

Leji 171

Universidad Nacional Autónoma de México



Facultad de Ciencias

PRODUCCION DE ANTICUERPOS
MONOCLONALES CONTRA MELATONINA

T E S I S
Que para obtener el Título de
B I O L O G O
P r e s e n t a

HECTOR FERNANDO SERRANO



México, D. F.

1984



Universidad Nacional
Autónoma de México

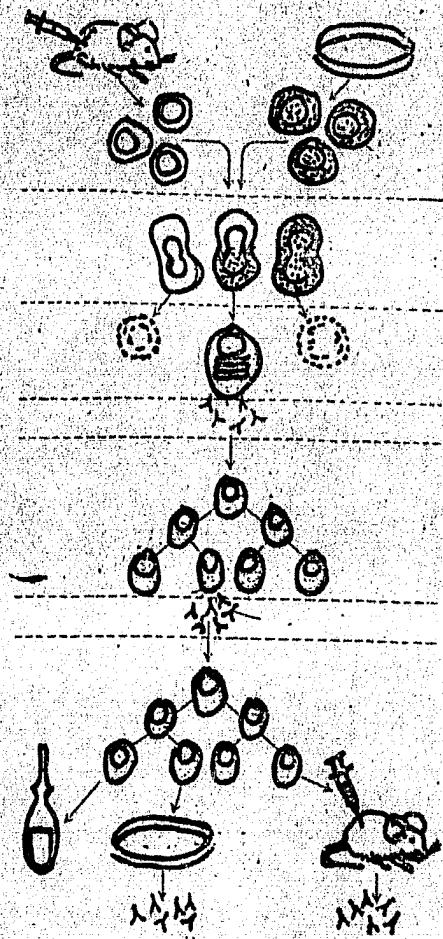


UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



AGRADECIMIENTOS

Quiero manifestar mi agradecimiento a las autoridades del Departamento de Ciencias de la Salud, UAM-I, por permitirme utilizar sus instalaciones y recursos para la elaboración de este trabajo.

Al Dr. Miguel Betancourt R. por el apoyo facilidades y enseñanzas que me brindó en la realización de esta tesis.

Al Dr. J. Manuel León Cázares por su atención, tolerancia, palabras de estímulo y haberme mostrado el camino de la Ciencia.

A los demás miembros del jurado:

M. en C. Ernesto Rodríguez A.

Q.F.B. José Sullivan López

Biól. Ma. de los Angeles Aguilar S.

por la revisión de este trabajo, sus sugerencias, su esfuerzo y su amistad.

A todos los integrantes del Laboratorio de Biología Celular, UAM-I por su amistad y cariño.

A la Biól. Ma. Dolores García S. por su amistad y ayuda en la preparación de esta tesis.

A mis compañeros, familiares y Maestros que me permitieron entrar en sus vidas.

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

ABTS	Acido 2,2'-Azino-di-(3-etilenbenzotiazolin) sulfónico.
ADN	Acido Desoxirribonucleico.
APS	Persulfato de Amonio
C	Región constante de las Cadenas de Ig.
CFA	Adyuvante completo de Freund.
DMEM	Medio Eagle modificado por Dulbecco.
DMEM-HT	Medio de Cultivo suplementado y adicionado de Hipoxantina y Timidina.
ELISA	Ensayo Inmunoabsorbente con enzima acoplada.
FCS	Suero Fetal de Ternera.
G ₀	Etapa de quiescencia del ciclo celular.
G ₁	Fase de síntesis proteica activa previa al inicio de la fase S del ciclo celular.
G ₂	Fase de síntesis proteica activa posterior a la fase S y preparativa para la división celular.
H	Cadenas pesadas de las Ig.
NBSS	Solución Salina balanceada de Hanks.
HGPR T	Enzima Hipoxantin-guanin-fosforribosil-transferasa.
HIOMT	Enzima Hidroxilindol-orto-metil-transferasa.
Ig	Inmunoglobulina (s) .
L	Cadenas ligeras de las Ig.
MAO	Enzima Monoaminooxidasa.
Medio HA1	Medio de cultivo selectivo suplementado y adicionado de Hipoxantina, Aminopterina y Timidina.
Mt	Melatonina.

Mt- TGH	Melatonina acoplada a Tiroglobulina Humana,
NAT	Enzima N-acetiltransferasa.
PBS	Solución salina amortiguada de fosfatos.
PEG	Polietilenglicol
pH	Potencial de hidrógeno.
S	Fase de síntesis de ADN en el ciclo celular.
SDS	Lauril sulfato (sal disódica)
St	Serotonina
TEMED	N,N,N',N'- Tetrametil-etilendiamina.
TGH	Tiroglobulina Humana.
T _H	Linfocitos T cooperadores.
T _C	Linfocitos T citotóxicos.
Tris	Amortiguador Tris (hidroximetil)aminometano.
T _S	Linfocitos T supresores.
V	Región variable de las cadenas de las Ig.
$\mu\text{W}/\text{cm}^2$	Intensidad luminosa ₂ en microwatts aplicada en una superficie de 1 cm ² .
Xg	Aceleración de la gravedad aplicada en una centrifuga.

I N D I C E

	PAG.
- INTRODUCCION	1
- MATERIALES Y METODOS	20
I. OBTENCION DEL ANTIGENO	20
II. INMUNIZACION	20
III. MANTENIMIENTO DE LAS CELULAS DE MIELOMA	21
IV. FUSION CELULAR	22
V. DETECCION DE HIBRIDOMAS PRODUCTORES DE ANTICUERPOS ESPECIFICOS	24
VI. CLONACION Y EXPANSION DE CELULAS HIBRIDAS	25
VII. ESPECIFICIDAD DE LOS ANTICUERPOS	28
- RESULTADOS	30
- DISCUSION	39
- CONCLUSIONES	54
- REFERENCIAS	55

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

En mamíferos, la glándula pineal se encuentra localizada en el diencefalo en contacto con el tercer ventrículo. Su origen embriológico es a partir del techo del diencefalo por detrás de la zona que origina al plexo coroideo que forma un divertículo. Histológicamente la glándula está constituida por dos tipos celulares: células neuroectodérmicas denominadas pinealocitos y células que pueden considerarse de glía; recubriendo a ambos tipos celulares se encuentran células mesenquimatosas que constituyen el tejido conectivo de la cápsula y los tabiques que dividen al cuerpo en lobulillos (Ham, 1970).

Los pinealocitos son los que constituyen la parte activa de la glándula. Estas células tienen conexiones vía nerviosa con células del sistema simpático (Axelrod, 1974), pero además se relacionan con el nervio óptico a nivel del tracto óptico accesorio inferior (Wurtman y Antón-Tay, 1969). La asociación de los pinealocitos con células fotorreceptoras y los cambios rítmicos que tienen la producción y/o almacenamiento de ciertas sustancias, han sido puntos por los cuales se ha pensado en una especie de "reloj", que regula los cambios circádicos en función de la intensidad luminosa (Wurtman y Antón-Tay, 1969; Axelrod, 1974; Klein, 1978) en el que la glándula pineal tiene un papel importante.

Sin embargo, recientemente algunos trabajos han mostrado que aún en animales como el armadillo en los cuales no se ha encontrado la glándula pineal diferenciada, se pueden observar variaciones

oscilatorias en la producción o almacenamiento de sustancias similares a las que se encuentran en la glándula pineal (Harlow, et. al., 1982).

En otros organismos, principalmente reptiles, la glándula pineal se asocia con receptores de ondas infrarrojas que les permite localizar a sus presas en la oscuridad como sucede con las serpientes; también se le asocia con la necesidad de exponerse al sol que se presenta en los lacértidos (Dodt y Maisl, 1982).

La presencia de pinealocitos de forma cónica en la glándula de muchos vertebrados inferiores, su capacidad de transformar impulsos luminosos y el hecho de que al extraerle la pineal no se afectan ciertas características como el tiempo de vida promedio para su especie, ha llevado a algunos autores a postular que la glándula pineal es un órgano residual sobre todo si se toma en cuenta que en humanos recién nacidos existe ya en esta glándula, cierto grado de calcificación que es signo de muerte celular. (Wurtman y Antón-Tay, 1969).

Sin embargo, existen otras evidencias que demuestran que si bien la glándula pineal es un órgano de origen antiguo, ha sufrido ciertas especializaciones que hacen de él un órgano cuya posición y función han sido "aprovechadas" para que se desarrollen otras funciones, por las cuales la glándula ha sido considerada como un transductor neuroendócrino (Wurtman y Antón-Tay, 1969; Antón-Tay, 1971; Axelrod, 1974; Klein, 1978), que recibe impulsos nerviosos controlados directamente por el nivel luminoso del medio

ambiente y los transforma en señales químicas, principalmente en forma de compuestos denominados metoxiindoles cuyos representantes principales son dos entidades que tienen un origen químico común, pero cuya función es antagónica y complementaria: la serotonina (St) y la melatonina (Mt) (Beck, et al., 1982).

La medida de los niveles de ambos metoxiindoles respecto a la intensidad luminosa o bien a la duración del ciclo día-noche permiten la asociación entre la glándula pineal y el fotoperíodo así como los ritmos circádicos.

En este caso, se cumple el hecho de que la célula trabaja con pequeños cambios de concentración de un par de entidades químicas con funciones antagónicas, de las cuales una de ellas puede llamarse excitador o control positivo y la otra inhibidor, sin que esto implique el hecho de ser forzosamente entidades proteicas.

La biosíntesis de los metoxiindoles se inicia (Klein, 1978) en las células parenquimatosas de la glándula pineal, que toman el aminoácido triptofano circulante. Una vez en el interior de estas células, el triptofano es hidroxilado por la triptofanhidroxilasa formándose el 5-hidroxitriptofano (Figura 1). Este compuesto es descarboxilado por la acción de la descarboxilasa de aminoácidos aromáticos de la serie 1, que forma la 5-hidroxitriptamina o serotonina.

Este es uno de los compuestos importantes con los cuales se regula la función de la glándula pineal.

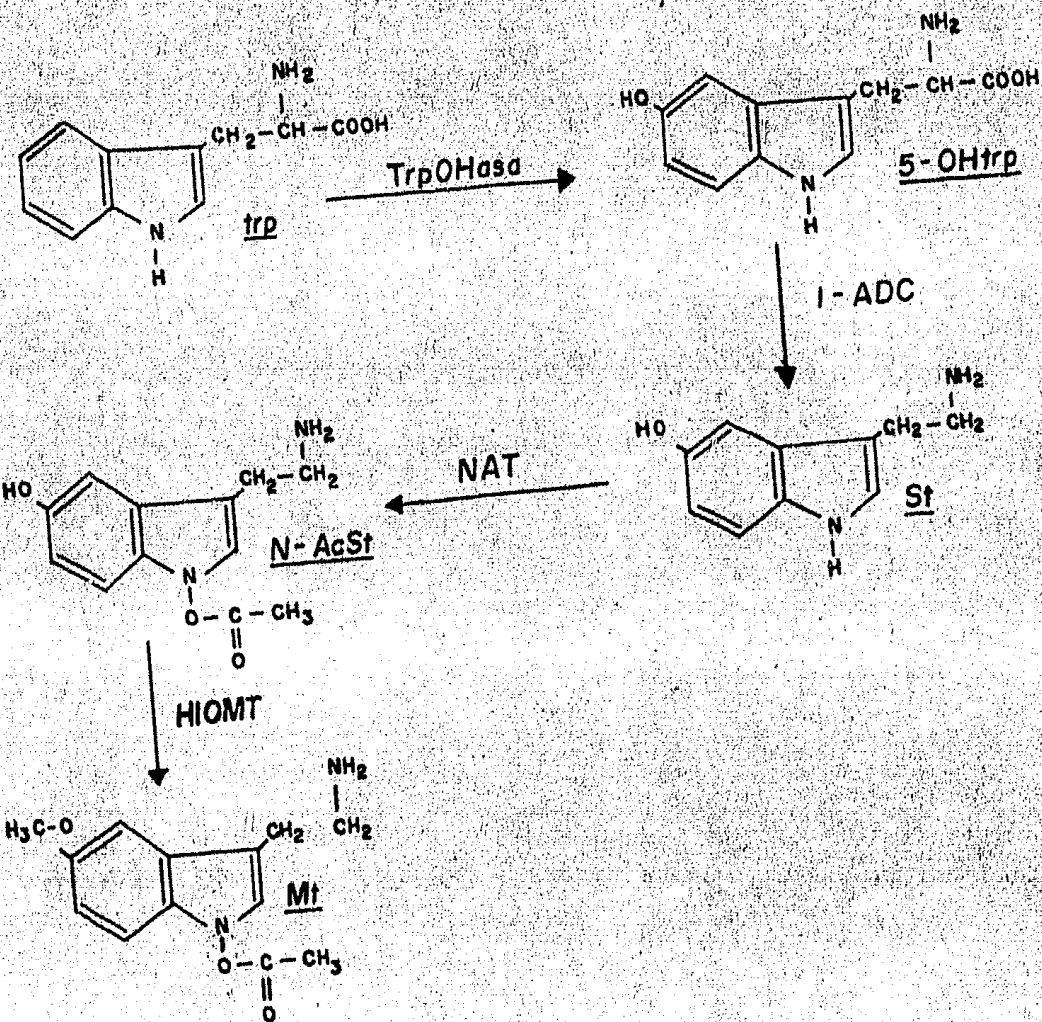


FIGURA 1. BIOSINTESIS DE LA MELATONINA. 5-OH trp. = 5 hidroxitriptofano, trp = triptofano, N-AcSt = N acetil serotonina, St = serotonina, Mt = melatonina, ENZIMAS: trpOHasa = triptofanohidroxilasa, 1-ADC = Descarboxilasa de aminoácidos aromáticos de la serie I, NAT = N-acetiltransferasa, HIOMT = Hidroxiindol-0-metiltransferasa. Basado en Klein, 1978.

