



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

Escuela Nacional de Estudios Profesionales Iztacala

**PRODUCCION DE HIBRIDOMAS Y ANTICUERPOS
MONOCLONALES CONTRA PROTEINAS DEL
CITOESQUELETO DEL CEREBRO DE LA RATA.**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

B I O L O G A

P R E S E N T A

ANA MARIA SIERRA HONIGMANN

México, D. F.

1987



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Si cada día cae
dentro de cada noche
hay un pozo
donde la claridad está cerrada.

Hay que sentarse a la orilla
del pozo de la sombra
y pescar luz caída
con paciencia.

Pablo Neruda

A Mariely, Iñigo y Diana

Esta tesis se realizó en el laboratorio del Dr. José Luis Saborío en el Departamento de Biología Celular del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN, con la colaboración de la Dra. Elizabeth Palmer y el M. en C. José Manuel Hernández, quienes realizaron una parte importante del trabajo.

La mayor parte de la metodología empleada nos fue proporcionada por el Dr. Angel De Blas, de la Universidad del Estado de Nueva York en Stony Brook, E.U.A.

A G R A D E C I M I E N T O S

- Al Dr. José Luis Saborío por su apoyo y por la dirección de este trabajo.
- Al Dr. Jesús Calderón por su ayuda siempre noble y desinteresada.
- Al Dr. Alejandro Bayón por su confianza y generosidad.
- Al Dr. Angel De Blas y a la Q.B.P. Elizabeth Becerra por sus enseñanzas.
- Al M. en C. José Manuel Hernández por su colaboración en la realización de esta tesis.
- A María Esther Cid por su valiosa ayuda secretarial y por la transcripción de esta tesis.
- Al Biólogo José Sangerman por sus sabios consejos por su amistad y por la revisión de esta tesis.
- Al Biólogo Ismael Ledesma por su constante ayuda y por la revisión de este trabajo.
- A Armando Sánchez, Fortunato Mote y Alberto Olguín por su excelente ayuda técnica.
- A la Dra. Eva Edilia Avila, la Bióloga María Eugenia Heres, a la M. en C. Martha O. Salcedo, la Q.B.P. Bertha Hashimoto y el Q. B.P. Bulmaro Correa por la revisión de esta tesis.

A toda aquella persona que participó directa o indirectamente en la elaboración de este trabajo.

I N D I C E

INTRODUCCION	1
I. Inmunoglobulinas y Sueros Policlonales	1
II. Anticuerpos Monoclonales	6
A. Principios Generales	6
B. Células de Mieloma	9
C. Fusión Celular	11
D. Selección de los Híbridos	13
E. Métodos de Detección	16
F. Propiedades y Aplicaciones	20
III. Actina y Geles Citoplásmicos	22
OBJETIVOS	26
MATERIALES Y REACTIVOS	27
METODOS	29
I. Cultivo de Células	29
A. Soluciones y medios de cultivo	29
B. Técnicas de Cultivo	31
II. Esquema de Inmunización	32
III. Producción de Hibridomas	32
A. Preparación de las células de mieloma	32
B. Preparación de las células del bazo de ratones BALB/c33	
C. Fusión Celular	33
D. Clonación por dilución limitada	34
IV. Detección de Hibridomas Productores	34
A. Ensayo inmunoenzimático (ELISA)	34

B. Inmunofluorescencia de células en cultivo	36
C. Inmunodetección de proteínas electrotransferidas de poliacrilamida a nitrocelulosa.	36
VI. Gelificación de extractos citoplásmicos.	39
RESULTADOS	41
I. Análisis electroforético de las proteínas de geles citoplásmicos de cerebro de rata	41
II. Análisis de los sueros de los ratones inmunes.	41
III. Fusión Celular	45
IV. Detección de hibridomas productores de inmunoglobulinas específicas.	48
V. Inmunofluorescencia de células en cultivo.	51
VI. Inmunodetección de proteínas electrotransferidas a nitrocelulosa.	56
VII. Clonación de los híbridos.	59
VIII. Clasificación y congelación de los híbridos.	61
DISCUSION.	68
REFERENCIAS.	75

R E S U M E N

Este trabajo se realizó con la finalidad de establecer en el laboratorio la metodología necesaria para la producción de hibridomas y la obtención de anticuerpos monoclonales dirigidos contra las proteínas del citoesqueleto presentes en los geles citoplásmicos del cerebro de rata. Estos geles están constituidos por la actina y cuando menos otras 3 proteínas que interaccionan específicamente con la actina. Estas proteínas se utilizaron para inmunizar ratones Balb/c, cuyas células del bazo se fusionaron con células de mieloma de ratón (P3X63-Ag8.653). Se obtuvieron varios hibridomas productores de anticuerpos específicos para estas proteínas, los cuales se seleccionaron mediante un ensayo inmunoenzimático en fase sólida (ELISA) y posteriormente con un ensayo de inmunofluorescencia de células en cultivo. También se realizó la inmunodetección de proteínas electrotransferidas de geles de poliacrilamida a papel de nitrocelulosa para identificar por su peso molecular las bandas reconocidas por los anticuerpos. Finalmente se clonaron algunos híbridos productores de anticuerpos anti actina y los demás se guardaron en congelación para ser clonados posteriormente.

LISTA DE ABREVIATURAS

C	Región constante de las inmunoglobulinas
C _H	Región constante de las cadenas pesadas de las inmunoglobulinas
C _L	Región constante de las cadenas ligeras de las inmunoglobulinas
DMEM	Medio mínimo esencial modificado por Dulbecco
DMSO	Dimetil sulfóxido
DNAsa I	Desoxirribonucleasa I
EDTA	Acido etilén diamino tetraacético
ELISA	Ensayo inmunoenzimático en fase sólida
HAT	Hipoxantina, aminopterina, timidina
HGPRT	Hipoxantina guanina fosforribosil transferasa
IgG	Inmunoglobulina de la clase gamma
IgM	Inmunoglobulina de la clase M
PBS	Amortiguador de fosfatos con cloruro de sodio
PEG-4000	Polietilenglicol PM 4000
SDS	Dodecil sulfato de sodio
TEMED	N,N,N',N'-tetrametildiamina
TK	Timidina Cinasa
Tritón X-100	Polioxietilen-p-1-octil fenol

Tween 20	Polioxietilen sorbitan monolaurato
V	Región variable de las cadenas ligera y pesada de las inmunoglobulinas
V _H	Región variable de las cadenas pesadas de las inmunoglobulinas
V _L	Región variable de las cadenas ligeras de las inmunoglobulinas

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

I. Inmunoglobulinas y Sueros Policlonales

Una de las características esenciales del sistema inmune es su capacidad para reconocer macromoléculas que no se encuentran normalmente en el organismo. Las proteínas séricas conocidas como anticuerpos o inmunoglobulinas reconocen específicamente a estas moléculas extrañas denominadas antígenos. El determinante antigénico es la parte de la molécula a la que se une el anticuerpo. Los anticuerpos reconocen y se unen al antígeno por complementariedad molecular, estableciendo interacciones no covalentes similares a las que ocurren en las uniones enzima-sustrato.

