrógeno líquido, para su preservación indefinida y se utiliza el resto para la producción masiva de anticuerpos *in vitro* o en animales. Si bien en el cultivo, luego de la fusión, la mayoría de los laboratorios emplean medio de cultivo suplementado con suero fetal bovino, de caballo o de conejo y se utilizan

las llamadas "*capas alimentadoras*" de células (células que no proliferan pero secretan al medio factores estimulatorios de la reproducción de las células B). (2, 9, 10)

Existe una tendencia creciente a reducir o eliminar el suero por su costo, sustituyéndolo por factores de crecimiento purificados (11). Se ha empleado el sobrenadante de células endoteliales de cordón umbilical humano, para suplementar el medio de cultivo y reducir aproximadamente un 50% el consumo de suero fetal bovino, tanto en la siembra de las células recién fundidas, como en el clonaje y expansión de los híbridos obtenidos. Algunos laboratorios han logrado diseñar medios químicamente definidos suplementados con factores de crecimiento purificados, en los cuales ya es posible crecer algunos hibridomas. (11,12)

La producción masiva de anticuerpos monoclonales, puede llevarse a cabo como se ha mencionado anteriormente, tanto por el cultivo de los hibridomas y la recogida de los sobrenadantes, que contienen los anticuerpos secretados, como mediante la inoculación de las células en la cavidad peritoneal de animales compatibles genéticamente, con el linfocito y el mieloma parental (para hibridomas ratón-ratón y rata-rata). Este último procedimiento genera tumores ascíticos, cuyos fluidos contienen entre 1-10 mg de anticuerpos por ml (aproximadamente 200-1000 veces más que la concentración alcanzada en el medio de cultivo) (9, 18, 19), mediante la adición al medio de cultivo de propilenglicol, que actúa a modo de un pegamento químico. El resultado es un hibridoma, una célula que combina la capacidad de producción de un anticuerpo determinado, propia del linfocito B, con la capacidad de la célula de mieloma de reproducirse, casi hasta el infinito. Esto supone, entre otras cosas, la disposición de una fuente inagotable de anticuerpos.

Una vez formados los hibridomas, la secuencia continúa a través de un triple proceso, consistente en selección, investigación y clonación. El primer paso es usado para seleccionar sólo aquellos linfocitos B que se hayan fusionado en forma de hibridoma, eliminando el resto de células (linfocitos y células de mieloma).

Posteriormente, los hibridomas son investigados mediante diferentes procedimientos analíticos inmunológicos, con el fin de identificar aquellos que sean productores de moléculas de anticuerpos, con la especificidad deseada. En este momento, los hibridomas forman colonias de menos de 100 células.

El paso final consiste en asegurar que todas las células del cultivo, producen las mismas moléculas de anticuerpo, con la especificidad requerida. Para ello, se separan todas las células del hibridoma y se cultivan por separado. De esa manera, cada célula en solitario se dividirá, produciendo clones de células idénticas de hibridoma. El resultado es la producción de anticuerpos monoclonales uniformes.

Todo el proceso requiere un espacio de tiempo, que con la tecnología actual disponible, raramente es inferior a seis meses.

El conocimiento actual permite la generación de plantas transgénicas, que producen eficientemente proteínas heterólogas de plantas, bacterias, hongos o, de origen animal. Entre todos los tipos de proteínas recombinantes, los anticuerpos son particularmente atractivos, por su habilidad de reconocer específicamente y unirse virtualmente a cualquier tipo de antígeno. Las plantas muestran diversas ventajas como lo son: un sistema de producción de anticuerpos a gran escala, pueden crecer fácilmente, no son caras, pueden ser almacenadas y procesadas, usando las infraestructuras existentes. El aislamiento y la purificación de plantas productoras de anticuerpos, permite aplicaciones industriales y terapéuticas fundamentales.

Alternativas de producción.

Otra alternativa es que los linfocitos sean transformados en líneas celulares linfoblastoides B, con virus Epstein-Barr (EB). Es posible producir estas líneas celulares que secretan anticuerpos específicos, pero la producción a largo plazo sólo puede lograrse, si se clonan las líneas celulares.