Depende de ciertas condiciones como la concentración de St, los impulsos nerviosos y la presencia de enzimas entre otras, que la St sufra una acetilación en el nitrógeno del anillo indólico por acción de la N-acetiltransferasa (NAT), que forma la N-acetiltriptamina que a su vez actúa como sustrato de la enzima Hidroxiindol orto-metiltransferasa (HIOMT), que forma la 2(5-metoxiindol) N acetil amina o Melatonina .

Las diferentes vías que utiliza el organismo y en particular los pinealocitos para regular la cantidad de Mt circulante para mantener su nivel basal pueden colocarse en tres grandes grupos, dos de los cuales tienen estrecha relación: a) regulación celular, b) regulación neural y, c) regulación ejercida por el medio ambiente. Es inseparable el binomio de la regulación neural-célula debido a que se encuentran en el mismo organismo pero actuando a dos niveles. Sin embargo, no debemos olvidar que el medio en el cual se desenvuelve el organismo también ejerce cierta influencia. El principal factor que aporta el medio ambiente es la intensidad luminosa (Pang, et al., 1982). Los trabajos de Brainard y colaboradores (1982), han demostrado que la intensidad mínima que causa en la rata una disminución en la concentración de Mt es de $0.5 \mu\text{W}/\text{cm}^2$ (1.18 lux).

La regulación a nivel celular comprende dos facetas: el nivel enzimático y el de los receptores de las sustancias provenientes de las neuronas, este último es el que actúa como unión entre la regulación enzimática y la ejercida por impulsos nerviosos.

Al llegar un estímulo a la varicosidad terminal de la neurona, se libera el neurotransmisor noradrenalina que es captada por receptores β -adrenérgicos en los pinealocitos. King y colaboradores (1982), demuestran que la actividad de estos receptores regula la actividad de una de las enzimas que intervienen en la biosíntesis de Mt.

Dentro del nivel enzimático de regulación, tenemos como primer aspecto la disponibilidad del sustrato. El nivel de Mt circulante no tiene su punto crucial a nivel de aminoácido disponible, sino a la cantidad del compuesto intermedio con actividad biológica: la St. La concentración de esta indolamina es regulada por la actividad de la enzima anabólica denominada descarboxilasa de aminoácidos de la serie 1, y por la actividad de dos enzimas catabólicas: la monoaminoxidasa (MAO) y la NAT, esta última es regulada por la actividad de los receptores β -adrenérgicos (King, *et al.*, 1982). La MAO actúa sobre la St convirtiéndola en el ácido 5-hidroxiindolacético que también muestra variaciones circádicas, aunque la enzima MAO no las muestra. Otra enzima importante es la HIOMT que regula directamente los niveles circulantes de Mt que muestra además en su producción, una periodicidad circádica similar a la del metoxiindol.

La concentración de Mt en el plasma y líquido cefalorraquídeo se ha visto que es seis veces mayor en la noche que durante el día (Hedlund, *et al.*, 1977), mientras que en el caso de la St las concentraciones reportadas durante el día son mayores que las encontradas durante la noche.

Los sitios en los que se lleva a cabo la síntesis de la Mt. o que al menos presentan las enzimas necesarias para ello, ha sido un punto de controversia, ya que autores como Wurtman y Axelrod (1965) aseveran que la glándula pineal es el único lugar donde se presenta la enzima HIOMT, mientras que otros autores han encontrado que varias enzimas involucradas en la biosíntesis de este metoxilindol, se presentan en la glándula pineal y la retina (Grotta, et al., 1982), la glándula Haderiana y el cerebro de ratas (Yu, et al., 1982) y aún en plaquetas (Launay, et al., 1982).

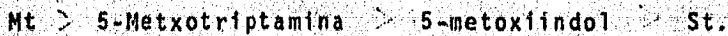
Una vez que la Mt se ha sintetizado, puede actuar sobre varios procesos y estructuras entre los que sobresalen el sistema nervioso central (Antón-Tay, 1972; 1974; Glass y Linch, 1982), el hipotálamo (Richardson et al., 1982; Walker, et al., 1982), las gónadas (Ruzsás, et al., 1981; Horst, et al., 1982; Penny, 1982), el ciclo estral (Johnson, et al., 1982; Kennaway, et al., 1982), la hormona luteinizante (Richardson, et al., 1982; Walker, et al., 1982), el AMP cíclico (Vacas, et al., 1981, 1982), el sueño y la neuroquímica (Holmes y Sugden, 1982), la hipertensión (Kawashima y Nagakura, 1982) y la conducta (Golus y King, 1981).

Los efectos de la Mt son muy variados ya que se ha visto que en la rana causa un oscurecimiento natural de su piel pero también tiene efectos terapéuticos en el humano como en el caso de la epilepsia donde se hacen menos frecuentes las crisis y la enfermedad de Parkinson en donde aumenta el control del movimiento (Antón-Tay, 1972). Además se ha encontrado que su excreción

está disminuida y no sincronizada en mujeres con cáncer de mama (Bartsch, et al., 1981). Heward y Handley (1978), propusieron un modelo para el receptor de la Mt, en el que se muestran los requerimientos estructurales para los agonistas y antagonistas.

Según estos autores, un receptor para la Mt estaría caracterizado farmacológicamente por:

i) Una serie de potencia en la cual se tendría



ii) Ser susceptible a ser bloqueado específicamente por la N-acetilriptamina a concentraciones relativamente bajas.

Para la detección y cuantificación de la Mt se miden sus efectos fisiológicos o bien utilizando anticuerpos marcados con radioisótopos o fluorocromos. Entre los primeros está el oscurecimiento de la piel de rana que se utiliza con muy poca frecuencia debido a su baja sensibilidad, alto costo y a que lleva mucho tiempo para poder obtener resultados. Entre los métodos que utilizan anticuerpos destacan el radioinmunoensayo (RIA) y la inmunofluorescencia (IF) ya sea directa o indirecta (Grotz y Brown, 1974; Arendt, et al., 1975; Rollag y Niswender, 1976).

Como es bien conocido, los anticuerpos son producidos por células especializadas del sistema inmune, del cual se han propuesto diferentes modelos de diferenciación, el más generalizado es el propuesto por Ralph (1981) en el cual las células totipotenciales estarían presentes en la médula ósea. Posteriormente a las primeras divisiones mitóticas, las células inmaduras pasarían

a la circulación donde se denominan pre-B o se han concentradas en el timo donde constituyen la serie T. Una vez maduras las células pasarían a órganos periféricos como el bazo, timo, ganglios linfáticos, etc.

La respuesta inmune puede dividirse en: humoral y celular. La primera está representada por la producción de las inmunoglobulinas (Ig) que producen los linfocitos B una vez que se ha activado, mientras que la última se caracteriza por presentar diversas interacciones entre las células T, B y los macrófagos circulantes (Nossal, 1978).

De la serie de linfocitos T pueden reconocerse diversas poblaciones con funciones específicas. Este reconocimiento se hace principalmente con base en antígenos específicos presentes en la superficie de las células y contra los cuales se han producido anticuerpos del tipo monoclonal para su purificación (Kato, et al., 1982; Tsou, et al., 1982; Tsudo, et al., 1982) (Figura 2). Las diferentes poblaciones de linfocitos T se han caracterizado son los linfocitos T supresores (T_S), cooperadores (T_H) y citotóxicos (T_C).

Cuando a las células B llega un estímulo antigénico como bacterias, lectinas, etc. es captado por sus receptores de membrana, generalmente proteínas del tipo de las Ig u otros, el linfocito B que se encuentra fuera del ciclo celular en la fase G_0 sufre una transformación blastoide que hace que este se active entrando al ciclo celular en la fase G_1 para seguir a la fase S y continuar con su ciclo hasta llegar a la mitosis (Lerner y Dixon, 1973).

POBLACION DE CELULAS T RE-CONOCIDAS	ANTICUERPOS MONOCLONALES	ANTIGENO DETECTADO
Células T periféricas	Leu - 1 OKT - 1 UCHT- 2	T - 1
Células T citotóxicas/ supresoras	Leu - 2A OKT - 8 UCHT- 4	T - 8
Células T inductoras/ auxiliares	Leu - 3A OKT - 4 9.3	T - 4
Células T periféricas	Leu - 4 OKT - 3 UCHT- 1	T - 3
Todos los timocitos y células T periféricas	Leu - 5 Lyt - 3 OKT - 11 OKT - 11A 9.6	T - 11
Timocitos corticales	NA1 / 34 OKT - 6	No Identificado
Timocitos, precursores mieloides y linfoides, células plasmáticas	OKT - 10	No Identificado

FIGURA 2. ANTICUERPOS MONOCLONALES PARA DETECTAR SUB-POBLACIONES DE CELULAS T ESPECIFICAS. DATOS TOMADOS DE Beverly, 1982; Janossy, 1982; Asma et al., 1983; Brankovan et al., 1983.

Una vez que se ha llevado a cabo la división mitótica, las células hijas resultantes pueden sufrir dos caminos de diferenciación, una de ellas queda como célula de memoria y la otra como célula plasmática. Estas células son reconocibles en el análisis citológico ya que al hacer una tinción con Hematoxilina y Eosina, la célula de memoria presenta un citoplasma claro mientras que el citoplasma de la célula plasmática es fuertemente basófilo, debido al gran número de ribosomas presentes que se encuentran adheridos al retículo endoplásmico que a su vez se ve incrementado conforme avanza la diferenciación de estas células (Nossal, 1978).

En el estudio de la fisiología de las células plasmáticas se encuentra que además de las funciones inherentes a todas las células del organismo, lleva a cabo la síntesis activa y preferencial de proteínas especializadas como las Ig, que reconocen la conformación estructural ó secuencial del antígeno por lo cual pueden unirse a él y hacerlo blanco de otros procesos de la respuesta inmune con lo cual el antígeno es neutralizado y destruido según la teoría de Burnett y Talmage (Nossal, 1978).

De acuerdo a la teoría de la selección clonal, el número de células que forman anticuerpos y que requiere un organismo durante su vida varía entre 1 y 10 millones (Rose, 1982). Sin embargo, esta cifra debe ser una subestimación dado que el organismo no "sabe" a que tipos de antígenos estará expuesto ni el medio ambiente en el que se desenvuelve es homogéneo, por lo que el número debe ser mucho mayor.

El producto de las células plasmáticas son las Ig que son proteínas a las cuales se les ha modificado postranscripcionalmente con residuos de azúcares en su paso a través del aparato de Golgi para poder ser exportadas y cuya estructura cuaternaria consiste básicamente de dos tipos de cadenas polipeptídicas. El tetramero está unido en ciertas regiones por dos puentes disulfuro que unen a las cadenas iguales (Figura 3) que suman en conjunto 446 residuos de aminoácidos, mientras las otras dos tienen 214 residuos de aminoácidos, (Winkelhake, 1978).

En conjunto el tetramero es una proteína de peso molecular de 160,000 . Las cadenas con mayor número de residuos son denominadas pesadas (H) y a las otras se les llama ligeras (L), la secuencia de aminoácidos de las cadenas H es diferente de la que se presenta en la estructura primaria de las cadenas L . De acuerdo a los estudios de secuenciación se ha visto que ambos tipos de cadenas pueden dividirse en dos regiones, de acuerdo a la variación de los residuos que determinan así una región constante en donde la variación es mínima, mientras que existe otra cuya variación es alta y se denomina región variable.

Dentro de esta última hay zonas en las cuales la variación es todavía mayor, esas regiones se conocen como hipervariables. No todos los tipos de Ig presentan como estructura básica el dímero H_2L_2 , sino que hay algunas que presentan más de un dímero como es el caso de la IgA que tiene dos dímeros y la IgM con cinco dímeros (Winkelhake, 1978).

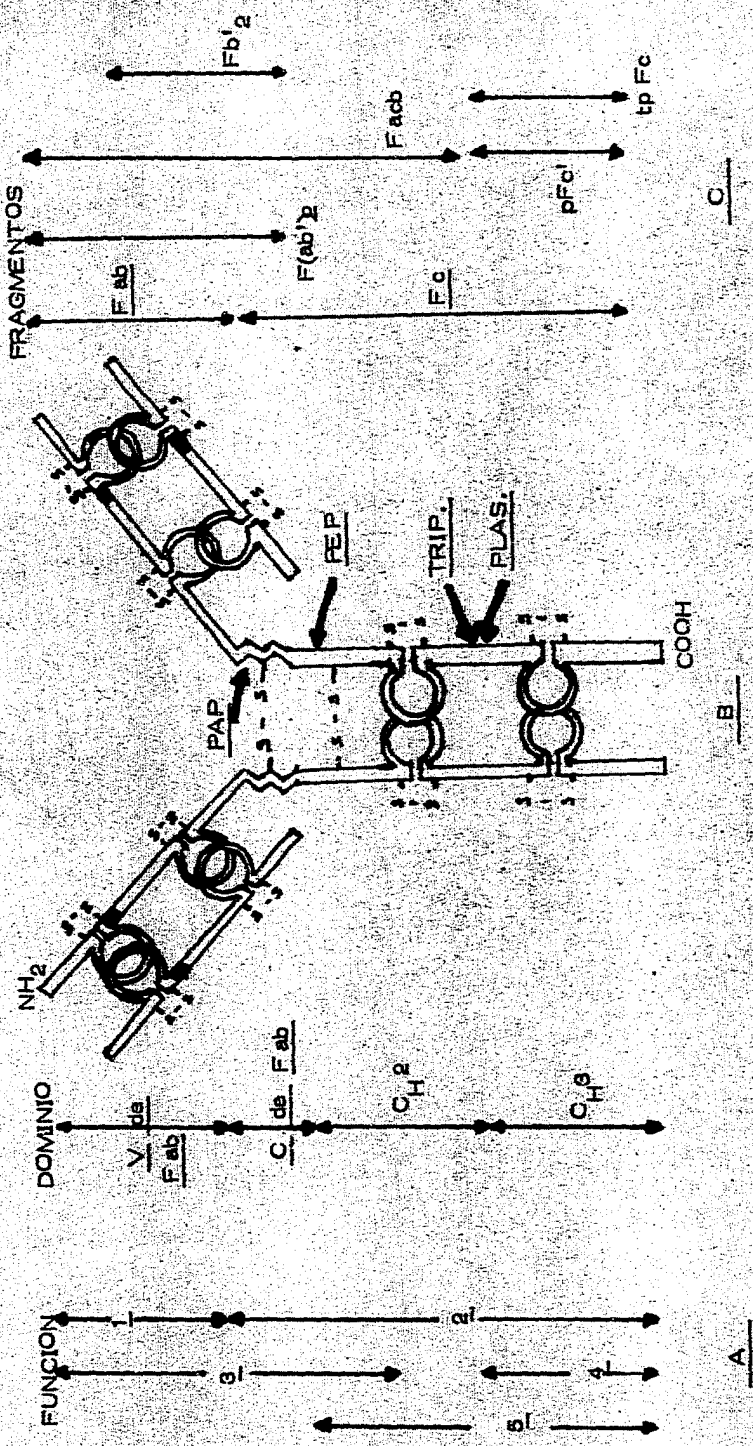


Figura 3.- Composición diagramática de las funciones (A), estructura (B), y fragmentos obtenidos por digestión proteolítica (C) de las inmunoglobulinas. FUNCIONES: 1.- Unión del antígeno; 2.- Unión de la fracción C1q; 3.- Activación de la vía alterna del complemento; 4.- Citotóxico plasmio; 5.- Transporte transplacentario y hemostático. Modificado de Winkelhake, 1978.