Las inmunoglobulinas están constituidas por cuatro cadenas polipeptídicas (1); dos cadenas ligeras (L) idénticas y dos cadenas pesadas (H), unidas por puentes disulfuro, como se muestra en la Figura 1.

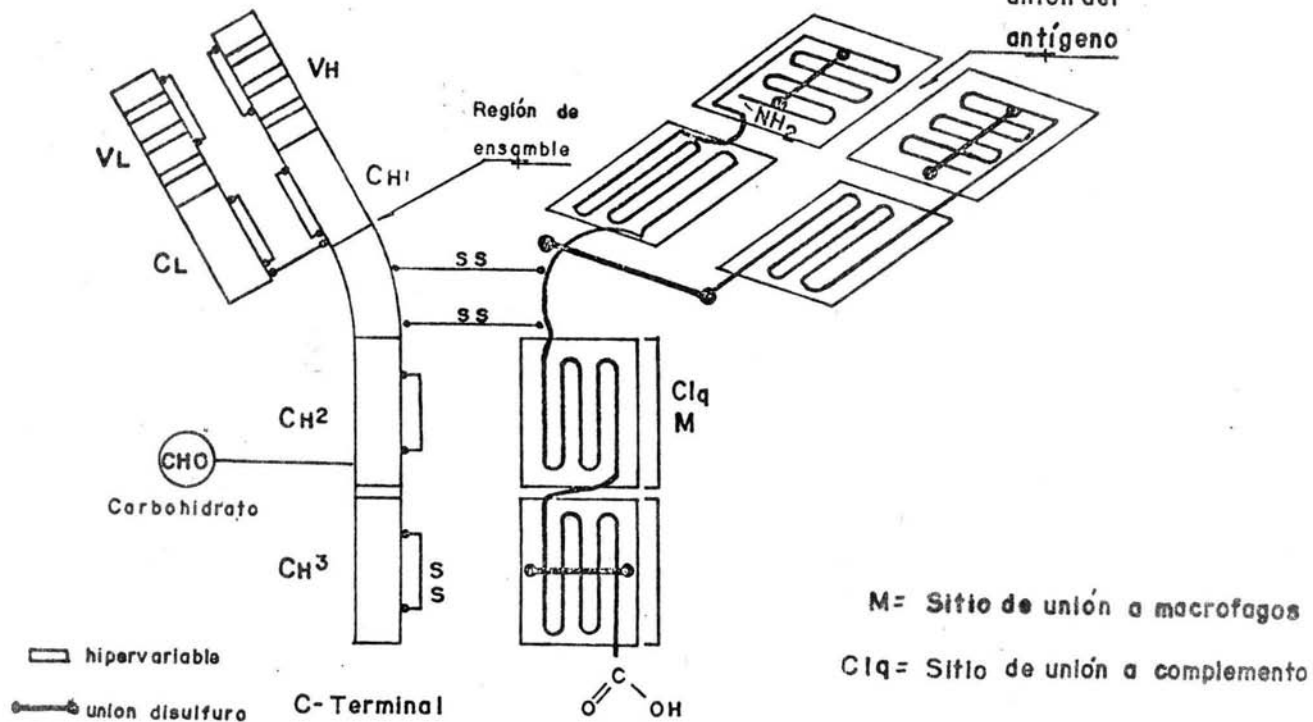
Las cadenas pesadas y las ligeras contienen una región variable (V) y una región constante (C) que están determinadas por la secuencia de los aminoácidos que las constituyen. Las regiones variables de ambas cadenas se encuentran en la porción amino terminal. Dentro de cada región variable existen tres segmentos que presentan una variabilidad mucho mayor. Estos segmentos hipervariables al adoptar su conformación tridimensional constituyen el sitio de unión específico para el antígeno (2).

Figura 1. Representación esquemática de una inmunoglobulina.

En el lado izquierdo se representa la cadena ligera (L) y la pesada (H), covalentemente unidas por puentes disulfuro. Cada cadena está constituida por una región constante (C_L y C_H) y una variable (V_L y V_H). La región C_H se forma de varios dominios discretos: en el C_{H2} están los residuos de carbohidratos y los sitios de unión a complemento y macrófagos. Los segmentos V representan 3 fragmentos con un alto índice de variación llamadas regiones hipervariables, involucradas en la conformación del sitio de unión para el antígeno. La mitad derecha esquematiza la configuración en B- plegada de las cadenas polipeptídicas de cada dominio.

Amos, W.M.G. (1981) Basic Immunology. Butterworths, Londres, 34.

N - Terminal



Las inmunoglobulinas se dividen en cinco clases; IgG, IgM, IgA, IgD e IgE, basándose en la estructura de sus cadenas pesadas (3). Estas clases corresponden a anticuerpos con distintas funciones efectoras (1).

Un animal es capaz de generar una gran diversidad de anticuerpos, alrededor de 10^8 moléculas diferentes, con distintas especificidades y afinidades para una basta variedad de antígenos. La diversidad en los sitios de unión de los anticuerpos esta determinada en gran parte a nivel genético. Existen tres grupos diferentes de genes que codifican a las inmunoglobulinas; genes para cadenas ligeras kappa, para cadenas ligeras lambda y para cadenas pesadas. Durante la maduración de los linfocitos B, ocurre una diferenciación genética que involucra un rearrreglo del ADN (5).

Cuando se inmuniza un animal con un antígeno, se obtiene un suero de tipo policlonal. Los antígenos contienen generalmente varios determinantes antigénicos, cada uno de los cuales puede inducir la aparición de anticuerpos producidos por clones de linfocitos diferentes (1, 2). Cada uno de estos anticuerpos es monoclonal y los anticuerpos presentes en el suero representan la suma de los anticuerpos monoclonales dirigidos contra cada determinante antigénico, como se ilustra en la Figura 2.

La obtención y el empleo de sueros policlonales puede ser en ocasiones un factor limitante. Las inmunizaciones deben realizarse con antígenos puros, ya que la presencia de cantidades pequeñas de contaminantes puede inducir la producción de anticuerpos que

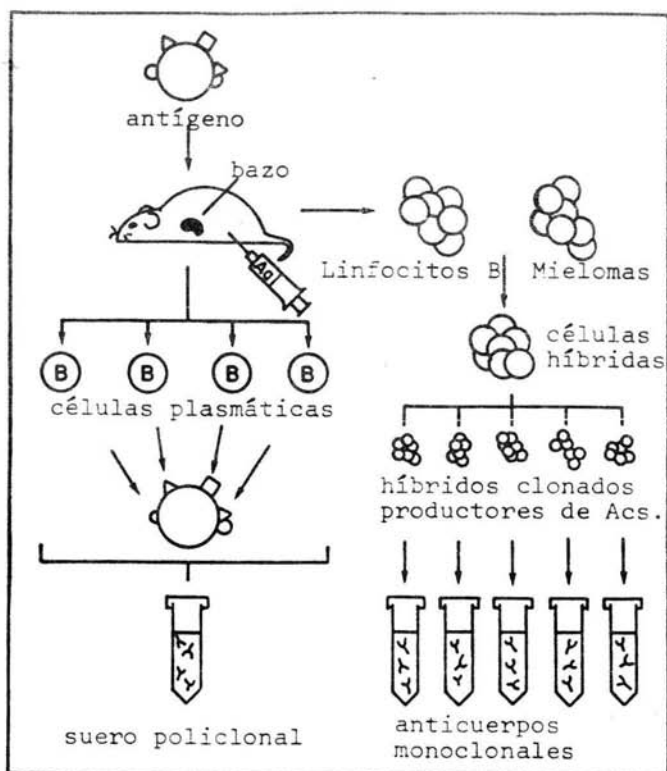


Figura 2. Comparación de un suero policlonal producido in vivo con anticuerpos monoclonales construidos in vitro. Un individuo inmunizado con un antígeno responde formando una población heterogénea de anticuerpos con especificidad para diferentes epítopes (suero convencional). Por clonación de las células derivadas del bazo inmune, hibridizadas con células de mieloma, es posible obtener anticuerpos mono-específicos y homogéneos.