Un ejemplo de esto es la obtención de un anticuerpo monoclonal, dirigido contra el antígeno de grupo sanguíneo D-rhesus, como reactivo de tipificación de factor Rh, así como para prevenir la enfermedad hemolítica del recién nacido.

Se reportó la producción continua in-vitro de un anticuerpo monoclonal para el antígeno D, por una línea celular linfoblastoide, transformada con virus EB y clonada, la cuál fue obtenida de células sanguíneas de un donador Rh negativo, que había sido inmunizado con antígeno D.

Sus resultados indican que la transformación de células productoras de anticuerpos, por virus EB es un método útil para la producción de anticuerpos humanos monoclonales. (30)

Desde 1975 se sabe que se puede elaborar anticuerpos monoclonales sin utilizar animales, pero el uso de éstos se extendió en la producción en cantidades pequeñas. En la década de 1990 la A.R.F.D. (Fundación para la Investigación y el Desarrollo Alternativos), una asociación afiliada a la A.A.V.S. (Sociedad Norteamericana contra la Vivisección), asignó fondos a científicos con experiencia para desarrollar un método de laboratorio, que permitiera producir anticuerpos monoclonales en forma eficiente y humana. El resultado fue la creación de la bolsa de cultivo de tejido, permeable al gas. Estas bolsas están especialmente diseñadas para que crezca el tipo de anticuerpo deseado, cuando se les coloca las células y el medio de cultivo correctos. Las bolsas elaboran más anticuerpos monoclonales, en menor tiempo y en forma más económica, y no causan la contaminación con proteínas animales, que suele ocurrir con el método de ascitis. Éstas son razones importantes desde el punto de vista práctico. En cuanto a la

ética, más de un millón de animales por año podrían ser libres de tanto sufrimiento tan sólo en E.E.U.U. Existen además otras alternativas, como los grandes biorreactores, los tubos de diálisis, los cultivos celulares de suspensión y los minifermentadores.

Las alternativas son tan simples, confiables y económicas que los Países Bajos, Alemania, Reino Unido y Suiza han prohibido el uso de animales para la producción de anticuerpos monoclonales. En Abril de 1997, el E.C.V.A.M. (Centro Europeo para la Validación de Métodos Alternativos) recomendó en su publicación que toda la Unión Europea prohíba la producción animal rutinaria de anticuerpos monoclonales.

VENTAJAS E INCONVENIENTES DE LOS ANTICUERPOS MONOCLONALES

La producción de anticuerpos monoclonales presenta una serie de ventajas aparentemente irrefutables, como son la producción ilimitada de anticuerpos muy específicos, la ausencia de requerimientos de antígenos puros, para obtener nuevas cantidades de anticuerpos y la facilidad de conservar los clones de hibridomas, mediante nitrógeno líquido u otras técnicas estándar de conservación.

Sin embargo, no conviene olvidar que esta tecnología presenta algunas limitaciones eventualmente importantes. En éste sentido, cabe indicar que se requieren niveles notables de tecnología y de especialización profesional, los costos son generalmente muy elevados (en buena parte, por los motivos anteriores), el tiempo requerido en el proceso (mayor que para los anticuerpos policlonales) y, curiosamente, que a veces la elevada especificidad puede ser un problema y no una ventaja, tal como ocurre en determinados usos analíticos.

Otro de los problemas típicamente asociados al uso interno en seres humanos, de los anticuerpos monoclonales, es la respuesta inmunológica a que dan lugar, provocando en unos casos, la pérdida de eficacia (neutralización de los anticuerpos mediante otros anticuerpos) y en otros una respuesta inmune generalizada, potencialmente grave.

Esto es lo que puede ocurrir con los anticuerpos monoclonales derivados directamente de linfocitos B de ratones. Por ello y con el fin de reducir la respuesta humana frente a los anticuerpos murinos (de los ratones), se han desarrollado diversos métodos cuya eficacia, todavía no puede considerarse como completamente establecida.