En los mamíferos, se pueden encontrar cinco tipos de Ig denominados A, D, E, G, M, que difieren entre sí en el tipo de cadenas pesadas que pueden ser α , δ , ϵ , γ , μ , de acuerdo a su estructura primaria (Nossal, 1978). Por otro lado, el tipo de cadenas L pueden ser sólo de dos tipos: κ ó λ que pueden combinarse con cualquiera de los tipos de cadena H.

La función de los diferentes tipos de Ig no es la misma, así por ejemplo, la IgA es la responsable de la defensa inmunitaria en zonas expuestas al exterior por lo que está presente en las secreciones como lágrimas, sudor, moco, mientras que la IgD forma un receptor que inicia la proliferación de los linfocitos B de ratón (Sieckmann, et al., 1982), la IgE promueve la liberación de histamina de las células cebadas, la IgM activa efectivamente la vía citocida del complemento y la IgG protege al feto y promueve la fagocitosis entre otras funciones (Rose, 1982).

Existen líneas celulares originarias de células productoras de Ig que suman cientos en el caso de líneas de origen humano y muchos miles para el caso de ratón, aunque también existen algunas líneas linfoides de otros mamíferos y aves (Ralph, 1981). En ratones existen entre 10^3 y 10^4 líneas de mielomas incluyendo aquellas que no han sido adaptadas a condiciones de cultivo in vitro (Ralph, 1981), de las cuales la mayoría pertenecen a tumores inducidos en la cepa Balb/c (Raschke, 1980). En sí el mieloma es un tumor de células que secretan Ig inespecíficas que se manifiesta en los estadios terminales de la maduración de

linfocitos B. Sin embargo, se han encontrado células mutantes que han perdido la capacidad de secretar la Ig ya sea en forma total (Kearney, et al., 1979) o parcial (Kohler y Milstein, 1975). Se puede utilizar la capacidad que tienen las células tumorales de crecer indefinidamente, para poder estudiar cierto tipo de características mediante la hibridación de estas células con aquellas que muestran las propiedades que interesan en el estudio como es la producción de anticuerpos monoclonales.

El fenómeno de la hibridación celular es un proceso espontáneo pero muy poco frecuente. El primer grupo de investigadores que observó este proceso fue el encabezado por Georges Barski en París, a principios de la década de los sesentas (Barski, et al., 1961). Como muchos otros descubrimientos, el de la hibridación celular fue por una casualidad ya que el objetivo de los trabajos de Barski, era observar lo que acontecía cuando se transformaban las células de ratón con agentes parecidos a Pneumococcus (Barski, et al., 1961). Originalmente, él trabajó con dos líneas celulares provenientes del mismo cultivo inicial pero que diferían en su morfología y número cromosómico. En un cultivo se pusieron a crecer células de ambos tipos y al cabo de tres meses se obtuvieron células que eran diferentes a las parentales, caracterizadas por tener un número cromosómico modal casi igual a la suma de ambos tipos celulares parentales, que presentaron esencialmente casi todos los cromosomas marcadores de las dos líneas progenitoras (Barski y Cornefert, 1962).

Una de las líneas de investigación estuvo dedicada a buscar agentes que aumentaran la frecuencia de fusión, utilizando principalmente a los virus del tipo de los Paramixovirus. El virus hemaglutinante del Japón o virus de Sendai fue el fusógeno clásico durante mucho tiempo, pero requería que las células a fusionar presentaran receptores para este virus ya que si esto no ocurría, la eficiencia de la hibridación disminuía notablemente.

Para evitar esto, era necesario contar con un agente inespecífico que propiciara la fusión celular. Se encontró que este agente era el polietilenglicol (PEG) (Geffer, et al., 1977), cuyo mecanismo de acción se desconoce. El PEG no es el único agente químico que promueve la fusión sino que también hay otros que se utilizan como materia prima para la fabricación de cosméticos (Klebe et al., 1981), y campos eléctricos (Zimmerman, 1981; 1982; Richter, et al., 1981).

La fusión celular no está restringida a las células animales sino que también se ha hecho utilizando células vegetales (Robert, 1981; Xianghui, et al., 1982), tanto en estudios de fitomejoramiento como de bioquímica, fisiología y embriogénesis. Al igual que en células animales, en vegetales no es necesario utilizar las zonas meristemáticas para efectuar la fusión, pero se prefieren estas zonas por su gran capacidad de proliferar. El problema obvio que se presenta al trabajar con células vegetales, es la presencia de la pared celular, la cual puede ser retirada si se hace una digestión enzimática de ella utilizando celulasa y pectinasa para

obtener los protoplastos (Xianghui, et al., 1982).

Durante muchos años la única evidencia con que se contaba para mostrar el carácter híbrido de las células fusionadas, era la citogenética (Barski y Cornefert, 1962). Posteriormente, se ha utilizado el análisis bioquímico para detectar moléculas producidas por algunas de las células parentales (Kohler y Milstein, 1975; Xianghui, et al., 1982)

Una línea de investigación que atendía a la producción de híbridos entre células linfocíticas normales y células de mieloma para tratar de esclarecer la regulación de los genes de las Ig, que producían las células normales, dió como resultado totalmente fortuito la tecnología de los anticuerpos monoclonales (Kohler y Milstein, 1975).

Actualmente, se está desarrollando a nivel mundial el campo de investigación que abrieron Kohler y Milstein. Esta tecnología ha mostrado su potencialidad como productora de herramientas biológicas que hacen más confiables y reproducibles las técnicas de detección de moléculas por medio de anticuerpos. Este tipo de reactivos ha invadido varios campos de investigación tanto a nivel básico como aplicado (Yeiton y Scharff, 1980; David, et al., 1981; Pawlita, et al., 1981; Sevier, et al., 1981; Reichardt y Matthew, 1982).

Las ventajas que ofrecen los anticuerpos monoclonales son esencialmente su alta especificidad debida a su capacidad de detectar un sólo determinante antigénico y debido a que provienen de una

sola línea celular que secreta un sólo tipo de Ig, todo el anticuerpo que se logre aislar tiene la capacidad de reconocer homogéneamente un sólo determinante (Milstein, 1981), disminuye de esta forma la conocida reacción cruzada que se observa muy frecuentemente en los anticuerpos policlonales aislados de heterosueros (Yelton y Scharff, 1980).

Por otro lado, la cantidad de anticuerpos que se puede obtener en sistemas in vivo es muy alta, del orden de los miligramos. Además, esta productividad se incrementa por la disponibilidad de células híbridas denominadas hibridomas, que pueden cultivarse y congelarse durante varias veces, haciendo casi infinita y perpetua la producción de este tipo de anticuerpos, evita al mismo tiempo las variaciones en la especificidad del anticuerpo aislado de dos lotes diferentes de suero, de dos animales o aún entre sangrados sucesivos del mismo animal.

Igualmente, pueden producirse un sinnúmero de anticuerpos monoclonales contra casi todos los determinantes antigénicos imaginables, con la única restricción de que el organismo al cual se le introduzcan, sea capaz de producir un anticuerpo contra ese determinante en particular. Al poder obtener varios anticuerpos monoclonales contra diferentes determinantes de un solo antígeno se podrían combinar y hacer un antisuero totalmente sintético que pueda detectar al antígeno en un 100% y en muy bajas concentraciones. Trabajos de este tipo se han realizado recientemente (Ehrlich, et al., 1982).

En el presente trabajo se usó como antígeno Mt para poder producir anticuerpos del tipo monoclonal.

Nos propusimos como objetivo crear al menos una línea de células híbridas que produzcan anticuerpos monoclonales en contra de este metoxindol, lograr la producción a gran escala, purificarlos y probar su funcionalidad mediante técnicas inmunoquímicas.

MATERIALES Y METODOS

I. Obtención del antígeno.

El antígeno que se utilizó fue un conjugado de Mt con tiroglobulina humana (TGH), obtenido en el Departamento de Biología de la Reproducción de la División de Ciencias Biológicas y de la Salud, U.A.M.-Iztapalapa, por la Dra. Inés Forray, quien utilizó el método de Arendt (Arendt, et al., 1975) que consiste en acetilar el D,L-5 metoxitriptofano (Sigma chem.) con acetato acético y obtener la D,L-5 metoxi-N-acetilriptamina o Mt. De este compuesto se tomaron 50 mg que se disolvieron en 5 ml de dioxano (Baker, México). Se adicionaron 50 mg de TGH en buffer de fosfatos 0.05 M, pH 7.8 en 3.4ml de volumen final. Se agregaron 1.67 mg de 1 etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodimida (Aldrich Chemical Co.) en 2.5ml de agua bidestilada. Se mezclaron y dejaron reaccionar por 24 hs en la obscuridad. Pasado el tiempo de reacción, la muestra se dializó durante 72 hs contra agua desionizada, haciendo los cambios aproximadamente cada 12 hs.

II. Inmunización de los ratones.

Este procedimiento se hizo en ratones de 4 a 6 semanas de edad, de la cepa Balb/c, obtenidos del Bioterio del Centro Médico Nacional, IMSS.

Por cada animal se tomaron 100 µg del conjugado Mt-TGH suspendidos en 250 µl de solución salina balanceada de Hanks (HBSS, Microlab, México) y emulsionados con 250 µl de adyuvan-

te completo de Freund (CFA, DIFCO Labs, Detroit, MI, U.S.A.) que contenfa Bordetella pertussi inactivada.

La emulsión se inoculó en una dosis vfa intraperitoneal (IP) en un lote de 3 ratones que recibieron cada uno de ellos 500 μ l del inóculo. A las cuatro semanas se aplicó una segunda inmunización utilizando la misma vfa con 100 μ g del conjugado Mt-TGH, suspendidos en 500 μ l de HBSS por cada animal inmunizado.

III. M a n t e n i m i e n t o d e l a s c é l u l a s d e m i e l o m a .

Las células parentales con la característica de crecer indefinidamente en cultivo in vitro que se utilizaron en este estudio fueron de la línea de plasmacitoma de ratón P3X63Ag8. Esta línea celular es resistente a la 8 azaguanina 10^{-3} M, pues son deficientes en la enzima Hipoxantin-guanin-fosforribosil-transferasa (HGPRT); secreta IgG₁ κ (γ_1, κ) pero no secreta cadenas ligeras o pesadas aislada (Kohler y Milstein, 1975).

Las células de mieloma se mantuvieron en crecimiento como cultivo continuo a 37°C con 7% de CO₂ en aire húmedo. Se utilizó medio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM, Microlab, México) adicionado con:

suero fetal de ternera (lote 8557 Jr. Scientific, Corp. U.S.A.)*.....	10 ml.
glutamina (Microlab, México)	2 X 10 ⁻⁶ M.
gentamicina (Schramex, México)	0.1 mg/ml.
2-mercaptoetanol (J.T.Baker, U.S.A)	5 X 10 ⁻⁵ M.

*Inactivado a 56°C por 30 min y filtrado en membrana Millipore de 0.45 μ m.

IV. Fusión Celular

El método utilizado fue una modificación del reportado por Oj y Herzenberg (1981). La fusión se realizó tres días después de la segunda inmunización disectando asépticamente los bazo de los tres ratones. Se maceraron sobre un cedazo metálico con ayuda de un pistón de vidrio recogiendo las células en HBSS en una caja de petri. Todo el procedimiento se hizo a 37 °C en condiciones estériles.

Una vez disgregados los órganos, los esplenocitos que son esencialmente linfocitos B (Shen, et al., 1982), se colocaron en un tubo de centrifuga estéril de 15 ml (Costar) y se centrifugaron a 112 Xg durante 10 min en una centrifuga Sorvall LC-50. Se les retiró el sobrenadante, se resuspendió en HBSS y centrifugó una vez más a 112 Xg por 10 min. Se les retiró el sobrenadante, se resuspendieron en 5 ml de HBSS.