interfieran en los ensayos. La población de anticuerpos producidos varía entre animales de la misma especie, aún en los genéticamente idénticos. Esta variación se presenta también en los sueros obtenidos de diferentes sangrados del mismo individuo. Así, los resultados obtenidos con un suero pueden no reproducirse con otro, lo que representa un problema ya que estos se obtienen en cantidades limitadas.

Los sueros de animales inmunes contienen anticuerpos con un amplio rango de afinidades, con diferentes especificidades y a menudo presentan inmunoreactividad cruzada. Estos sueros también contienen anticuerpos de diferentes clases y subclases que varían en sus capacidades para aglutinar o precipitar antígenos o para fijar complemento.

II. Anticuerpos Monoclonales

A. Principios Generales.

En 1975 Kohler y Milstein desarrollaron la técnica de producción de hibridomas para la obtención de anticuerpos monoclonales (6, 7). Este nuevo avance metodológico ha conducido a una revolución en las ciencias biológicas, permitiendo la realización de estudios que antes eran muy difíciles o imposibles (8, 9, 10).

Estos investigadores encontraron que se podían fusionar células de mieloma de ratón, cultivadas in vitro, con células del bazo de animales inmunizados. Como resultado de esta fusión se obtienen células híbridas que sintetizan anticuerpos específicos que reaccionan con los antígenos usados en la inmunización. Estos

híbridos crecen de manera continua en cultivo, mantienen la producción de anticuerpos, pueden congelarse y recuperarse en el momento deseado y pueden inyectarse en la cavidad peritoneal de ratones singénicos donde proliferan y producen cantidades grandes de anticuerpos.

La tecnología de producción de hibridomas ofrece muchas ventajas. El anticuerpo producido por el híbrido es específico para un solo determinante antigénico (monoespecífico). Además, es posible inmunizar con antígenos impuros, ya que todos los híbridos producidos de una fusión son sometidos a ensayos para determinar la especificidad de los anticuerpos que producen y se seleccionan los que son de interés. Los mejores híbridos pueden producir hasta 100 μg de inmunoglobulina por ml de medio de cultivo y 10 mg/ml en el líquido ascítico (11). La continuidad de las líneas celulares asegura cantidades virtualmente ilimitadas y por tiempo indefinido, de anticuerpos homogéneos y bien caracterizados.

En la Figura 3 se ilustra de manera general la técnica utilizada en muchos laboratorios. Los ratones BALB/c se inmunizan con el antígeno de interés. Se obtienen las células del bazo del ratón inmunizado y se mezclan con las células de mieloma en presencia de polietilenglicol. Después de la fusión las células se distribuyen en placas de microcultivo, en un medio selectivo que impide el crecimiento de las células de mieloma que no se fusionaron. Las células del bazo del ratón no pueden crecer en el cultivo de manera que las únicas que proliferan son los híbridos resultantes de la fusión de las células del bazo con las de mieloma. Dos o tres

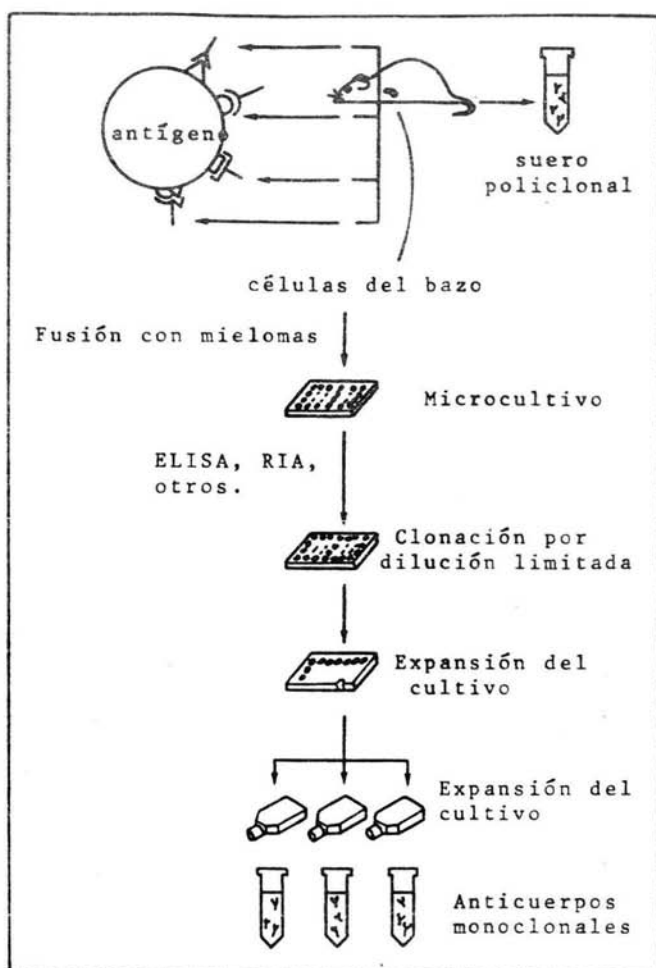


Figura 3. Secuencia completa de procedimientos para establecer líneas de hibridomas productoras de anticuerpos monoclonales.

semanas después se realiza un ensayo para detectar la presencia de anticuerpos específicos en los cultivos donde se observa crecimiento de híbridos. Los cultivos que resulten positivos son clonados nuevamente. Existen numerosas revisiones sobre aspectos teóricos y técnicos que pueden consultarse (22, 23, 24, 25, 26, 27).

B. Células de Mieloma.

Las células de mieloma empleadas para la producción de hibridomas son líneas celulares de linfocitos B con características malignas de crecimiento, capaces de vivir y dividirse in vitro. Estas células son aneuploides (contienen un número anormal de cromosomas) y fueron seleccionadas con un defecto en la enzima hipoxantina guanina fosforibosil transferasa (HGPRT⁻). Esta deficiencia enzimática es necesaria para la selección de las células híbridas después de la fusión.

La mayoría de las líneas de mieloma disponibles provienen de ratones BALB/c (29, 30), aunque también existen líneas celulares de rata y de humano (17, 28, 31). Por esta razón es que una gran cantidad de los trabajos que se realizan en esta área utilizan ratones BALB/c y los anticuerpos monoclonales obtenidos pueden considerarse como inmunoglobulinas de ratón.