Uno de estos métodos se basa en el empleo de fragmentos en lugar del anticuerpo entero, concretamente los de la unión al antígeno (Fab), que incluye las regiones variables y con ello la especificidad de unión al anticuerpo. Éstos fragmentos no incluyen la región constante (Fc) y esto supone que la inmunogenicidad es menor, que si se tratase del anticuerpo completo. Sin embargo, la falta del fragmento Fc, reduce también la capacidad neutralizante del anticuerpo, por lo que suele conjugarse con determinadas proteínas o toxinas, dependiendo de la finalidad perseguida.

Otra opción consiste en el empleo de anticuerpos quiméricos. Éste tipo de anticuerpos monoclonales mantienen las regiones variables murinas, pero acopladas con regiones constantes humanas. Aludiendo a su procedencia de dos especies animales diferentes (hombre y ratón), se generó el término "quimérico", procedente de *Quimera*, el monstruo mitológico nacido de la unión de Tifón y Equidna, que tenía cabeza de león, cuerpo de cabra y cola de serpiente.

Por su parte, los anticuerpos humanizados contienen sólo las regiones hipervariables del anticuerpo murino original. Actualmente, están empezando a producirse por técnicas de ADN recombinante, anticuerpos monoclonales completamente humanos. Esto resuelve en buena parte no sólo el problema de la inmunogenicidad, sino también el de la pérdida de actividad con la administración repetida, por formación de anticuerpos anti-anticuerpo.

Existen algunos otros problemas aún no completamente resueltos, que limitan por el momento la potencial utilidad terapéutica de los anticuerpos monoclonales. Posiblemente, uno de los más importantes deriva del hecho que los anticuerpos sean proteínas de alto peso molecular, por lo que su cinética es más lenta que la de los medicamentos tradicionales (de peso molecular mucho más pequeño, generalmente) y su capacidad de penetración en los tejidos es inferior; todo ello redundando en una menor eficacia en aquellas indicaciones, que precisan una acción específica en determinadas áreas corporales, como ocurre en procesos cancerosos o infecciosos.

APLICACIÓN DE ANTICUERPOS MONOCLONALES

Los anticuerpos monoclonales son utilizados con fines terapéuticos (antiinfecciosos, inmunosupresores, anticancerosos, etc) y diagnósticos (inmunoquímico y mediante imagen). Su uso comercial en pruebas diagnósticas se remonta a 1981 (ELISA y radioinmunoensayo o RIA), habiendo hoy día más de cien pruebas específicas de diagnóstico "*in vitro*" inmunoquímico para microorganismos, hormonas, toxinas, medicamentos, drogas, pesticidas y células tumorales. (26)

El primer anticuerpo monoclonal empleado con fines terapéuticos, fue autorizado en Estados Unidos en Junio de 1986. Concretamente, fue el muromonab (*Orthoclone OKT3*), para la prevención del rechazo en los trasplantes de riñón.

Al margen de los anticuerpos monoclonales utilizados en técnicas analíticas inmunoquímicas "*in vitro*", como ELISA o RIA, actualmente ya están disponibles comercialmente más de una decena de anticuerpos monoclonales, empleados para diferentes utilidades terapéuticas o diagnósticas.

Los mecanismos a través de los cuales un anticuerpo monoclonal puede resultar útil terapéuticamente son variados, va desde el simple bloqueo del receptor antigénico en las células efectoras, hasta la acción citotóxica sobre las células que expresan el antígeno correspondiente, pasando por múltiples opciones de modulación celular.