Como células acompañantes se utilizaron timocitos que acondicionaron el medio en el cual crecieron los hibridomas sin tener efectos colaterales que interfirieran con su desarrollo (Namba, et al., 1982). Estas células acompañantes, se obtuvieron disectando el timo de un ratón normal de 3 a 4 semanas de edad. Al igual que los bazo, los timos se disgregaron sobre el cedazo metálico.

La suspensión de timocitos se colocó en un tubo de centrifuga estéril de 15 ml y se centrifugó a 112 Xg durante 10 min retirándoles el sobrenadante al terminar de centrifugarse. El paquete celular se resuspendió en el medio-HAT que contenía:

hipoxantina (Sigma Chem. Co.) 10 mM.
 aminopterina (Sigma Chem. Co.) 0.4 M.
 timidina (Sigma Chem. Co.) 160 mM.
 Medio de cultivo suplementado c.b.p. 10 ml.

Como puede verse, en el medio selectivo se encuentra la aminopterina que es un análogo del ácido fólico. La enzima folato-deshidrogenasa no puede distinguir entre el ácido fólico y la aminopterina. La folato deshidrogenasa es una de las varias enzimas que intervienen en la vía normal de síntesis de nucleótidos a partir de aminoácidos y azúcares, por lo que al estar presente la aminopterina en el medio, esta vía se encuentra bloqueada.

En este medio se encuentran también la hipoxantina y la timidina. Estos nucleósidos pueden ser tomados por las células para, a partir de ellos, formar nucleótidos necesarios para sintetizar el ADN. Esta vía, conocida como vía de salvamento o alterna necesita de dos enzimas: la timidina quinasa y la HGPRT.

Debido a que las células del mieloma carecen de la HGPRT, no pueden utilizar la vía alterna de síntesis de nucleótidos, las únicas células que pueden proliferar en cultivo durante tiempos largos son los hibridomas, de acuerdo al sistema de Littlefield (1964) modificado por Ephrussi (1972).

Se contaron por separado las células de mieloma y los esplenocitos en cámara de Neubauer, con ayuda de la prueba de exclusión del azul tripano para viabilidad celular. En un tubo de centrifuga estéril de 50 ml (Costar), se colectó el volumen necesario

para tener 5×10^7 células de mieloma y 1.5×10^8 esplenocitos, centrifugándolos a $112 \times g$ por 10 min. Se les retiró el sobrenadante y se agregó 1 ml de PEG 1540 (J.T. Baker.) estéril disuelto al 50% (peso/vol.) en DMEM a $37^\circ C$, agitando continuamente durante 1 min. La agitación se prolongó por 1 min más al término del cual se agregaron 2 ml de DMEM durante 2 min y después otros 7 ml en 2.5 min agitando constantemente. La muestra se centrifugó por 10 min a $112 \times g$ retirándose el sobrenadante. El paquete celular se resuspendió en 48 ml de medio HAT-timo y de esta suspensión se colocó 1 ml en cada uno de los pozos de 2 placas de 24 pozos (Linbro, Flow Labs.). Siete días después de la fusión se les agregó 1 ml de medio HAT libre de timocitos a cada pozo.

V. D e t e c c i ó n d e h í b r i d o m a s p r o d u c t o r e s d e a n t i c u e r p o s e s p e c í f i c o s .

El ensayo de detección de anticuerpos se realizó aproximadamente a los doce días de la fusión celular, cuando se observaron colonias de células. La localización de colonias híbridas productoras de anticuerpos contra Mt se hizo mediante una modificación a la técnica del ensayo inmunoabsorbente con enzima acoplada (ELISA) propuesta por Engvall y Perlmann (1972), que consistió en colocar 0.5 μg del conjugado en 50 μl de agua desionizada, dentro de cada uno de los pozos de una placa de 96 (Linbro Flow Labs.), incubándose a $37^\circ C$ hasta desecación. Se lavó la placa con PBS 0.01 M pH 7.2 y se colocaron 50 μl del so-

brenadante de los pozos de la placa a probar incubándose a temperatura ambiente por 20 min .

Transcurrido el tiempo se lavó la placa con una solución acuosa de detergente tween 80 , 0.5% (v/v) y se agregaron 50 μ l de peroxidasa de rábano conjugada con anticuerpos de cabra anti-IgG contra las cadenas H y L de ratón (Cappel, Laboratories) diluida 1:500 en Na_2HPO_4 10 mM , NaCl 0.5 M , pH 8 , permitiendo que se llevara a cabo la reacción antígeno-anticuerpo incubando por 10 min a temperatura ambiente.

Se lavó la placa nuevamente para retirar el exceso de enzima y se agregaron 100 μ l del sustrato preparado con 5 ml de ácido cítrico (Baker, México) 0.05 M , pH 4.0 , 25 μ l de H_2O_2 0.5 M (Baker, México) y 20 μ l de 2,2'-azino di-(3-etilbenzotiazolin) sulfónico 40 mM (ABTS, Sigma Chem. Co.). En el transcurso de un tiempo aproximadamente de 30 min , se observó la aparición de una coloración verde que ponfa en evidencia los pozos con colonias productoras de anticuerpo específico.

VI. Clonación y expansión de células híbridas .

Para obtener timocitos y usarlos como células acompañantes, se sacrificó un ratón de 4 semanas por cada placa de clonación. Se disectó asépticamente el timo y se procesó como se mencionó antes. Al final del tratamiento se resuspendieron las células en DMEM con el 15% FCS adicionado de hipoxantina 10 mM y timidina 160 mM (DMEM-HT) .

Los hibridomas de los pozos positivos al ensayo de anticuerpos se contaron en cámara de Neubauer, tomando 2,500 células que se suspendieron en 10 ml de DMEM-HT adicionado de timocitos. De esta suspensión se colocaron 100 μ l en cada uno de los pozos de una placa de 96 y se incubaron como antes, quedando 25 hibridomas por pozo. Una semana después se les agregó 0.1 ml de DMEM-HT libre de timocitos a cada pozo de clonación y a los 12 días se realizó el ensayo de anticuerpos. El proceso de clonación se repitió tres veces más.

Para la producción masiva del anticuerpo, las células de los pozos positivos de la cuarta clonación se expandieron a pozos de mayor superficie. Finalmente, las células de estos pozos se pasaron a botellas Falcon T-25 (Corning, Costar), hasta que las células se tuvieron en un volumen de 10 ml aproximadamente.

A ratones Balb/c de 4 semanas se les inoculó 0.5 ml de pristán (2,6,10,14 tetrametilpentadecano, Aldrich Chemical) por vía I.P. 3 y 10 días antes de que se les inyectaran 3×10^6 células vivas resuspendidas en 500 μ l de DMEM por vía I.P. para producir el tumor. Entre los días 13 y 15 se les extrajo el líquido ascítico introduciendo 5 ml de HBSS y extrayendo tanto líquido como fue posible. El líquido ascítico se centrifugó por 10 min a $112 \times g$ y el sobrenadante se precipitó al 50% de saturación con $(NH_4)_2SO_4$ sólido (Lab. Químicos Monterrey, México) a 25 °C con agitación constante durante 40 min. Se centrifugó a $32,000 \times g$ durante 60 min en centrifuga preparativa Beckman J21 con rotor J20 a 4 °C.

El precipitado se sometió a diálisis contra 400 volúmenes de PBS 0.015 M , pH 6.2 a 4°C , durante 72 hs con cambios al minuto 40 de iniciada la diálisis y posteriormente cada 24 hs . Al dializado se le midió la absorbancia a 280 nm en espectrofotómetro Zeiss mod. PM-6 . La evidencia de la pureza de las proteínas que se suponía eran Ig , se hizo por medio de electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones reductoras de acuerdo al método de Studier (1973). El gel separador se preparó con:

Sol. de acrilamida 30% (Bio-Rad, Labs.)	10.0 ml
Sol. de bisacrilamida 1% (Bio-Rad, Labs)	3.9 ml
Amortiguador Tris 1.5M, pH 8.7 (Sigma Chemical Co.)	8.1 ml
Sol. de SDS 20%	0.15ml
Agua bidestilada	7.9 ml

Se desgasificó la solución durante 10 min y se agregó 0.03% de tetrametiletilendiamina (TEMED, Bio-rad, Labs.), 0.33% de persulfato de amonio (APS, Sigma Chem. Co.) y se colocó en el molde de un aparato de electroforesis en placa Bio-Rad, dejando gelificar durante 30 min a temperatura ambiente.

Una vez polimerizado el gel separador se preparó el gel concentrador con:

Sol. de acrilamida 30%	1.67ml
Sol. de bisacrilamida 1%	2.6 ml
Amortiguador Tris 1 M, pH 6.8	1.25ml
Sol. de SDS 20%	0.05ml
Agua bidestilada	4.4 ml

Se desgasificó de igual manera que el gel separador agregando

0.05% TEMED , 0.5% APS (sol. base al 10%) como catalizadores y poniendo la solución sobre el gel separador, se dejó polimerizar durante 30 min con un peine para marcar los carriles. La muestra de proteínas se colocó en buffer (5% de SDS , 0.4 ml de Tris 1M pH 6.8 , 0.5 ml de glicerol, 30 µl de azul de bromofenol al 0.2% y 3.8 ml de agua destilada) calentándose a ebullición por 3 min antes de aplicar 50 µl por carril. Después de la aplicación de la muestra se colocó el dispositivo dentro de la tina de electroforesis, llenando ambos compartimientos con buffer Tris-glicina pH 8.3 (0.025 M de Tris, Glicina 0.192 M, 0.1% SDS) y se puso en condiciones de corrido: 20 miliamperes hasta que el colorante llegó a la zona de contacto entre el gel concentrador y el separador y posteriormente a 40 mA , se dejó correr hasta que el colorante estuvo a 1 mm del extremo inferior del gel después de aproximadamente 4 horas .

Una vez concluida la corrida se pasó el gel a una solución de etanol: ácido acético: agua (45:1:45) que contenía 0.1 g de azul de Coomassie brillante R250 (Sigma Chem. Co.) durante 24 hs , después de las cuales se pasó a solución de destañido (etanol: ácido acético: agua 45:1:45) cambiando la solución hasta tener un fondo más o menos claro y que se pudieran ver las bandas de proteínas.

VII. Especificidad de los anticuerpos.

Para confirmar el grado de reactividad de las Ig contra la Mt , así como su capacidad de discernir entre el hapteno y la proteína acarreadora, se hizo un análisis de anticuerpos, por medio

de ELISA, que contempló ambas posibilidades poniendo en algunos pozos Mt pura, en otros el conjugado Mt-TGH y en otros más TGH pura.

R E S U L T A D O S

Las células de mieloma se mantuvieron creciendo en fase log durante dos meses, en los cuales se vio que el riesgo de contaminación depende esencialmente de la manipulación que se les haga y el medio en el cual se pongan a crecer. El crecimiento de las células se ve afectado por el suero que se usa, para probar su eficiencia en este aspecto, se hizo una clonación por dilución limitante (Oj y Herzenberg, 1981). En este caso, se probaron sueros de caballo y diversos lotes de suero fetal de ternera; resultó ser el más efectivo el suero fetal de ternera lote 8557 de Jr. Scientific Co. (Woodland, Ca. U.S.A.), que permitió el crecimiento de 25 células de mieloma por pozo sin células acompañantes.

En cada microcultivo se tienen cinco opciones en las que se puede tener a las células : i) fusión entre células de mieloma , ii) fusión entre células de bazo, iii) células de mieloma no fusionadas, iv) esplenocitos no fusionados, v) fusión entre esplenocitos y mieloma. De todas estas posibilidades la única importante es la última ya que las otras se eliminan del cultivo por su sensibilidad a la aminopterina como en el caso de células de mieloma y las fusiones entre ellas, o bien por su poca capacidad de vivir y proliferar en condiciones in vitro, como sucede con las células de bazo y los híbridos entre ellas.

Sin embargo, no todos los híbridos entre esplenocitos y células de mieloma producen el anticuerpo específico, al hacer el ensayo de anticuerpos se seleccionaron únicamente aquellos pozos que

tuvieron colonias productoras.

En el presente trabajo, la eficiencia de fusión fue de un 100% indicando con esto que al menos hubo la formación de una colonia en cada uno de los pozos de las dos placas utilizadas para sembrar a las células recién fusionadas (Tabla 1).

Si se analiza el resultado numérico que se reporta sin atender a la metodología, podrían hacerse falsas interpretaciones, ya que al reportar en este trabajo el 100% de fusión podría tomarse que de las 50×10^6 células de mieloma y 150×10^6 de esplenocitos, se lograron producir 50×10^6 hibridomas provenientes de fusiones bazo-mieloma. En este caso, el 100% de fusión se refiere a la presencia de al menos una colonia de células híbridas en cada uno de los pozos de una placa de 24.

Al hacer el análisis de anticuerpos de estos pozos sólo el 4.2% tenía colonias que secretaban anticuerpos específicos contra el conjugado Mt-TGH (Tabla 2). Como se mencionó con anterioridad, el mieloma utilizado es del tipo secretor, existe entonces la posibilidad de que el producto de las células de mieloma aún sin fusionar tuviera reacción cruzada con el antígeno, haciendo difícil la localización de colonias productoras del anticuerpo. Para evitar esta posibilidad se hizo un análisis de anticuerpos en el cual se probó el sobrenadante de las células de mieloma y cuyo resultado fue negativo.