Durante los primeros años se usaron para las fusiones líneas de mieloma productoras de inmunoglobulinas, por lo cual se obtenían varias combinaciones de cadenas pesadas y ligeras, ocasionando heterogeneidad en los anticuerpos secretados, como se muestra en la Figura 4. Poco tiempo después se establecieron líneas

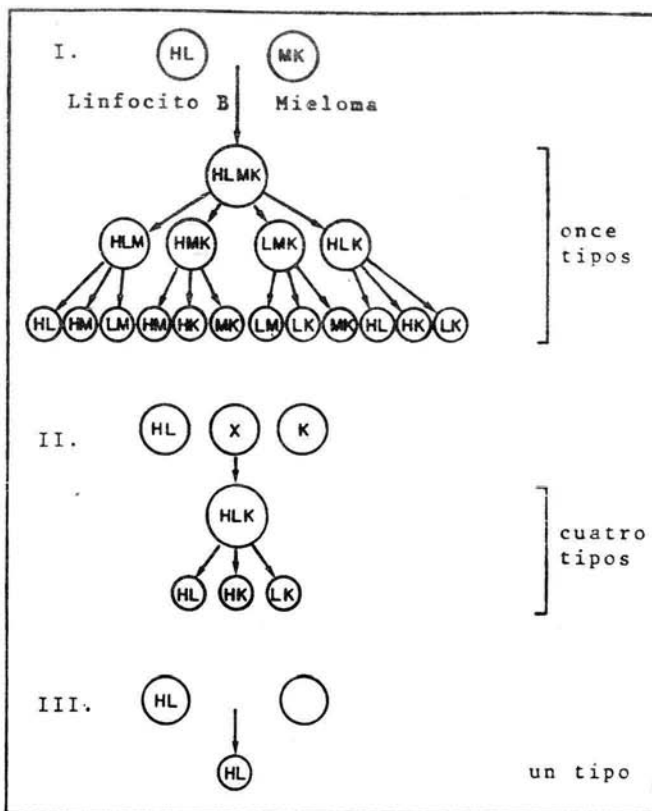


Figura 4. Producción y secreción de cadenas de inmunoglobulinas. H, L, M y K son cadenas diferentes producidas por el linfocito B o la célula de mieloma. La célula híbrida expresa todas las cadenas, eventualmente por la pérdida de cromosomas se expresan menos tipos de cadenas por célula. I. Fusión con un mieloma productor de cadenas pesadas y ligeras. II. Fusión con un mieloma productor de cadenas ligeras. III. Fusión con un mieloma no productor de cadenas.

celulares que producían únicamente cadenas pesadas o ligeras, hasta que finalmente se obtuvieron líneas que no producen o no secretan ningún tipo de cadena (32). En la Tabla I se muestran algunas de las líneas de mieloma más usadas en la producción de hibridomas.

C. Fusión Celular.

La fusión celular puede ocurrir espontáneamente pero no es muy frecuente, por esta razón se utilizan agentes que aumentan la frecuencia de formación de híbridos. Uno de los más utilizados es el polietilenglicol (PEG). Este agente fusogénico hidrosoluble origina una frecuencia elevada de fusión celular y es poco tóxico.

La frecuencia de hibridización más alta se produce a concentraciones de PEG entre 50 y 55% (23). Mientras mayor es el peso molecular del PEG empleado, mayor es la cantidad de híbridos obtenidos. Sin embargo, al aumentar el peso molecular la toxicidad celular es más alta y es más difícil la manipulación del polímero que se vuelve más viscoso (34).

Se desconoce el mecanismo de fusión celular promovido por el PEG (33, 35), sin embargo, se ha sugerido que este agente induce cambios estructurales de la fase acuosa adyacente a la superficie membranal afectando la orientación de los fosfolípidos, produciendo cambios en la permeabilidad de la membrana y modificando la orientación espacial y la agregación de las proteínas membranales (13).

Parece ser que todas las células son capaces de fusionarse, pero no todas lo hacen con la misma eficiencia o con la misma

T A B L A I

Nombre	Cadenas de inmunoglobulinas producidas	Origen	Animal	Referencia
P3X63-Ag8	γ_1 , k	MOPC-21 (BALB/c)	ratón	6
P3NSI-1.Ag 4.1	k (intracelular)	P3X63	ratón	7
P3X63-Ag8.653	ninguna	P3X63-Ag8	ratón	32
Sp 2/0-Ag14	ninguna	P3X63-Ag8 xBALB/c	ratón	49
NSO/U	ninguna	P3NSI-1.Ag4.1	ratón	50
FO-2	ninguna	Sp 2/0-Ag 14	ratón	24
MFC11-45.6TG1.7	γ_2 b, k	BALB/c	ratón	51
S194/5.XXO.BU.1	ninguna	BALB/c	ratón	52
R210.RCY3-Ag 1.2.3	k	Lou rat	rata	53
GM1500.6T6.A12	γ_2 , k	GM1500	humano	54

capacidad para sobrevivir. Las mejores células para la fusión son los blastocitos, que se encuentran dividiéndose en forma activa (36). Esto no se debe a que la fusión sea más eficiente sino a que es necesario que se expresen las características de las dos células parentales, después de la fusión. Si la célula que se fusiona no está en etapa blastoide su núcleo no entrará a la división mitótica al mismo tiempo que el núcleo de la célula de mieloma (14). El resultado sería una población de células de mieloma conteniendo un núcleo silencioso extra.

Para obtener un híbrido productor de anticuerpos las células parentales deben ser: un linfocito B en etapa blastoide y una célula de mieloma. Aún así no todas las células fusionadas darán híbridos productores de anticuerpos, ya que, en las siguientes divisiones mitóticas deben fusionarse los dos núcleos de la célula hija, lo cual ocurre únicamente si la división nuclear es simultánea a la división celular. También es necesaria la bipolaridad en la formación del uso mitótico. En la Figura 5 se ilustran algunas de las posibles divisiones mitóticas después de la fusión.

D. Selección de los Híbridos

Las células viables obtenidas después de una fusión pueden dividirse en tres grupos: células de mieloma que no se fusionaron, células producto de la fusión de un linfocito B y una célula de mieloma y un grupo de células híbridas resultado de otras combinaciones celulares que se fusionaron.