Asimismo, con frecuencia se utilizan los anticuerpos monoclonales como:

- Transportadores de toxinas para destruir las células portadoras de ciertos antígenos.
- Transportadores de fármacos para una acción localizada.
- Transportadores de radionúclidos (elementos isotópicos radiactivos) para:
Radioterapia localizada (*radioinmunoterapia*).
- Diagnóstico mediante imagen (*radiodiagnóstico* o *radioinmunodiagnóstico*).
- Frecuentemente, la radioinmunoterapia, una de las opciones terapéuticas de mayor auge, para el tratamiento de formas avanzadas o metastásicas de

diversos tipos cáncer, sirve para hacer un seguimiento y evaluación de la implantación tumoral, con lo que tiene el valor añadido de permitir el diagnóstico o evaluación clínica mediante imagen, altamente resolutivo.

Al revisar la literatura científica, es frecuente comprobar que los anticuerpos monoclonales utilizados en clínica, reciben denominaciones de difícil pronunciación en castellano, debido al uso común del sufijo "mab" (acróstico de *monoclonal antibody*, en inglés) y a la combinación de varias sílabas, que proceden del tipo u origen del anticuerpo.

Si complicada puede resultar en castellano su denominación común internacional (DCI), los nombres en clave asignados por parte de los laboratorios, a los anticuerpos monoclonales en fase de investigación, hace impronunciable su nombre en cualquier idioma. Para complicar aún más la cuestión, en muchos casos, van precedidos de algunas letras minúsculas como h o hu (humanizado), (recombinante) o (quimérico o *chimeric*, en inglés).

Otras aplicaciones de los anticuerpos monoclonales son:

- Definición de subpoblaciones celulares normales y tumorales. (13, 14)
- Caracterización de antígenos tisulares y grupos sanguíneos. (15, 38)
- Detección de niveles de hormonas y otros factores séricos circulantes. (16, 17)
- Diagnóstico y tratamiento de enfermedades infecciosas y parasitarias. (16, 6, 20, 38)
- Detección de tóxicos, mutágenos y drogas. (16, 21, 24)
- Diagnóstico, monitoreo y tratamiento de los tumores malignos. (25, 26, 27)
- Demostración de daños tisulares. (28)
- Facilitación del trasplante de órganos y tejidos. (21, 29)
- Determinación de la estructura de los antígenos, la detección y análisis de los productos génicos, el estudio de la arquitectura y función celular y su conjugación a matrices adecuadas.
- También ha permitido el desarrollo de potentes métodos inmunoquímicos, de purificación de diversas moléculas. (40)
- Los reactivos monoclonales usados en los bancos de sangre, son característicamente combinaciones de varios productos monoclonales diferentes, por lo que incrementan el espectro de variantes de fenotipos, que el antisuero puede identificar. Los paneles de especificidades monoclonales selectas, permiten la identificación y categorización de un sistema antigénico complejo. Se usan las especificidades de las antiglobulinas monoclonales, para identificar diferentes clases de inmunoglobulinas o proteínas del complemento, en las membranas celulares. (33)

- También han hecho posible la identificación de innumerables marcadores de la membrana celular. Los antígenos CD, tan importantes en la actualidad para identificar clases y subclases de glóbulos blancos. (40)

COMENTARIOS

La revisión del tema sobre la biotecnología de los anticuerpos, nos permite tener una mayor información y visualización de los innumerables procedimientos, que se están desarrollando en la mayor parte del mundo, para la obtención a gran escala de inmunoglobulinas, utilizando una de las características de las células tumorales, como es la de reproducirse infinitamente y las propiedades de los linfocitos B de producir anticuerpos específicos para un antígeno determinado; esto ha contribuido en gran medida, a la obtención de inmunoglobulinas mucho más específicas y dirigidas contra diferentes padecimientos, además nos proporciona una herramienta invaluable en el diagnóstico, pues al ser altamente específicos permite la obtención de innumerables reactivos de tipo analítico, que permiten el desarrollo de nuevos métodos sensibles.

CONCLUSIONES

La biotecnología de los anticuerpos monoclonales obtenidos por hibridomas, ha determinado una nueva etapa en la tecnología, ya que anteriormente se obtenían inmunizando seres humanos y animales con antígenos específicos, para la obtención de anticuerpos para dichos antígenos, pero los anticuerpos obtenidos de ésta manera eran poco específicos.