De los dos pozos con colonias productoras de anticuerpos se hizo la primera clonación en 288 microcultivos, de estos en 195

POZOS CON
COLONIAS (%)

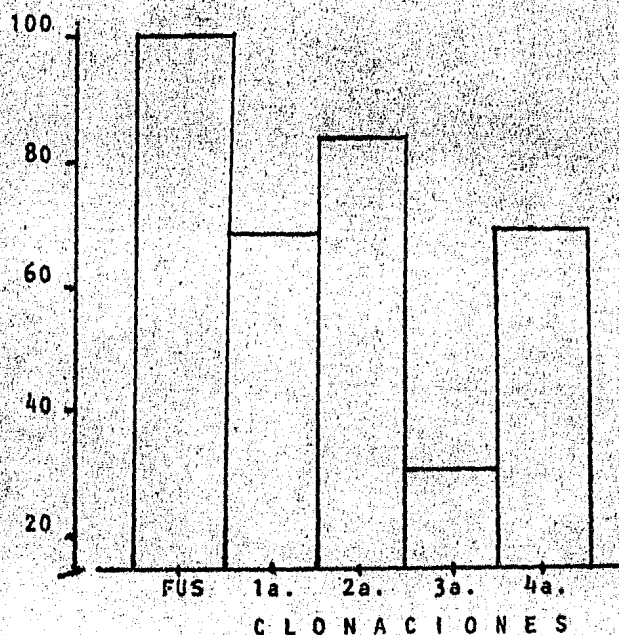


FIGURA 4. PORCENTAJE DE POZOS CON COLONIAS DE HIBRIDOMAS.

		POZOS		%
		ANALIZADOS	CON COLONIAS	
FUSION		48	48	100.0
CLONACIONES	1a.	288	195	67.7
	2a.	960	807	84.1
	3a.	960	294	30.6
	4a.	960	660	68.8

TABLA 1. RESULTADOS OBTENIDOS RESPECTO AL CRECIMIENTO DE COLONIAS HIBRIDAS EN MICROCULTIVOS INDEPENDIENTES.

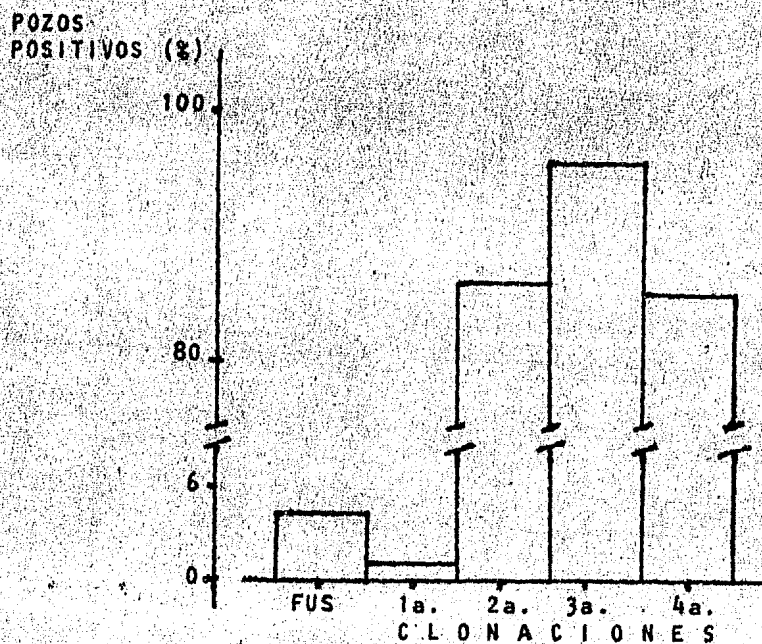


FIGURA 5. PORCENTAJE DE POZOS POSITIVOS AL ANALISIS PARA DETECTAR CULTIVOS QUE PRODUCEN ANTICUERPOS CONTRA MELATONINA (Mt).

		P O Z O S		%
		ANALIZADOS	POSITIVOS	
FUSION		48	2	4.2
CLONACIONES	1a.	95	1	1.1
	2a.	413	355	86.0
	3a.	94	90	95.8
	4a.	135	114	85.4

TABLA 2. RESULTADOS OBTENIDOS AL HACER EL ANALISIS DE ANTICUERPOS CONTRA Mt.

es decir en un 67,7% , hubo desarrollo de colonias en las cuales sólo el 1,1% fueron positivos al inmunoensayo de ELISA.

Para la segunda clonación se hicieron 960 cultivos provenientes del 1,1% resultante en la primera clonación, y de ellos el 84,1% tuvieron colonias siendo el 86% de ellos positivos a la prueba de ELISA . La tercera clonación se hizo con 5 pozos positivos seleccionando a aquellos que dieron la reacción más positiva y con el mejor crecimiento haciendo 192 microcultivos por cada uno de ellos. De esta clonación el 30,6% produjeron colonias y el 95,8% de estos secretaron el anticuerpo específico.

En la cuarta clonación, se eligieron 5 pozos bajo los mismos criterios anteriores realizando 192 cultivos de cada uno de ellos que dieron el 58,75% con colonias y 84,4 % positivos a la ELISA . En las figuras 4 y 5 se muestran las gráficas del número de pozos con colonias y el de pozos positivos al inmunoensayo , respectivamente.

Una vez hechas las clonaciones se seleccionaron 6 líneas para ser expandidas como paso previo a la producción masiva. De estas 6 líneas, sólo dos de ellas la C1 y la C3 mostraron un crecimiento vigoroso y fueron las que se introdujeron en ratones sensibilizados previamente con aceite mineral. En el caso de la línea C1 se inyectaron $3,6 \times 10^6$ híbridomas vivos, mientras que en el caso de la línea C3 se introdujeron 3×10^6 . Transcurridos diez días de la inoculación de los híbridomas, se notó el tumor ascítico en los ratones y ya antes de las tres semanas

mostraban un aspecto característico con el tumor bien desarrollado.

En el caso de la línea C1 se recuperaron 4 ml de líquido ascítico, mientras que de la línea C3 fueron 6 ml. Mediante un inmunoensayo se comprobó la actividad del líquido ascítico, dando resultados positivos en ambos casos, por lo que se procedió a hacer la purificación de las proteínas (IgG) de acuerdo a lo descrito. Una vez terminado el proceso de purificación se probó nuevamente la capacidad del purificado, para reconocer el antígeno con resultados positivos en ambos casos.

La absorbancia a 280 nm observada para la proteína purificada de la línea C1 fue de 4.09 unidades de densidad óptica (D.O) mientras que para la línea C3 fue de 3.15 D.O. Para hacer la conversión de unidades densitométricas a unidades de concentración, se utilizó la fórmula para Ig basada en el coeficiente de extinción molar (Schreier, et al., 1980):

$$Ig \text{ (mg/ml)} = (\text{Absorbancia a } 280 \text{ nm}) (0.8)$$

de acuerdo a la cual de la línea C1 se pudo obtener 6.54 mg de Ig (3.27 mg/ml, $V_f = 2 \text{ ml}$) presumiblemente monoclonal y la línea C3 dió 5.04 mg de Ig (2.52 mg/ml, $V_f = 2 \text{ ml}$).

Al correr la electroforesis en gel de poliacrilamida se observó que el purificado de la línea C1 muestra (Figura 6) las bandas características de una IgG, con tres contaminantes en cantidades pequeñas. El patrón electroforético de la línea C3 muestra también las bandas características de la banda IgG y

FIGURA 6. Patrón electroforético que se obtuvo con las proteínas purificadas del tumor ascítico para la línea C 1. En este caso, además de las bandas correspondientes a las cadenas H y L de las Ig, pueden observarse las bandas anódicas de tres contaminantes en bajas cantidades.

en este caso no se observan contaminantes (Figura 7).

En el inmunoensayo comparativo para conocer si los anticuerpos eran dirigidos contra el hapteno (Mt) o bien contra la proteína acarreadora (TGH), se observó que el proveniente de la línea C1 presentó reacción positiva cuando se utilizó como antígeno adherido a la fase sólida TGH no conjugada, fue incluso más intensa que cuando se utilizó como antígeno adherido a la fase sólida Mt pura.

La reacción de los anticuerpos provenientes de la línea C3 fue totalmente diferente, ya que cuando se utilizó TGH como antígeno adherido a la fase sólida, esta fue tan débil que se consideró como negativa mientras que cuando se utilizó Mt adherida a la placa, la reacción fue muy intensa, lo que puso en evidencia la afinidad de este anticuerpo para el hapteno.

FIGURA 7. Patrón electroforético de las proteínas provenientes del líquido ascítico purificado al 50% de saturación con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ para la línea C3. En este gel, se observan únicamente las bandas correspondientes a las Ig una vez que se rompieron los enlaces disulfuro : H y L .

D I S C U S I O N

En trabajos como el presente, es necesario conocer el rendimiento que se obtiene con la metodología para hacer el conjugado, ya que por ejemplo, en este estudio se utilizó un conjugado que tenía de 5 a 7 moléculas de Mt por molécula de TGH. Este tipo de conjugados es suficiente para desencadenar una buena reacción inmune en conejos (Furray, com. pers.), pero que quizá sea poco inmunogénica en el ratón.

El método de inmunización es importante y debe mostrar la forma más fácil de obtener títulos altos de anticuerpos, sobre todo porque esto implica que se tiene un buen número de células plasmáticas que secretan el anticuerpo específico, aunque esto no siempre tiene correlación (Sciebinsky, com. pers.). De cualquier forma, si se tiene una buena cantidad de células plasmáticas que secreten el anticuerpo, las posibilidades de poder "inmortalizarlas" es alto.

Existen métodos de inmunización tanto in vitro (Hengartner, et al., 1978; Borrebaeck, 1983) como in vivo, como el utilizado en el presente estudio. La ventaja que ofrecen los sistemas in vivo es asegurar la esterilidad en la que se desarrollan las células, sacrificando la exposición directa al antígeno que tienen las células en un sistema in vitro. En ambos casos, el título que se obtiene es alto (Borrebaeck, 1983) y en nuestro caso, aún y cuando no se tituló el suero que se obtuvo de los ratones utilizados, la solución de trabajo de este antisuero dió reacción

positiva a diluciones 1:1000 en el sistema de ELISA .

La necesidad de tener un buen suero para utilizarlo como suplemento del medio de cultivo se debe principalmente a que en este tipo de trabajos, se utilizan densidades celulares muy bajas aún y cuando se utilicen células acompañantes. En nuestras manos, el suero más eficiente fue el PCS lote 8557 de Jr Scientific Corp. permitiendo el crecimiento de 25 células de mieloma sin células acompañantes. Para algunos autores, este suero sería considerado como ineficiente y que en nuestro caso se estarían trabajando con cantidades extremadamente altas de células, por lo que nunca podría tenerse una colonia en un pozo con lo que las "clonaciones" que se hicieran con este suero no tendrían validez. Sin embargo, como se discutirá más ampliamente en párrafos posteriores, esto es sólo un punto de vista.

En los inicios de la hibridación celular era importante que las células a fusionar tuvieran receptores para el fusógeno que era el virus de Sendai, así pues esta línea presenta receptores para la proteína hemoaglutinante del virus. Esto puede ser importante sobre todo actualmente cuando algunos investigadores están utilizando proteínas virales aisladas (Kruse, et al., 1981). El utilizar estas podría traer ciertas ventajas ya que al emplear fusógenos químicos inespecíficos y comparar sus resultados con fusógenos de cierta especificidad, es posible que aumente el porcentaje de fusión debido también a una disminución en la toxicidad. Por otro lado, se ha reportado que los hibridomas producen además de anticuerpos monoclonales partículas virales completas, del tipo

C (Weiss, 1982), aunque no se ha mostrado que sean activos.

Respecto al PEG como fusógeno, influye desde la marca hasta el lote. Existen reportes (Mercer y Baserga, 1982) en los que se muestra que algunas marcas comerciales específicas brindan mejores resultados que otras, de tal manera que lo primero que se debe hacer en trabajos como el presente es probar diferentes marcas y lotes de PEG .

Otro aspecto importante es el peso molecular de este fusógeno. Mercer y Baserga (1982), señalan que mientras mayor sea el peso molecular promedio del PEG, sus efectos son más tóxicos. En cambio, la eficiencia de la fusión es inversamente proporcional al peso molecular del PEG . Existen métodos con los que se trata de incrementar la eficiencia de fusión como es variar el pH de la solución, eliminar los cationes divalentes del medio (Mercer y Baserga, 1982), emplear además dimetil-sulfóxido (Norwood y Ziegler, 1982), lectinas (Szoka, et al., 1981), inductores de la diferenciación y crioprotectores (Klebe y Mancuso, 1982; Westerwoldt, et al., 1983) entre los principales. En nuestro caso, el uso del PEG 1540 de J.T. Baker lote 730355 dió buenos resultados, ya que se obtuvo al menos una colonia de células híbridas en cada uno de los pozos de las placas de fusión.

La línea celular que se utilizó fue la P3X63Ag8 derivada de la MOPC-21 (Kohler y Milstein, 1975) dentro de una serie de plasmacitomas similares como el NSI-Ag4/1 (Kohler, et al., 1976), SP2/O-Ag14 (Schulman, et al., 1978), P3X63Ag8.6.5.3 (Kearney, et al., 1979), FO (Fazekas de St. Groth y Scheidegger, 1980) 6

la línea del plasmacitoma de rata FOX-NY (Taggart y Samloff, 1983). Excepto la última, todas las demás se obtuvieron a partir de la línea MOPC-21 así pues, las líneas P3X63Ag8 y NSI-Ag4/1 fueron las primeras variantes; las P3X63Ag8.6.5.3 y FO son derivadas no secretoras de Ig de la P3X63Ag8 y la SP2/O-Ag14 es un hibridoma entre células normales de ratón Balb/c y P3X63Ag8 que tampoco secreta Ig.

Se utilizó la línea P3X63Ag8 en este estudio debido a que mostró una velocidad de proliferación mayor que la SP2/O-Ag14 en las condiciones que aquí se reportan. Aún y cuando las células del mieloma secretan IgG₁ (γ_1, κ , Kohler y Milstein, 1975), en un estudio previo en donde se probó la capacidad de tener reacción cruzada, ya sea con la proteína o contra la Mt, en el sobrenadante de los cultivos de mieloma el resultado fue negativo, por lo que al efectuar el inmunoensayo, los pozos que mostraron el cambio de color ponían en evidencia las colonias productoras del anticuerpo contra el conjugado.