Todas las células del bazo que no se fusionaron mueren du-

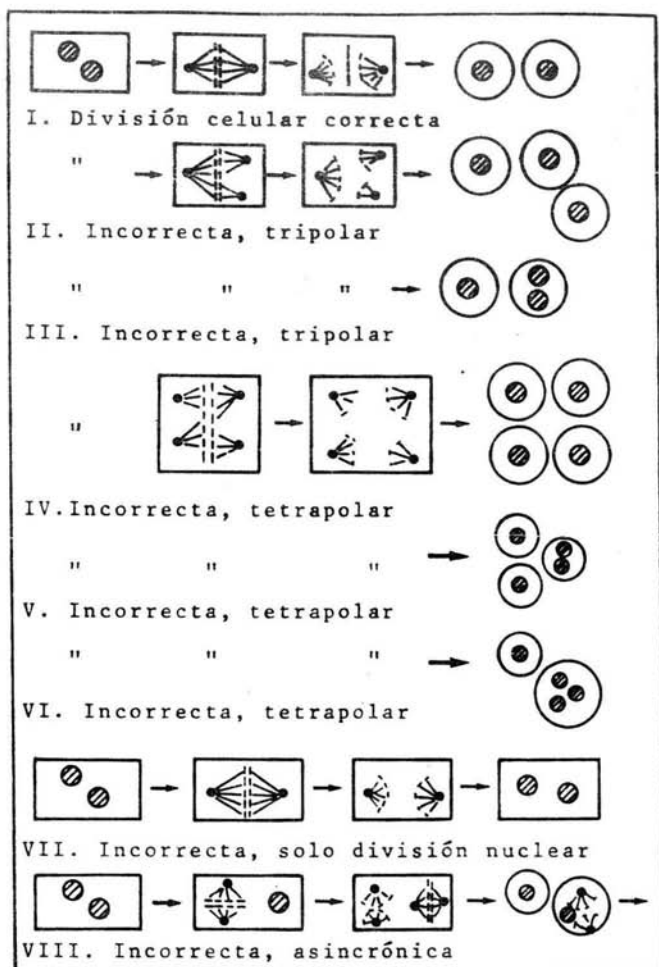


Figura 5. Posibles divisiones mitóticas después de la fusión celular. Existen otras posibilidades, pero solo la división celular mostrada en I. dará hibridomas productores de anticuerpos monoclonales.

rante la primera semana de cultivo a excepción de los macrófagos y fibroblastos. Sin embargo, estos últimos se dividen lentamente y pueden actuar como células alimentadoras ejerciendo un efecto benéfico en los híbridos.

Del total de células que se fusionaron, existirán aquellas que no son de interés. Algunas serán heterocariones de más de dos células; otros serán el resultado de la fusión de células parentales idénticas y otras serán el producto de la fusión de mielomas con otros tipos celulares diferentes al linfocito B. Todas estas células tendrán poca viabilidad o serán eliminadas del cultivo al seleccionar y clonar los híbridos productores de anticuerpos. Solamente permanecen dos tipos abundantes de células; los híbridos correctamente fusionados que son los de interés y las células de mieloma no fusionadas que deberán ser eliminadas.

La selección de los híbridos se realiza después de la fusión utilizando el defecto, en la enzima HGPRT de las células de mieloma, para eliminarlas. Las células HGPRT⁻ son incapaces de utilizar hipoxantina y guanina exógenas y dependen de precursores simples y de la enzima folato reductasa para sintetizar purinas. La enzima folato reductasa es bloqueada con antagonistas como la aminopterina dando como resultado la inhibición de la síntesis de purinas y timidina. La adición de aminopterina al medio de cultivo destruye a las células de mieloma HGPRT⁻ ya que son incapaces de sintetizar purinas aún en presencia de hipoxantina exógena (15, 16).

Las células resultantes de la fusión de un mieloma y un

linfocito serán HGPRT⁺ y podrán utilizar la hipoxantina exógena y la timidina ya que cuentan con la enzima timidina cinasa (son TK⁺). Por lo tanto, el bloqueo de la síntesis de purinas con aminopterina no las afecta ya que utilizan estas vías alternas para su síntesis. En la Figura 6 se esquematiza este método de selección.

Los híbridos sobreviven a la selección con aminopterina siempre que se incluyan hipoxantina y timidina en el medio de cultivo. Este medio de cultivo selectivo se conoce como medio HAT (hipoxantina-aminopterina-timidina). El período de selección debe durar por lo menos siete días aunque se recomienda utilizarlo por más tiempo, para asegurarse que no sobrevivan los mielomas.

E. Métodos de Detección.

Durante el período de selección en el medio HAT, los híbridos se dividen y aumenta lentamente el número de células. Los núcleos fusionados de los híbridos poseen un número muy grande de cromosomas que serán excluidos en las siguientes divisiones mitóticas. El número de cromosomas disminuye de alrededor de 112 (72 del mieloma y 40 del linfocito B) a un número más estable de 70 a 80 cromosomas (14).

Como consecuencia de la pérdida de cromosomas, muchas células hijas pierden características esenciales y podrían no ser viables o dejar de producir anticuerpos. Sin embargo, algunas de las células hijas conservan los cromosomas necesarios para la viabilidad y la secreción de anticuerpos. La pérdida de cromosomas ocasiona que los cultivos sean policlonales aunque la colonia

Figura 6. Vías metabólicas relevantes para la selección de híbridos en medio HAT. Cuando la principal vía biosintética para purinas y pirimidinas se bloquea con aminopterina, un antagonista de la enzima folato reductasa, la célula puede disponer de la vía alternativa que utiliza la enzima HGPRT y la timidina cinasa. Las células HGPRT⁻ se seleccionan creciéndose en presencia de las bases análogas tóxicas de la guanina (6-tioguanina u 8-azaguanina). En estas condiciones sólo las células que no expresan la enzima HGPRT sobreviven, sin embargo, no son capaces de vivir en medio HAT a menos que se fusionen con células con la enzima funcional.

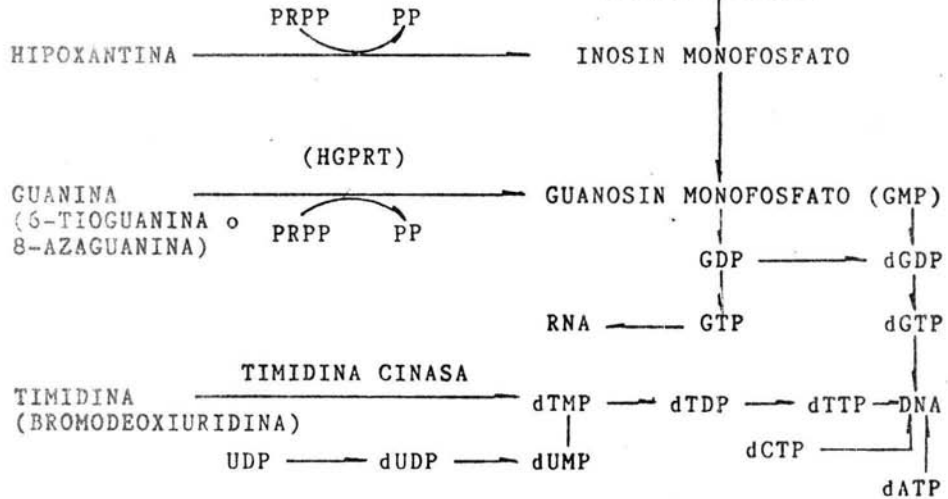
Goding, J. W. (1983) Monoclonal antibodies. Principles and Practice. Academic Press, Inc. Orlando, Florida. 34.

PRINCIPAL VIA BIOSINTETICA
PARA PURINAS Y PIRIMIDINAS

RIBONUCLEÓTIDO
4-CARBOXI-5-AMINO, IMIDAZOL

RIBONUCLEÓTIDO
5-FORMIDO, IMIDAZOL-4-CARBOXIMIDA

AMINOPTERINA



HGPRT = HIPOXANTINA-GUANINA
FOSFORIBOSIL PIROFOSFATO
PP = PIROFOSFATO
PRPP = FOSFORIBOSIL PIROFOSFATO

provenza de una sola célula híbrida recién fusionada. Como la velocidad de crecimiento de los híbridos es variable se corre el riesgo de que los híbridos no productores crezcan más rápido y eliminen a los que sí producen anticuerpos de interés.