Ésta era de la biotecnología determina una nueva etapa en la tecnología, ya que dichas células tienen la capacidad de reproducirse y producir anticuerpos fuera del organismo (in vitro), ésto eleva en gran escala la producción de anticuerpos específicos de manera industrial, de ésta manera se abate el costo de producción y se eleva su especificidad. Aunque para ésta producción se necesita una gran infraestructura y alta tecnología, la cual es sumamente costosa, pero una vez implementada es una buena fuente de producción de anticuerpos y de ingresos.

Con ésta tecnología se reduce la utilización de animales de laboratorio, ya que anteriormente se utilizaban de manera indiscriminada. En los países bajos de Europa con la introducción de los conceptos bioéticos, que tienen la tarea de enseñar como usar el conocimiento, en el campo científico-biológico, con lo que se ha limitado el uso de animales de laboratorio.

En el tratamiento de enfermedades se han incrementado de manera inexplicable, el uso de éstos anticuerpos, pues se han producido un sin número de éstos, en contra de enfermedades en las diferentes áreas de la medicina y en el diagnóstico, obteniendo buenos resultados.

Por otra parte se están abriendo otras alternativas de producción, como es la producción de anticuerpos a partir de plantas transgénicas, que producen eficientemente proteínas heterólogas de plantas, bacterias, hongos y humanas, por lo que muestran grandes ventajas, como la de crecer fácilmente y ser más costeables, para su producción.

Sin embargo, en nuestro país no es fácil contar con la infraestructura y la tecnología, para la producción de éstos anticuerpos por su costo tan elevado, por lo que sólo se hace de manera experimental, en los laboratorios de centros científicos.

BIBLIOGRAFÍA

1. Bast, R.O Elimination of leukemia cells from human bone marrow using monoclonal antibody complement. *Cancer Res.* 1983, 43:1389.
2. Köhler, O.: Why hybridomas? *Hybridoma* . 1981, 1:1
3. Köhler O.C. Milstein. Continuous cultures of fused cell secreting antibody of predefined specificity. *Nature.* 1975, 256:495
4. Sinkovjcs, J. O. Early history of specific antibody – producing lymphocyte hybridomas. *Cancer Res.* 1981, 41:1246
5. Yelton, D.E. M. D. Scharff. Monoclonal antibodies: A powerfull tool in biology and medicine *annu rev biochem.* 1981, 50: 657
6. Kannel, R. H. t.j. Mckearn., K.B. Bechtol (editors): *Monoclonal antibodies. Hybridomas: Anew dimension in biological aniyse.* New York, plemun press, 1980
7. Vázquez, A.M. :Obtención y caracterización de 5 anticuerpos monoclonales que reconocen una preparación de antígeno carcinoembriónico. Resúmenesdel II congreso nacional de ciencias biológicas. La Habana Cuba. Enero 1984
8. Reading, C.: Theory and methods for immunization inculture and monoclonal antibody production. *J immunol methods.* 1982, 53:261
9. Sikoro, K : Human hybridomas from malignant glionas. *Lancet.* 1982, 1:11,
10. Holmberq. D. A rapid screening teachique for monoclonal. Antibodie swith specificity for proteins. *J. Immunol* 1983, 61:9
11. Brodin : Cloning of human hybridoma, and limphoma cell lines using enriched monocytes as feeder layer. *J. Immunol methos.* 1983, 60: 1
12. Astaldi, O. : Human endothelial culture supernatan (hecs); a growfactor hybridomas. *J. Immunol* 1980, 125:1411
13. Kung.P.C. : Monoclonal antibodiesdefining distinctive human T cell surface antigens. *Science* 1979, 206: 347
14. Foon, K. A. : Surface markes on leukemia on limphoma cells: Recen avances . *Blood* 1982, 60:1