Por error, se utilizó el conjugado Mt-TGH como antígeno adherido a la fase sólida en la ELISA para detectar el anticuerpo específico a lo largo del proceso de selección para la posterior clonación de las células, cuando debió haberse utilizado otro tipo de proteína acarreadora como la albúmina u otra o bien utilizar Mt pura. Cuando se utilizó Mt adherida, al colocar el sobrenadante de los pozos en que crecían los hibridomas y donde supuestamente se tenía el anticuerpo, los resultados fueron negativos. Existían dos puntos de vista para la interpretación de este

resultado. El más evidente era que no había anticuerpos específicos contra el conjugado o también que la cantidad del anticuerpo era muy baja que, aunado a la baja afinidad de este no pudiera reconocer al conjugado. La segunda opción pudiera ser la acertada ya que se ha visto que la producción de anticuerpos monoclonales en sistemas in vitro es baja y requiere dejar que el cultivo muera por sobrepoblación para tener una cantidad mínima de anticuerpo monoespecífico.

En términos generales, la metodología utilizada tiene ciertas ventajas ya que además de las células acompañantes que se colocan con las células híbridas, la manipulación que se hace de ellas es menor con respecto a la técnica original, con lo que se reduce drásticamente la posibilidad de contaminación.

Una metodología alternativa que evitaría igualmente la manipulación excesiva de los cultivos, consistiría esencialmente en tener a las células híbridas en volúmenes grandes, para que al momento de que fueran sembradas, tuvieran un aporte de nutrientes suficiente como para poder soportar su crecimiento en tiempos relativamente largos de aproximadamente siete días. Sin embargo, podría presentarse el problema de tener tan pocas células que morirían por no poder acondicionar el medio de tal manera que se permitiera su crecimiento.

La metodología aquí reportada brinda la ventaja de asegurar la formación de células híbridas, sin embargo, trae consigo otro tipo de problemas que tienen que ver con el rastreo de las clonas productoras del anticuerpo específico. Si en un sólo pozo se pue-

de tener un gran número de colonias y sólo unas cuantas son las productoras del anticuerpo. ¿Cómo poder identificarlas y posteriormente aislarlas para poder asegurar la homogeneidad del anticuerpo? ¿Cómo distinguir si la colonia que presenta una mayor velocidad de crecimiento es la que está produciendo el anticuerpo específico? En relación a la identificación y aislamiento de las colonias, el número promedio por cada pozo de fusión fue de cinco, con lo cual la posibilidad de encontrar a la colonia productora del anticuerpo era del 20% en cada microcultivo.

Al hacer el análisis de anticuerpos se encontró que sólo dos de los cuarenta y ocho pozos iniciales eran los que tenían células productoras del anticuerpo específico, lo cual abrió la posibilidad de aumentar el número de placas y por consiguiente el de microcultivos que se podrían hacer de estos cultivos originales. En la técnica alternativa el alto número de colonias disminuye considerablemente debido a que al momento de la fusión se está haciendo simultáneamente una clonación de las células recién hibridizadas, lo cual facilita la detección de las colonias de interés.

Para tratar de contestar a la pregunta que se refiere a la velocidad de proliferación de las células productoras del anticuerpo específico, hay autores como Fazekas de St Groth (1980) y De Blas y colaboradores (1981), que proponen que las colonias con menor velocidad de proliferación son las mejores productoras del anticuerpo. Sin embargo, es posible que estas colonias dada su baja celularidad, se pierdan por competencia con otras que tengan una velocidad de proliferación mayor. Esta competencia puede

darse tanto a nivel de nutrientes como de espacio ya que la colonia "lenta" ocupará un espacio menor en el mismo tiempo cuando se compara con la colonia "rápida".

Ahora bien, cuando se atiende a su metabolismo y específicamente a la síntesis de Ig, supongamos como sugieren Fazekas de St. Groth (1980) y de Blas, et al., (1981) que las colonias lentas son "buenas" productoras de Ig y las colonias rápidas son "regulares" o "malas" productoras de estas proteínas. En el mismo lapso una mala productora de Ig producirá una cantidad de proteína igual a la de una buena productora al ser mayor el número de células que la están produciendo. Por otro lado, a una colonia lenta tendrá que dársele un tiempo mayor para que pueda estabilizarse cromosómicamente, ya que en cada división celular tenderá a perder cromosomas. Debido a que esta pérdida es completamente aleatoria (Ephrussi, 1972), entre más tiempo tarde una línea celular en estabilizarse, aumentará la probabilidad de que pierda cromosomas importantes, como sería el caso del cromosoma X en el cual se encuentra el gene de la enzima con la que se hace la complementación metabólica del hibridoma o bien, aquellos que le dan capacidad de secretar y producir Ig como los cromosomas 2, 12 y 16 (Taggart y Samloff, 1983). Debido a estas razones, en este estudio se eligió una colonia con alta velocidad de crecimiento sobre aquellas en las que esta velocidad era baja.

El número de clonaciones que se hicieron parece exagerado ya que en la técnica original (Oi y Herzenberg, 1981) se da como número ideal dos clonaciones, aunque hay reportes en los cuales se

hace sólo una clonación (Andrews, et al., 1981; Herbst y Braun, 1981; Balachandran, et al., 1982; Bartek, et al., 1982; Dao et al., 1982; Erickson, et al., 1982; Ohara, et al., 1982).

Las clonaciones tienen como objetivo permitir la estabilización cromosómica de la línea celular y tener un método que asegure la homogeneidad de la Ig producida por estas células. En este caso, se hicieron cuatro clonaciones debido esencialmente a dos razones; el número de colonias por pozo de fusión y la eficiencia del suero utilizado.

Debido a que en los pozos de fusión se tenían varias colonias y al no poder aislarlas para trabajar con ellas por separado, al momento de hacer la clonación se contaba con una muestra más o menos heterogéneas de células provenientes de clones diferentes que bien podían o no producir la Ig.

Si se hubiera seguido la técnica original, la probabilidad de tener una célula productora de Ig aislada de otras no productoras era mínima. Existían dos maneras de aumentar la probabilidad de tener a estas células; la primera consistía en aumentar el número de microcultivos con la técnica original, con una célula por pozo o bien, aumentar el número de células en un número razonable de microcultivos.

La primera opción hubiera requerido hacer gran cantidad de microcultivos para que sólo el 20% de ellos en condiciones óptimas contuviera células productoras sin estar estabilizadas cromosómicamente aún, con lo cual disminuiría el número de pozos con

células productoras del anticuerpo específico. Esta opción se rechazó por su elevado costo debido a la cantidad de microcultivos y el tiempo que se requeriría para la práctica del inmunoensayo.

La segunda opción resultó más atractiva debido a que requería aumentar únicamente el número de clonaciones. Así pues, se colocaron 25 células híbridas en cada uno de los pozos de una placa de 96 y al menos cinco de ellas provendrían de la clona productora del anticuerpo específico con lo cual se aumentó la posibilidad de que la línea pudiera estabilizarse cromosómicamente.

La eficiencia del suero determina el tipo de clonación que debe realizarse, ya que la variación entre un lote y otro es muy alta. Existen sueros que permiten una baja densidad celular para que prosperen estos cultivos, pero también se tienen lotes que sólo permiten que prosperen los cultivos con densidades celulares muy altas. En el presente estudio, el suero utilizado no fue muy eficiente, permitió el crecimiento de 25 células de mieloma como mínimo. Si se hubiera hecho una clonación por dilución limitante en la que el número promedio de células por pozo va desde 0.5 hasta 10 resulta evidente que no hubieran sobrevivido por tratarse de híbridomas que son más frágiles que las células de mieloma. Cabe aclarar que se probaron diferentes marcas, lotes y tipos de suero antes de decidirse a utilizar el que se reporta.

Aún en la metodología original para la clonación, es poco probable poder colocar una sola célula en cada uno de los pozos debido principalmente a la atracción electrostática entre ellas.

En nuestras manos, a pesar de que se colocaban 25 células vivas en cada uno de los pozos de las placas de clonación, únicamente se tenía el crecimiento de cinco colonias como máximo. De cualquier forma, siempre se eligieron para clonación los pozos con menor número de colonias, generalmente en número de tres, y que provenían de los pozos más positivos, siendo por lo tanto equivalente nuestra metodología, con aquella que se trata de manejar en otros laboratorios.

El sistema de inmunoensayo que se utilizó puede hacerse cuantitativo o cualitativo, de cualquier forma es una medida de la concentración del anticuerpo (Engvall y Perlmann, 1972), aunque no tiene correlación cuando se trata de anticuerpos con afinidades menores a $6.3 \times 10^4 M^{-1}$ (Lehtonen y Eerola, 1982), puede decirse que también es una medida de la facilidad con que el anticuerpo reconoce al antígeno, mientras que el radioinmunoensayo (RIA) es una medida de la fuerza de la unión del anticuerpo con el antígeno. Por otro lado el método de la diálisis al equilibrio da valores absolutos a la concentración del anticuerpo y valores promedio a la afinidad (Lehtonen y Eerola, 1982). Debido a las características de ELISA y a su sensibilidad, pudiendo detectar desde 0.1 a 1 mg/l en algunos casos (Greener, 1983), se eligió como método de rastreo de colonias productoras del anticuerpo. Además, cuando el análisis de anticuerpo se hizo mediante la técnica del RIA los resultados fueron negativos (Forsay, com. pers.).

Con el método de ELISA, de las placas de la primera clonación el 1.1% de los pozos analizados fueron positivos lo cual po-

dría ser poco estimulante; sin embargo, este resultado puede evaluarse desde el punto de vista de la estabilización de la línea celular, ya que en los inmunoensayos de las clonaciones posteriores el porcentaje se eleva considerablemente siendo 85% para la segunda clonación, 95.8% para la tercera y 85.4% para la cuarta.

La disminución en la cantidad de pozos positivos que se observa entre la tercera y cuarta clonaciones podría indicar una pérdida de las células capaces de secretar Ig. Sin embargo, la variación podría ser explicada por la diferencia en el número de pozos analizados durante los ensayos de anticuerpos respectivos (Tabla 2). Esta afirmación podría interpretarse como pérdida de la capacidad de proliferación de los microcultivos. En este caso, la explicación que se tienen es la pérdida por manipulación de los microcultivos ya que durante esta etapa hubo varias contaminaciones siendo las más frecuentes por hongos filamentosos y levaduras que son los principales contaminantes en cultivos a largo plazo como los que se reportan aquí.

Una vez que se logró la cuarta clonación, había dos opciones para la producción masiva del anticuerpo, siendo una de ellas el cultivo in vitro (Herbst y Braun, 1981), y la otra, introducir a los híbridomas en un ratón (Oi y Herzenberg, 1981; Milstein, 1981; Parham, et al., 1982). Ambas opciones son dependientes de la proliferación celular y si se tomara una línea celular lenta, el proceso de readaptación de las células podría ser tan lento que mataría a los híbridomas, mientras que el tener una línea celular rá-

pida, podría facilitar este proceso de tal manera que el desarrollo del tumor ascítico, esté más o menos asegurado. Se eligió esta última para evitar el riesgo de contaminación del cultivo y poder obtener un título alto de éstos anticuerpos.

Existen diferentes metodologías para la purificación del anticuerpo monoclonal siendo las más utilizadas la precipitación con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ que puede ir seguida por una columna de afinidad (Ot y Herzenberg, 1981), pasar el líquido ascítico a través de una columna de Proteína A-Sepharosa (Mirr6, et al., 1981; Escribano, et al., 1981; Farrands, et al., 1982; Seeger, et al., 1982), columna de intercambio iónico (Hunter, et al., 1982; Parham, et al., 1982). Aunque, existen estudios en los que se utiliza el líquido ascítico libre de células sin purificarlo (Le Bien y Kershey, 1980; Doyen et al., 1981; Nowinski, et al., 1981; Lindgren, et al., 1982; Abraham, et al., 1983; Naz, et al., 1983; Sola, et al., 1983).

Ambos métodos, presentan ventajas. Así pues, al purificar el anticuerpo se están eliminando gran cantidad de proteasas que pueden restar actividad al anticuerpo por pérdida proteínicas. Sin embargo, durante el proceso de purificación puede alterarse la estructura de las Ig dando por resultado la pérdida de la actividad aún cuando estén presentes las proteínicas.

En el presente estudio, se purificaron los anticuerpos con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ sólido lo que brindó buenos resultados ya que al cambiar directamente la saturación, el grado de pureza es alto como

se muestra en las electroforesis de ambas líneas celulares debido, quizá, a que no se hace un "barrido" desde la ausencia total de sales en el líquido ascítico como cuando se utiliza la solución saturada de la sal. Por otro lado, cuando se emplea la solución saturada es de vital importancia la temperatura que debe ser baja, esto último es para mantener baja la actividad de las proteasas. Cuando se utiliza la sal en forma sólida este factor es despreciable ya que los anticuerpos son separados rápidamente de la solución.

El patrón electroforético de estas proteínas purificadas es igual al de las IgG, por lo cual se postula que el producto es una IgG con actividad de anticuerpo. Además, la información que brinda el patrón de la electroforesis es que en el caso de la línea C3, toda la proteína presenta el patrón de corrimiento de las Ig, mientras que la línea C1 presenta aún contaminantes menores.