Los cultivos deben someterse, lo más pronto posible, a ensayos para seleccionar aquellos que secretan anticuerpos específicos contra las moléculas empleadas en la inmunización y poder clonarlos de inmediato.

El tiempo transcurrido después de la fusión para determinar la especificidad de los cultivos depende del número de células que secretan anticuerpos, de su velocidad de secreción y de la sensibilidad del ensayo empleado. Con frecuencia existen de 10 a 100 ng/ml o más de anticuerpos, producidos por los híbridos, en el medio de cultivo que no ha sido cambiado (14). Existe un tiempo limitado para la sobrevivencia de las células cuando no se les cambia el medio de cultivo, por lo tanto el ensayo de los microcultivos debe ser rápido y confiable.

Los mejores métodos de detección son los ensayos inmunoenzimáticos (ELISA) (37, 38, 39), el radioinmunoensayo (RIA) (41) y la inmunofluorescencia (40). Al elegir el método de detección deberá tomarse en cuenta el uso posterior que se le dará al anticuerpo, ya que, el método de detección puede determinar la selección de anticuerpos con ciertas características que no serían adecuadas para el tipo de trabajo que se desee realizar con ellos (42, 43, 44).

F. Propiedades y Aplicaciones.

Los anticuerpos monoclonales difieren de los sueros policlonales en varios aspectos. En ocasiones los anticuerpos monoclonales no son útiles para reacciones de precipitación, ya que, al unirse al antígeno no forman mallas tridimensionales. Esto mismo sucede con la fijación del complemento y los procesos de aglutinación.

Los anticuerpos monoclonales pueden tener también características muy especiales, como por ejemplo, ser muy sensibles a los cambios de pH o a las concentraciones de sales (18, 19).

En algunas situaciones el anticuerpo monoclonal puede ser "demasiado" específico, puede ser que no reconozca a algunos miembros de un grupo de moléculas, como por ejemplo, algunas cepas variantes de microorganismos.

Sin embargo, todos estos inconvenientes pueden resolverse en ocasiones utilizando una mezcla apropiada de anticuerpos monoclonales que se comportan como los sueros heterogéneos (45).

Resulta prácticamente imposible describir en la actualidad todas las aplicaciones que han tenido los anticuerpos monoclonales y todas las áreas de la biología beneficiadas con la introducción de esta tecnología que ha revolucionado la investigación en las ciencias biológicas.

Los anticuerpos monoclonales se han usado para definir, purificar, detectar, cuantificar, modificar, seleccionar y localizar antígenos (20). En la Tabla II se muestran algunos ejemplos de

T A B L A II

EMPLEO DE ANTICUERPOS MONOCLONALES

Uso	Aplicación	Ejemplo
Definición de Antígenos	En bacterias virus y parásitos	Se ha simplificado su clasificación
	En células	Se han establecido 11 antígenos de células T de humanos
		Tipificación de antígenos de histocompatibilidad Antígenos presentes en tumores
Purificación	Factores, hormonas	El interferón se ha enriquecido 5000 veces
	Membrana celular	El antígeno Ia de la rata se ha enriquecido 200 veces
Detectar y cuantificar	En mezclas	Gonadotropina coriónica humana en pruebas de embarazo
Mapear	Caracterización de epítopes	Siete determinantes en la cadena μ de Ig de ratón (región constante)
Modificar	Infectividad	Esporozoito de <u>Plasmodium berghei</u>
	Toxicidad	Sobredosis de digitonina
	Función	Anti-Ly2 elimina la función de células T
	Inmunogenicidad	Factor α -Rhesus
Seleccionar	α -Idiotipo	Aumento y supresión de la respuesta inmune anti-NP
	Mutaciones	Antígeno de histocompatibilidad Virus A de la influenza
Localizar	En órganos	El sistema nervioso de la sanguijuela
	En el cuerpo	Imágenes de tumores en humanos

Tomado de: Kohler, G. (1984) Derivation and diversification of monoclonal antibodies. Novel lecture. Bioscience Reports 5: 533-549

las aplicaciones que han tenido estos anticuerpos.

En el área de las neurociencias los anticuerpos monoclonales han tenido gran relevancia, a este respecto puede consultarse la revisión realizada por Valentino y colaboradores (21). Así mismo se han obtenido resultados muy prometedores para el empleo futuro de los anticuerpos monoclonales en inmunoterapia (46, 47, 48).

III. Actina y Geles Citoplásmicos.

El citoesqueleto de la célula eucariota está constituido por tres sistemas de polímeros biológicos: Los microtúbulos (69, 70, 71, 72), los microfilamentos (73, 74, 75, 76, 77) y los filamentos intermedios (78, 79). Estos polímeros son formados a partir de subunidades proteínicas y se encuentran asociados a numerosos polipéptidos que desempeñan funciones de organización y regulación.

El sistema de microfilamentos tiene como subunidad fundamental a la actina, una molécula polipeptídica con peso molecular de 43,000 daltones, que fue aislada y caracterizada originalmente a partir de músculo esquelético (80). En 1966 se reportó la purificación de actina de Physarum (81) y actualmente se sabe que la actina esta presente en todas las células eucariotas (82, 73), llegando a representar hasta el 20 por ciento de la proteína celular total.

En las células musculares prácticamente toda la actina se encuentra en forma polimerizada constituyendo los filamentos finos. En las células de tipo no muscular la actina adopta diversas

formas de organización; puede encontrarse en forma monomérica no polimerizada (actina G) llamada también actina soluble (76), en forma polimerizada en los microfilamentos (actina F) o en agregados más complejos como racimos y mallas (76, 83), que pueden observarse por inmunotinción y microscopía electrónica.

En cada monómero de actina existe un sitio para la unión con ATP (84) y un sitio de alta afinidad para cationes divalentes, que puede ser ocupado por Ca^{++} o por Mg^{++} (85). La actina puede interaccionar en forma específica con otras proteínas y con algunas drogas.

En su forma monomérica la actina interacciona específicamente con la enzima DNAsa I (86), con la profilina (87) y con algunas otras proteínas que despolimerizan a la actina (88, 89, 90). En su forma filamentosa cada molécula de actina debe tener un mínimo de tres sitios de contacto para interaccionar con otras moléculas de actina (91). Hasta la fecha se han encontrado una gran cantidad de proteínas que interaccionan con la actina F y que intervienen en la regulación de la polimerización. Estas proteínas se han clasificado de acuerdo a las características que comparten, por ejemplo, las proteínas que se unen a los extremos de los filamentos como Gelsolina (92), Villina (93) y otras proteínas con funciones similares aisladas de plaquetas humanas (94), Acanthamoeba castellanii (95) y leucocitos (96). Proteínas con comportamiento mixto como la fragmina (97) que puede unirse a la actina G a baja fuerza iónica y se une a los extremos de los filamentos en condiciones de alta fuerza iónica. Están también las

proteínas que entrecruzan filamentos de actina como la fimbrina (98), la actinogelina (99), α -actinina (100), filamina (101), espectrina (102), fascina (103) vinculina (104) y otras similares aisladas de Acanthamoeba (105), Dictyostelium (106) y macrófagos de conejo (107). Finalmente las proteínas que se asocian con los filamentos pero no los entrecruzan, como la tropomiosina. También se ha encontrado que la actina interacciona específicamente con enzimas glucolíticas (108) y aún con la enzima RNA polimerasa II (109).