15. Brockhaus, M.. Monoclonal antibodies directed against the human the human le blood group antigen. J. Rio chem.. 1981, 256:13223
16. Hammerling, O.J. ; U. Hámmerling; J. f. Kearny (Editors): Monoclonal antibodies and T-cell hybridomas. Perspectives and tk. (thecnical advaces. Research monog. Immunology. 1980, Vol. 3 Amsterdam,elsevier/north Holland biomed press.
17. We! Ss.T.L. Characterization of monoclonal antibody to human erythriletin. Proc. Naracad SCI, USA 1982, 79: 5465
18. Muurakam!. H.: Growth of hybridoma cells in serum free médium: Athanoblamine is an essential component. Pro nat acad sci USA:1982, 79: 1158
19. Dean, C.J. : Production of iga secretinh hybridomas : A monoclonal rat antibody of the iga class withespecificity for rtl. J. Immunol methods 1982, 153: 307
20. Wands, J.R: Immunodiagnosis of hepatitis B with high – affinity IgM monoclonal antibodies. Pro Nat Acad. SCI USA. 1981, 78: 1214
21. Vo.,W.A.: Monoclonal antibodies to the glycoprotein of vesicular stomatitis virus: Comparative neutralizing activity. J. 1982, 42: 220
22. Sikora. K.: Who needs monoclonal . Nature. 1983, 304: 97
23. Groopman. J. D.: Cuantification of alfatoxin b-1 modified and susing monoclonal antibodies. Cancer. 1982, 42:3120
24. Park.: Monoclonal antibodies that inhibit enzyme of 3-methylo-lantrene induced cytochromo p-450. Cancer Res. 1982, 42:1798
25. Mitcheii. M. S., H.F. Oetgen (editors): Hybridomas in cancer diagnosis and treatment, New York, haven press, 1982
26. Boyle. J. M. ; R. Safihiji: report of the international worshop on assay of nuclear antigens relevant to carcinogenesis and chemotherapy. Br. J. Cancer. 1982, 46:304
27. Order, 5. E.: Monoclonal antibodies: Potential role in radiation therapy and oncology mt,J. Radiat Oncol Boil Phys. 1982, 8: 1193
28. Sikora. K.: Monoclonal antibodies in oncology. J. Clin .Pathol 1982, 35
29. Damianov. I. ; b. B. Knowis : Biology of disease. Monoclonal antibodies and tumor associated antigens. Lab. Invest. 1983, 48: 510

30. Crawford. D.H.: Production of human monoclonal antibody to rhesus D antigen. *Lancet*. 1983, February 19: 386
31. Dr. James. T. Barrett. *Inmunología. Introducción a la Inmuniquímica y a la Inmunobiología* Edit. Interamericana. Primera Edición. 1972
32. Daniel P. Stites and. John D. Stobo and Vivian Wells. Edit. *El Manual Moderno*. 6° Edición. 1988
33. AA.BB. *Manual técnico* 12° -edición. 1997
34. Köhler, O.: The technique of hybridoma production. *Immunological methods*. New York, Academic press. 1981, 11:285
35. Knutton, S. C.A. Pasternak: The mechanism of cell-cell fusion. *Tibs*. 1979, October, 220
36. García . C.: Aplicación de la técnica de inmunoperoxidasa para la identificación de células de linfoma T humanas reconocidas por los anticuerpos monoclonales ior-T1 e ior-T2. Resúmenes del XV congreso latinoamericano de patología y V congreso cubano de anatomía patológica. La Habana Cuba, Noviembre 1983
37. Oheuens, J. D.E. Mcfarlin: A multivalent antibody radioimmunoassay for screening specific antibody secretion by lymphocyte hybridoma cultures. *J Immunol methods* 1981, 183:47
38. Hunter, K.H.: Antibacterial activity of a human monoclonal antibody to haemophilus influenzae type B capsular polysaccharide. *Lancet* 1982, 9:798
39. Peeters K. Dewilde : de Jaeger G. Angenon G. D.A. : Production of antibodies and antibody fragments in plants. *Vaccine*. 2001, mar 21; 19 (17,19): 2756-61
40. Boennisch Thomas. *Handbook Immunochemical. Staining Methods*. Edit. Dako Corporation. 1989