Al practicar el inmunoensayo para probar la especificidad de los anticuerpos, se observó que el C1 tenía una fuerte reacción cruzada con la proteína acarreadora, mientras que el otro presentaba una unión preferencial al metoxiindol. La posible razón de la unión de los anticuerpos provenientes de la línea C1, puede ser el alto contenido de residuos de aminoácidos con cadenas laterales de anillos aromáticos que tiene la TGH ya que se ha reportado (Lejeune, et al., 1983) que tan sólo en un pequeño péptido que corresponde apenas del 1 al 3% de la proteína total, se tienen entre 15.3 y 16.4 residuos de aminoácidos aromáticos por mol

de péptido.

Por otro lado, existen reportes que indican que los anticuerpos monoclonales tienen reacción cruzada (Hedín, et al., 1982), lo cual invalidaría el uso de los anticuerpos monoclonales en la detección o caracterización de antígenos, ya que no existiría entonces el reactivo que detectara única y exclusivamente el antígeno sin que hubiera reacción cruzada. Aún cuando el anticuerpo monoclonal presenta reacción cruzada, la intensidad y extensión de ésta es menor que la que se encuentra en anticuerpos policlonales. Además al tratar de encontrar aquellos que reaccionen específicamente con el antígeno por adsorción a aquellos compuestos con los que se presenta la reacción cruzada, al ser homogénea la población de estos anticuerpos, al final del proceso no se tendría ningún anticuerpo pues todo estaría adherido al compuesto reactivo no específico (Diamond y Scharff, 1981).

En general, los anticuerpos monoclonales utilizados en investigación tienen constantes de afinidad relativamente bajas (Yelton, et al., 1982) y creemos que el anticuerpo monoclonal semiespecífico proveniente de la línea O3 que se obtuvo en el presente estudio no es la excepción, debido a la coloración verde pálido que dió en los inmunoensayos a lo largo de las clonaciones y al final del proceso de purificación, aún cuando no se determinó la constante de afinidad. Los anticuerpos monoclonales que se reportan aquí, pueden ser utilizados para purificar el metoxindol en columnas de afinidad ya que es posible retirar la Mt por elución de la columna cambiando únicamente la fuerza iónica. Igualmente,

si se utiliza este anticuerpo para la detección del metoxilindol o su cuantificación, el sistema en el cual funciona mejor es en el inmunoensayo de ELISA.

CONCLUSIONES

Mediante el uso de la técnica de anticuerpos monoclonales se logró obtener dos líneas celulares secretoras de anticuerpos que reconocen el conjugado Mt-TGH.

De estas dos líneas, una de ellas tiene reacción específica con la Mt siendo muy baja la reacción que tiene contra la TGH.

Se logró obtener gran cantidad de anticuerpos y con un alto grado de pureza, sobre todo en el caso de la línea C3 que reconoce específicamente la Mt aún y cuando sólo fue de líquido ascítico de un ratón.

Los anticuerpos que se obtuvieron pueden ser utilizados ya sea para la purificación o la detección y cuantificación del metoxindol. La purificación se puede hacer en columnas de afinidad y la detección o cuantificación se puede hacer en el sistema de ELISA .

R E F E R E N C I A S

- ABRAHAM, S.N., HASTY, D.L., SIMPSON, W.A., and BEACHEY, E.H. Antiahesive properties of a quaternary structure specific hybridoma antibody against types 1 fimbriae of *Escherichia coli*. *J. Exp. Med.* 158:1114. 1983.
- ANDREWS, P.W., KNOWLES, B.B., and GOODFELLOS, P.N. A human cell surface antigen defined by a monoclonal antibody and controlled by a gene on chromosome 12. *Somat. Cell Genet.* 17: 435. 1981.
- ANTON-TAY, F. Pineal Brain Relationships in "CIBA FOUND. Symp. on The Pineal Gland (G.E.W. Weistenholm, J. Knight, eds.) J.A. Churchill, Pub. (London): 213. 1971.
- ANTON-TAY, F. Clinical Effects of Melatonin. Proc. 4th. Internat. Congress Endocrinol. Washington, D.C. (USA). 1972.
- ANTON-TAY, F. Melatonin: Effects on Brain Function. *Adv. Biochem. Psychopharmacol.* 11: 315. 1974.
- ARENDR, J., PUNIER, L., and SIZONENKO, P.C. Melatonin Radioimmunoassay. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 40: 347. 1975.
- ASMA, G.N., VAN DEN BERG, R.L., and VOSSEN, J.M. Use of monoclonal antibodies in a study of the development of T lymphocytes in the human fetus. *Clin. Exp. Immunol.* 53: 429. 1983.
- AXELROD, J. The Pineal Gland: A neurochemical Transducer. *Science.* 184: 1341. 1974.
- BALACHANDRAN, N., HARNISH, D., RAWLS, W.E., and BACCHETTI, S. Glycoproteins of Herpes simplex Virus type 2 as defined by monoclonal antibodies. *J. Virology* 44: 344. 1982.
- BARTEK, J., VICLICKY, V.-FRANEK, F., ANGELISOVA, P., DRABER, P., JAROSICOVA, C., NEMC, M., and VERLOVA, H. Monoclonal antibodies against transferrin. Precipitating mixtures and lack of inter-species cross-reactivity. *Immunol Lett.* 4: 231. 1982.
- BAR TSCH, D., BAR TSCH, H., JAIN, A.K., LAUMAS, D.R., and WETTERBERG, L. Urinary melatonin levels in Human

- breast cancer patients. *J. Neural Transm.* 52: 281, 1981.
- BARSKI, G., SORIEUL, S., and CORNEFERT, F. "Hybrid" type cells in combined cultures of two different mammalian cell strains. *J. Natl. Canc. Inst.* 26: 1269, 1961.
- BARSKI, G., and CORNEFERT, F. Characteristics of "Hybrid" type clonal cell lines obtained from mixed cultures in vitro. *J. Natl. Canc. Inst.* 28: 801, 1962.
- BECK, O., BERG, S., and LUNDMAN, A. Concentration of 5 methoxyindoles in the human pineal gland. *J. Neural. Transm.* 54: 111, 1982.
- BEVERLY, P.C.L. The application of monoclonal antibodies to the typing and isolation of lymphoreticular cells. *Proc. Royal Soc. Edinburgh* 81B (4): 221, 1982.
- BORREBAECK, C.A. In vitro immunization for the production of antigen specific lymphocytic hybridomas. *Scand. J. Immunol.* 18: 9, 1983.
- BRAINARD, G.C., RICHARDSON, B.A., PETERBERG, L.J., and REITER, R.J. The effect of different light intensities on pineal melatonin. *Content. Brain Res.* 233: 75, 1982.
- BRANKOVAN, V., BEAN, M.A., MARTIN, P.J., HANSEN, J.A., SADA-MOTO, K., TAKAHASHI, Y., and AKIYAMA, M. The cell surface phenotype of a naturally occurring human suppressor T-cell of restricted specificity: Definition by monoclonal antibodies. *J. Immunol.* 131: 175, 1983.
- DAO, M.L., JOHNSON, B.C., and HARTMAN, P.E. Preparation of a monoclonal antibody to rat liver glucose-6 phosphate dehydrogenase and the study of its immunoreactivity with native and inactivated enzyme. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 79: 2860, 1982.
- DAVID, G.J., WANG, R., BARTHOLOMEW, R., SEVIER, D. ADAMS, T.H. and GREEN, H.E. The hybridoma -an immunochemical laser. *Clin. Chem.* 27: 1580, 1981.
- DE BLAS, A.L., RATNAPARKHI, M.V., and MASIMANN, J.E.N. Estimation of the number of monoclonal hybridoma in a cell fusion experiment. Effect of post-fusion cell dilution on hybridoma survival. *J. Immunol. Method.* 45: 109, 1981.

- DIAMOND, B., and SCHARFF, M.D. Monoclonal Antibodies. *J. Am. Med. Assoc.* 248: 3165. 1981.
- DODT, E., and MEISSEL, H. The pineal and parietal organs of lower vertebrates. *Experientia* 381: 996. 1982.
- DOYEN, N., PESCE, A.M., and LAPRESLE, C. Specificity of two antihuman albumin monoclonal antibodies. *Immunol. Lett.* 3: 365. 1981.
- EHRlich, P.H., MOYLE, W.R., MOUSTAFA, Z.A., and CANFIELD, R.E. Mixing two monoclonal antibodies yields enhanced affinity for antigen. *J. Immunol.* 128: 2709. 1982.
- ENGVALL, E., and PERLMANN, P. Enzyme-linked immunosorbent assay. ELISA III. Quantification of specific antibodies by enzyme labeled anti-immunoglobulin in antigen-coated tubes. *J. Immunol.* 109: 129. 1972.
- EPHRUSSI, B. Hybridization of somatic cells. Princeton Univ. Press. New Jersey. U.S.A. 175 pp. 1972.
- ERICKSON, R.P., KAY, G., HEWET-EMMET, D., TASHIAN, R.E., and LATHAMCHAFLIN, J., Cross reactions among carbonic anhydrases I, II and III studied by binding test and monoclonal antibodies. *Biochem. Genet.* 20: 809. 1982.
- ESCRIBANO, M.J., HADDADA, H., and VAUX SAINT CYR, Ch. Isolation of two immunoglobulin G subclasses, IgG₂ and IgG₁, from Hamster serum using protein A-sepharose. *J. Immunol. Method.* 52: 63. 1982.
- FARRANDS, P.A., PIMM, M.V., EMBLETON, M.J., PERKINS, A.C., HARDY, J.D., BALDWIN, R.W., and HARDCASTLE, J.D. Radioimmuno-detection of human colorectal cancers by an anti-tumor monoclonal antibody. *The Lancet* B295: 397. 1982.
- FAZEKAS DE ST. GROTH, S. Monoclonal antibodies and how to make them. *Transplantat. Proc.* 12: 447. 1980.
- FAZEKAS DE ST. GROTH, S. and SCHEIDEGGER, D. Production of monoclonal antibodies. Strategy and tactics. *J. Immunol. Method.* 35: 1. 1980.
- GEFTER, M., MARGULIES, D.H., and SHARFF, M.D. A simple method for polyethyleneglycol promoted hybridization of mouse myeloma cells. *Somat. Cell Genet.* 3: 231. 1977.

- GLASS, J.D., and LYNCH, G.R. Evidence for a brain site of melatonin action in the white footed mouse Peromyscus leucopus. Neuroendocrinol 34: 1, 1982.
- GOLUS, P., and KING, M.G. The effects of melatonin on open field behavior. Pharmacol. Biochem. Behav. 15: 883, 1981.
- GREENER, G. Principles and applications of heterogeneous enzyme immunoassays. In: Modern Methods in Protein Chemistry (H. Tschesche, ed) Walter de Gruyter and Co. (New York): 146. 1983.
- GROTA, L.J., and BROWN, G.M. Antibodies to indolealkyl amines: Melatonin and Serotonin. Can. J. Biochem. 52: 196, 1974.
- HAM, A.W. Tratado de Histología. 6a edición. Nueva Ed. Interamericana. (México): 860. 1970.
- HARLOW, H., PHILLIPS, J.A., and RALPH, C.L. Circadian rhythms and the effects of exogenous melatonin in the nine banded Armadillo Dasypus novemcinctus: A mammal lacking a distinct pineal gland. Physiol. Behav. 29: 307. 1982.
- HEDIN, A., HAMMARSTRÖM, S., and LARSSON, A. Specificities and binding properties of eight monoclonal antibodies against carcinoembryonic antigen. Molec. Immunol. 19: 1641. 1982.
- HEDLUND, L., LISCHKO, M.M., ROLLAG, M.D., and NISWENDER, G.D. Melatonin: Daily cycle in plasma and cerebrospinal fluid of calves. Science. 195: 686. 1977.
- HENGARTNER, H., LUZZATI, A.L., and SCHREIER, M. Fusion of in vitro immunized lymphoid cells with X63Ag8. In: Lymphocyte Hybridomas (F. Melchers, B.M. Potter, B.N. Warner, eds.) Springer Verlag. (New York): 92. 1978.
- HERBST, H., and BRAUN, D.G. Antistreptococcal group A antibodies: Production after in vitro activation and hybridization of mouse spleen cells. Ann. Immunol. (Inst. Pasteur) 132C: 87. 1981.
- HEWARD, C.B., and HADLEY, M.E. Structure-activity relationships of melatonin and related indoleamines. Life. Sci. 17: 1167. 1978.
- HOLMES, S.W., and SUGDEN, D. Effects of melatonin on sleep and neurochemistry in the rat. Brit. Pharmacol. 76: 95. 1982.

- HORST, H. J., BUCK, A., and ADAM, K.U. Orally administered melatonin stimulates the $3\alpha/\beta$ -hydroxysteroid oxidoreductase but not the 5α -reductase in the ventral prostate and seminal vesicles of pineal-ectomized rats. *Experientia* 38: 969. 1982.
- HUNTER, M.M., MARGOLIES, M.N., JU, A., and HABER, E. High-affinity monoclonal antibodies to cardiac glycoside: Digoxin. *J. Immunol.* 129: 1165. 1982.
- JANOSSY, G. Monoclonal antibodies in bone marrow transplantation. *Proc. Royal Soc. Edinburgh* 81-B: 233. 1982.
- JOHNSON, L.Y., VAUGHAN, M.K., RICHARDSON, B.A., PETERBERG, L.J., and REITER, R.J. Variation in pineal melatonin content during the estrous cycle of the rat. *Proc. Soc. Expt. Biol. Med.* 169: 416. 1982.
- KATO, K., TERASHIMA, M., and OSAWA, T. A monoclonal antibody that binds preferentially to human suppressor T cells. *Microbiol. Immunol.* 26: 599. 1982.
- KAWASHIMA, K., and NAGAKURA, A. Diurnal rhythms of melatonin in spontaneously hypertensive rats. *Japan Heart J. SHR* 17: 424. 1982.
- KEARNEY, J.F., RADBRUCH, A., LIESEGANG, B., and RAJEWSKY, K. A new mouse myeloma cell line that has lost immunoglobulin expression but permits the construction of antibody secreting hybrid cell lines. *J. Immunol.* 123: 1548. 1979.
- KENNAWAY, D. J., GILMORE, T.A., and SEAMARK, R.P. Effect of melatonin feeding on serum prolactin and gonadotropin levels and the onset of seasonal estrous cyclicity in sheep. *Endocrinology.* 110: 1766. 1982.
- KING, T.S., RICHARDSON, B.A. and REITER, R.J. Regulation of rat melatonin synthesis: Effect of monoamine oxidase inhibition. *Molec. Cell Endocrinol.* 25: 327. 1982.
- KLEBE, R.J., and MANCUSO, M.G. Chemicals which promotes cell hybridization. *Somat. Cell Genet.* 7: 423. 1981.
- KLEBE, R.J., and MANCUSO, M.G. Enhancement of polyethylene glycol mediated cell hybridization by inducers of erythroleukemia cell differentiation. *Somat. Cell Genet.* 8: 723. 1982.