El estudio de estas proteínas se ha favorecido por el empleo de sistemas modelo de gelificación citoplásmica. La gelificación citoplásmica fue caracterizada por primera vez por Kane en 1975 (11), esta metodología se basa en la propiedad que posee el citosol de gelificar bajo condiciones adecuadas. Actualmente se conocen varios sistemas celulares donde ha sido posible desarrollar la gelificación citoplásmica (111, 112), los requerimientos en todos los casos han resultado ser similares. El principal constituyente proteínico de estos geles es la actina. Además de la actina existen otras proteínas que también intervienen en la formación de estos geles citoplásmicos tridimensionales. Este sistema de gelificación permite el estudio in vitro de algunas funciones reguladoras del citoesqueleto celular.

En nuestro laboratorio hemos desarrollado un sistema para obtener geles citoplásmicos a partir de tejido nervioso de rata. Estos geles están constituidos principalmente por la actina y por cuando menos otras tres proteínas que tienen pesos moleculares de

alrededor de 55,000, 140,000 y 220,000 daltones. Esta última proteína ha sido identificada en este laboratorio y corresponde a la proteína fodrina (116). Aparentemente estas tres proteínas interactúan de manera específica con la actina, por lo que sospechamos que pudieran tener algún papel en la regulación de la polimerización de dicha proteína.

Entre los objetivos de este laboratorio se encuentra el de separar cada una de las proteínas asociadas a la actina en los geles citoplásmicos. Una vez aisladas estudiaremos en detalle su interacción con la actina.

Hasta el momento hemos encontrado grandes dificultades para obtener por separado cada una de las proteínas que constituyen a los geles citoplásmicos, debido a que aunque las uniones entre ellas no son covalentes, parecen ser muy fuertes resistiendo incluso a algunos agentes fuertemente desnaturalizantes.

La obtención de anticuerpos monoclonales usando como antígeno a la mezcla de las proteínas que constituyen a los geles citoplásmicos, a la vez que podría hacer trivial la separación de dichas proteínas con el objeto de ser usadas como antígenos individuales, contribuiría a resolver una gran parte de los objetivos de varios proyectos planteados en este laboratorio.

O B J E T I V O S

1. Establecer en nuestro laboratorio la metodología necesaria para la producción de hibridomas y anticuerpos monoclonales que serán incorporados no solamente como herramientas útiles en el estudio de las proteínas que constituyen a los geles citoplásmicos, sino para abrir nuevas perspectivas en el estudio de este y otros sistemas abordados en nuestro laboratorio.
2. Obtener hibridomas productores de anticuerpos monoclonales que reconozcan específicamente a una o varias de las proteínas que constituyen los geles citoplásmicos de cerebro de rata.

M A T E R I A L E S Y R E A C T I V O S

Las células Rat 1 fueron proporcionadas por el Dr. Igor Tamm de la Universidad Rockefeller de Nueva York. Las células de mieloma de la línea P3X63-Ag8.653 fueron proporcionadas por el Dr. Angel De Blas de la Universidad Estatal de Nueva York, en Stony Brook.

El suero fetal bovino, el conjugado anti-inmunoglobulinas de ratón acoplado a peroxidasa (E-1084-A) y el conjugado anti-inmunoglobulinas de ratón acoplado a fluoresceína (E-1370-A) se obtuvieron de HyClone Laboratories, Inc.

Los medios y reactivos para cultivo de células se obtuvieron de GIBCO. El medio NCTC 109 se obtuvo de M.A. Bioproducts.

La insulina bovina, albúmina sérica bovina, tween-20, Tritón X-100, o-feniléndiamina, ácido oxalacético, aminopterina, timidina, hipoxantina, piruvato, 8-azaguanina y dimetil sulfóxido se obtuvieron de Sigma Co.

El polietilenglicol 4000 se obtuvo de BDH. La acrilamida y bisacrilamida se obtuvieron de los Laboratorios Serva. El persulfato de amonio y el TEMED se obtuvieron de Bio-Rad Laboratories. El formaldehído se obtuvo de Aldrich Chemical.

Las membranas de nitrocelulosa se obtuvieron de Schleicher & Shuell B A 85. La película para fotografía (Tri-X-Pan y Plus-X-Pan)

de Kodak de México.

Todos los demás reactivos fueron del grado analítico o reactivo.

M E T O D O S

I. Cultivo de Células

A. Soluciones y medios de cultivo.

a) Medio Mínimo Esencial modificado por Dulbecco (DMEM)

Se disolvieron 13.38 g de DMEM (Gibco 430-2100) en un litro de agua bidestilada estéril y se le agregó 3.7 g de bicarbonato de sodio. Se ajustó el pH del medio a 6.8 burbujeando CO_2 , se esterilizó por filtración (filtro Millipore 0.22 μm) y se almacenó a 4°C.

b) Solución HT (hipoxantina-timidina)

Para preparar una solución 100 X, se disolvieron 135 mg de hipoxantina (10^{-2} M) y 38.7 mg de timidina (1.6×10^{-3}) en 100 ml de agua bidestilada estéril. Se ajustó el pH a 10 con NaOH. Se esterilizó por filtración y almacenó en alícuotas de 10 ml a -20°C.

c) Solución A (aminopterinina)

Para una solución 100 X, se disolvieron 44 mg de aminopterinina (10^{-4} M) en un litro de agua bidestilada estéril. Se ajustó el pH a 9.8. Se esterilizó por filtración y almacenó en alícuotas protegidas de la luz a -20°C.

d) Medio super HAT (hipoxantina-aminopterinina-timidina)

Para un litro se mezclaron 870 ml de DMEM, 10 ml de solución

HT, 10 ml de solución A, 10 ml de una solución de aminoácidos no esenciales (GIBCO), 100 ml de medio NCTC 109 (M.A. Bioproducts). Se adicionaron 7.4 mg de insulina bovina (0.2 U/ml), 292 mg de glutamina (2 mM), 132 mg de ácido oxaloacético (1 mM) y 55 mg de piruvato de sodio (0.5 mM). Se esterilizó por filtración y almacenó a 4°C.

e) Medio de congelación

Para 100 ml se mezclaron 10 ml de dimetilsulfóxido (DMSO 10%) y 50 ml de DMEM. Se esterilizó por filtración y se adicionaron 50 ml de suero fetal de ternera (SFT) estéril. Se almacenó en alícuotas a -20°C.

f) Solución salina con amortiguador de fosfatos (PBS) para cultivo

NaCl 137 mM, KCl 2.7 mM, MgCl₂ 0.5 mM, CaCl₂ 0.9 mM, KH₂PO₄ 1.5 mM, Na₂PO₄ 8.1 mM, disueltos en agua bidestilada estéril. Se ajustó el pH a 7.2. Se esterilizó por filtración y almacenó a temperatura ambiente.

g) Polietilenglicol (PEG) para la fusión

El polietilenglicol se utilizó al 50% para la fusión. Se esterilizó en autoclave un gramo de polietilenglicol (PEG 4000) en un tubo cónico, se le adicionó un mililitro de DMEM sin suero y se mantuvo a 60°C hasta la fusión. Esta solución se preparó justo antes de la fusión.