- KLEIN, D.C., The pineal gland: A model of neuroendocrine regulation. In: The Hypothalamus (S. Reichlin, R. J. Baldessarini, J.B. Martin, eds.) Raven Press (New York): 303, 1978.
- KOHLER, G., HOWE, S.C., and MILSTEIN, C. Fusion between immunoglobulin-secreting and non secreting myeloma cell lines. *Eur. J. Immunol.* 6: 292. 1976.
- KOHLER, G., and MILSTEIN, C. Continuous cultures of fused cells secreting antibodies of predefined specificity. *Nature* 256: 495. 1975.
- KRUSE, C.A., SPECTOR, E.B., CEDERBAUM, S.D., WISNIESKI, B.J. and POPJAK, G. Microinjection of arginase into enzyme deficient cells with the isolated glycoproteins of Sendai virus as fusogen. *Biochim. Biophys. Acta* 645: 339. 1981.
- LAUNAY, J.M., LEMAITRE, B.J., HUSSON, H.P., DREUX, C., HARTMANN, L., and DA PRADA, M. Melatonin synthesis by rabbit platelets. *Life Sci.* 31: 1487. 1982.
- LE BIEN, T.W., and KERSEY, J.H. A monoclonal antibody (T A-1) reactive with human T lymphocytes and monocytes. *J. Immunol.* 125: 2208. 1980.
- LEHTONEN, O.P., and EEROLA, E. The effect of different antibody affinities on ELISA absorbance and titer. *J. Immunol. Methods* 54: 233. 1982.
- LEJEUNE, P.J., MARRIQ, C., ROLLAND, M., and LISSITZKY, S. Amino acid sequence around a homogenic tyrosine residue in the N-terminal region of human thyroglobulin after in vivo and in vitro iodination. *Biochem. Biophys. Res. Com.* 114: 73. 1983.
- LERNER, R.A., and DIXON, F.J. The human lymphocyte as an experimental animal. *Sci. Am.* 228(6): 82. 1973.
- LINDGREEN, J., BANG, B., HUMRE, M., and MAKELA, O. Monoclonal antibodies against carcinoembryonic antigen (CEA): characterization and use in a radioimmunoassay for CEA. *Acta. Path. Microbiol. Immunol. Scand.* 90: 159. 1982.
- LITTLEFIELD, J.W. Selection of hybrids from matings of fibroblast in vitro and their presumed recombinants. *Science* 145: 709. 1964.
- MERCER, W.E., and BASERGA, R. Techniques for decreasing the

- toxicity of polyethylene glycol. In: Techniques in Somatic Cell Genetics, (J.W. Shay, ed.) Plenum Pub. Co. (New York): 23. 1982.
- MILSTEIN, C. From antibody diversity to monoclonal antibodies. *Eur. J. Biochem.* 118: 429. 1981.
- MIRRO, J., SCHWARTZ, J.F., and CIVIN, C.I. Simultaneous analysis of cell surface antigens and cell morphology using monoclonal antibodies conjugated to fluorescent microspheres. *J. Immunol. Method.* 47: 39. 1981.
- NAMBA, M., FUKUSHIMA, F., and KIMOTO, T. Effects of feeder layers made of human, mouse, hamster, and rat cells on the cloning efficiency of transformed human cells. *In vitro* 18: 469. 1982.
- NAZ, R.K., SAXE, J.M., and MENGE, A.C. Inhibition of fertility in rabbits by monoclonal antibodies against sperm. *Biol. Reprod.* 28: 249. 1983.
- NORWOOD, T.H., and ZEIGLER, C.J. The use of dimethyl-sulfoxide in mammalian cell fusion. In: Techniques in Somatic Cell Genetics (J. W. Shay, ed.) Plenum Pub. Co. (New York): 35. 1982.
- NOSSAL, G.J.V. *Antibodies and Immunity*. Basic Books Pubs. 2nd ed. (New York): 310 p. 1978.
- NOWINSKY, R.C., PICKERING, R., O'DONNELL, P.V., PINTER, A., and HAMMERLING, U. Selective neutralization of ecotropic murine leukemia virus by monoclonal antibodies: Localization in a site on the gp70 protein associated with ecotropism. *Virology* 111: 84. 1981.
- OHARA, J., SUGI, M., FUJIMOTO, M., and WATANABE, T. Microinjection of macromolecules into normal murine lymphocyte by means of cells fusion II. Enhancement and suppression of mitogenic responses by microinjection of monoclonal anti-cyclic AMP into B lymphocytes. *J. Immunol.* 129: 1227. 1982.
- OI, V. T., and HERZENBERG, L.A. Immunoglobulin producing hybrid cell lines. In: Selected Methods in cellular immunology, (B.B. Mishell, S.M. Shigtl, eds.) W. H. Freeman and Co. (San Francisco): 351. 1981.
- PANG, J.F., YU, H.S., and TANG, P.L. Regulation of melatonin in the retinae of guinea pigs: effect of environmental lighting. *J. Exptal. Zool.* 222: 22. 1982.

- PARHAM, P., ANDROLEWICZ, M.J., BRODSKY, F.M., HOLMES, N.J., and WAYS, J.P. Monoclonal antibodies: Purification, fragmentation and application to structural and functional studies of class I MHC antigens. *J. Immunol. Method.* 53: 133. 1982.
- PAWLITA, W., MISHINSKI, E., FELDMANN, R.J., and POTTER, M. A monoclonal antibody that defines an idotype with two subsites in galactam binding myeloma proteins. *J. Exp. Med.* 15: 1946. 1981.
- PENNY, R. Melatonin excretion in normal males and females increasing during puberty. *Metabolism.* 31: 816. 1982.
- RALPH, P. Lymphocyte and hybridoma cell lines. In: Functionally Differentiated Cell Lines. (G. Sato, ed.) Alan R. Liss Inc. (New York): 211. 1981.
- RASCHKE, W.C. Immunoglobulin-producing tumors and cell lines. *BBA Reviews on Cancer* 605: 113. 1980.
- REICHARDT, L.F., and MATTHEW, W.D. Monoclonal antibodies applications to studies on the chemical synapse. *Trends in Neurosci* 5: 24. 1982.
- RICHARDSON, S.B., PRASA, J.A., and HOLLANDER, C.S. Acetylcholine, melatonin and potassium depolarization stimulate release of luteinizing hormone-releasing hormone from rat hypothalamus in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 79: 2686. 1982.
- RICHTER, H.P., SCHEURICH, P., and ZIMMERMAN, U. Electric field induced fusion of sea urchin eggs. *Develop. Growth and Diff.* 23: 479. 1981.
- ROBERT, M. La modificación genética de células vegetales en cultivo. En: Transplante y movilización de genes (R.N. Ondarza, M. Robert, F. Bolivar, eds.) CONACYT (México): 29. 1981.
- ROLLAG, M.D., and NISWENDER, G.D. Radioimmunoassay of serum concentration of melatonin in sheep exposed to different lighting regimens. *Endocrinol.* 98: 482. 1976.
- ROSE, D.F. The generation of antibody diversity. *Am. J. Hematol.* 13: 91. 1982.
- RUZSAS, C., DEGAETANI, C., CRIOSCULO, M., MESS, B., and TRENTINI, G.P. Possible role of the midbrain serotonergic Raphe nuclei in the regulation of ovulation exerted

- by melatonin in the rat, *Neuroendocrinol. Lett.* 3: 331, 1981.
- SCHREIER, M., KOHLER, G., HENGARTNER, H., BEREK, C., TRUCCO, M., FORNI, L., STEHELIN, T., STOCKER, J., and TAKACS, B. *Hybridoma Techniques*, Cold Spring Harbor Lab., New York.: 65, 1980.
- SCHULMAN, M., WILDE, C.D., and KOHLER, G. A better cell line for making hybridomas secreting specific antibodies, *Nature* 276: 269, 1978.
- SEEGER, R.C., DANON, Y.L., RAYNER, S.A., and HOOVER, F. Definition of a THY-1 dererminant on human neuroblastoma, glioma, sarcoma, and teratoma cells with a monoclonal Antibody. *J. Immunol.* 128: 983, 1982.
- SEVIER, E.D., DAVID, G.D., MARTININS, J., DESMOND, W.J., BARTHOLOMEW, R.M., and WANG, R. Monoclonal antibodies in clinical immunology. *Clin. Chem.* 27: 1797, 1981.
- SHEN, F.-W., YAKURA, H., and TUNG, J.-S. Some compartments of B cell differentiation. *Immunological Rev.* 69: 69, 1982.
- SIECKMANN, D.G., FINKELMAN, F.D., and SHCER, I. IgD as a receptor in signaling the proliferation of mouse B-lymphocytes. In: IgD structure and Function (G.J. Thorbecke, G.A. Leslie, eds.) New York Acad. Sci. (New York): 277, 1982.
- SOLA, B., AVNER, P.R., ZILBER, M.T., CONNAN, F., and LEVY, D. Isolation and characterization of a monoclonal antibody specific for fibrinogen and fibrin of human origin. *Thrombosis Res.* 29: 643, 1983.
- STUDIER, F.W. Analysis of bacteriophage T7 early RNAs and proteins on slab gels. *J. Mol. Biol.* 79: 237, 1973.
- SZOKA, F., MAGNUSSON, K.E., WUJCIESZYN, J., HOU, Y., DERZKO, Z., and JACOBSON, K. Use of lectins and polyethylene glycol for fusion of glycolipid-containing liposomes with eukariotic cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 78: 1685, 1981.
- TAGGART, R.T., and SAMLOFF, I.M. Stable antibody producing murine hybridoms. *Science* 219: 1228, 1983.

- TSUDO, M., UCHIYAMA, T., TAKATSUKI, K., UCHINO, H., and YODOY, J. Modulation of Tac antigen on activated human T cells by anti-Tac monoclonal antibody. *J. Immunol.* 129: 592, 1982.
- VACAS, M.I., KELLER SARMIENTO, M.I., and CARDINALI, D.P. Melatonin increases cGMP and decreases cAMP levels in rat media basal hypothalamus in vitro. *Brain Res.* 225: 207. 1981.
- VACAS, M.I., KELLER SARMIENTO, M.I., PEREIRA, E., and CARDINALI, D.P. Early changes in cAMP and melatonin levels on rat pineal gland after superior cervical ganglionectomy. *Neuroendocrinol. Lett.* 4: 267. 1982.
- WALKER, R.F., Mc CAMANT, S., and TIMIRAS, P. Melatonin and the influence of the pineal gland on timing of the LH surge in rats. *Neuroendocrinol.* 35: 37. 1982.
- WEISS, R.A. Hybridomas produce virus as well as antibodies. *Immunol. Today* 3: 292. 1982.
- WESTERWODT, R. J., BLON, J., NAIPAL, A.M., and VAN ROOD, J.J. Improved fusion technique I. Human umbilical cord serum: A new and potent growth promoter compared with other cell and hybridoma activators. *J. Immunol. Method.* 63: 59. 1983.
- WINKELHAKE, J.L. Immunoglobulin structure and effector functions. *Immunochem.* 15: 695. 1978.
- WURTMAN, R. J., and ANTON-TAY, F. The mammalian pineal as a neuroendocrine transducer. *Recent Progr. Horm. Res.* 25: 493. 1969.
- WURTMAN, R. J., and AXELROD, J. The Pineal Gland. *Sci. Am.* 213(1): 50. 1965.
- XIANGHUI, L., WENBIN, L., and MEI JUAN, H. Somatic hybrid plants from intergeneric fusion between tobacco tumor 86S3 and Petunia hybrida W43 and expression of LpDH. *Scientia Sinica* 25: 611. 1982.
- YELTON, D.E., and SCHARFF, M.D. Monoclonal antibodies. *American Sci.* 68: 510. 1980.

- YELTON, D.E. THAMMANA, P., DESAYMARD, C., ROBERTS, G.B. KWAN, S.-P., GIUSTI, A., ZACK, D.J., POLLOCK, R.R., and SCHARFF, M.D. Monoclonal antibodies: The production of Tailor made serological reagents. In: From Gene to Protein: Translation into Biotechnology. (F. Ahmad, J. Shultz, E.E. Smith, W.J. Whelan, eds.) Academic Press (New York): 129. 1982.
- YU, H.S., PANG, S.F., and TANG, P.L. Increase in the level of retinal melatonin and persistence of its diurnal rhythm in rats after pinealectomy. *J. Endocrinol.* 91: 477. 1981.
- ZIMMERMANN, U., SCHEURICH, P., PILWAT, G., and BENZ, R. Cells with manipulated functions; New perspectives for cell biology, medicine and technology. *Angew. Chem. Int. Ed.* 20: 325. 1981.
- ZIMMERMANN, U., and VIENKEN, J. Electric field-induced cell to cell fusion. *J. Membr. Biol.* 67: 165. 1982.