B. Técnicas de Cultivo

a) Cultivo de Mielomas

En este trabajo utilizamos la línea celular P3X63-Ag8.653, derivada de ratones BALB/c (32). Las células se descongelaron dos semanas antes de la fusión y se sembraron cada dos o tres días de manera que no sobrepasaran concentraciones de 6×10^5 células/ml de medio de cultivo. Una semana antes de la fusión, las células crecieron durante 3 días en DMEM adicionado con 8-azaguanina (20 $\mu\text{g/ml}$) para eliminar a los mielomas revertantes.

b) Congelación de Células

Las células se despegaron, se tomó una alícuota para contar y se centrifugó a $600 \times g$ durante 5 minutos a temperatura ambiente. Se desechó el sobrenadante y se resuspendieron las células en medio de congelación ($5 \times 10^6 - 10 \times 10^6$ cels/ml). Se transfirieron a los criotubos (1 ml/tubo) y se mantuvieron durante la noche a -70°C en un ultracongelador y al día siguiente se transfirieron al tanque de nitrógeno líquido para su almacenamiento. En algunos de los artículos citados se sugieren alternativas para la congelación (57, 58, 59 y 68).

c) Descongelación de Células.

Se retiró el criotubo del tanque de nitrógeno líquido y se mantuvo en hielo seco unos segundos hasta que se eliminó el nitrógeno. Inmediatamente después se sumergió en etanol al 70% (a 37°C) hasta que se descongeló. El contenido se vacía en un tubo cónico que contenía 40 ml de medio de cultivo con suero fetal de

ternera. Se centrifugó a 600 X g durante 5 minutos y la pastilla se resuspendió en 5 ml de medio de cultivo. Se sembraron las células en una caja pequeña.

II. Esquema de Inmunización

Se inyectaron intraperitonealmente tres ratones BALB/c de 6 a 8 semanas de edad. En la primera inmunización las proteínas de los geles citoplasmicos de cerebro de rata se mezclaron con adyuvante completo de Freund. En la segunda inmunización se utilizó adyuvante incompleto y en la tercera se inyectaron las proteínas en una solución salina fisiológica sin adyuvante. Los ratones se inyectaron a intervalos de 15 días con 150 µg de proteína de geles citoplasmicos de cerebro. Los ratones se sangraron ocho días después de la última inmunización para verificar la presencia de anticuerpos específicos en los sueros. Tres días antes de la fusión se inyectó al ratón con 50 µg de proteína en solución salina por vía intravenosa. Existen varias alternativas para protocolos de inmunización (60, 61, 62, 66).

III. Producción de Hibridomas

A. Preparación de las células de mieloma

Se utilizaron cultivos celulares en fase exponencial de crecimiento. Las células se despegaron de la caja, se tomó una alícuota para contarlas, se centrifugaron 600 X g durante 5 minutos a temperatura ambiente y se resuspendieron en 10 ml de DMEM (sin SFT). Se utilizaron entre 2×10^7 y 5×10^7 células para la fusión.

B. Preparación de las células del bazo de ratones BALB/c

El ratón se sacrificó por dislocación cervical y se sumergió durante un minuto en etanol al 70%. Todos los pasos siguientes se realizaron en la campana de flujo laminar en condiciones estériles. El animal fue colocado con el lado izquierdo hacia arriba en una caja de Petri, se obtuvo el bazo usando varios juegos de instrumentos estériles. Se sumergió en 2 ml de PBS que contiene 2% de suero fetal de ternera. Con unas tijeras se trituró el bazo hasta tenerlo en pedazos pequeños. Se pipeteó el PBS con el tejido para disgregar las células. Se dejó que los pedazos grandes sedimenten por gravedad y se transfirió el sobrenadante a un tubo cónico. Se centrifugó a 600 X g durante 5 minutos. Se resuspendió en 5 ml de DMEM (sin suero) y se mantuvieron a 37°C hasta la fusión.

Las células del bazo de ratones no inmunes (alimentadoras) se obtuvieron de la misma manera pero se resuspendieron en 10 ml de medio super HAT con 10% de suero fetal de ternera.

C. Fusión Celular

Se colocaron las células de mieloma (2×10^7 - 5×10^7) y las células del bazo del ratón inmune (1×10^8) en un tubo cónico de 50 ml. Se centrifugaron a 600 X g durante 7 minutos a temperatura ambiente y se desechó el sobrenadante por aspiración. Se rompió la pastilla golpeando el fondo del tubo para mezclar las células.

A partir de este momento todas las operaciones se realizaron a 37°C. Se agregó lentamente 0.8 ml de PEG al 50% resbalando por

la pared del tubo durante el transcurso de un minuto. Se agregaron 20 ml de DMEM (sin suero) durante 5 minutos. Se centrifugaron las células a 600 X g durante 7 minutos a temperatura ambiente. Se descartó el sobrenadante y se aspiró el medio restante. Se agregaron 10 ml de super HAT con 10% de suero fetal de ternera y se resuspendieron las células pipeteando varias veces. Se agregaron 40 ml de super HAT con suero y se suspendieron las células homogéneamente. Se agregaron 0.75 ml de células alimentadoras (7.5×10^6 células) y se agitó el tubo. Se distribuyeron en cajas de microcultivo (96 pozos) colocando una gota por pozo.

Las placas de microcultivo se incubaron a 37°C con 10% de CO₂. Los cultivos se alimentaron adicionando una gota de medio completo, a los 5 y 10 días después de la fusión. Dos o tres semanas después se observó el crecimiento de colonias de células.

D. Clonación por Dilución Limitada

Se obtuvieron células alimentadoras del bazo de un ratón normal de la manera antes descrita. Se despegaron las células y se contaron, se realizó la dilución de manera que quedaron 0.5 y 1 célula por pozo (30 y 60 células en 7.5 ml de medio HAT). Se adicionaron las células alimentadoras y se sembraron las placas de microcultivo depositando una gota en cada pozo. Cinco días después se alimentaron los cultivos adicionando una gota de medio HAT.

IV. Detección de Hibridomas Productores

A. Ensayo Inmunoenzimático (ELISA)

El procedimiento empleado en este ensayo fue esencialmente el

descrito por Engvall (64, 65). Se utilizaron placas de microtitulación (Nunc) de poliestireno. El antígeno se adsorbió mediante la incubación de 100 μ l por pozo de una solución de proteínas de geles citoplásmicos de cerebro de rata conteniendo 20 μ g/ml en una solución salina amortiguada con fosfatos (PBS, fosfato de sodio 0.01 M pH 7.2 y NaCl 0.9%). Las placas se incubaron 2 horas a 37°C (67).

La solución del antígeno se aspiró y se saturaron los sitios libres del poliestireno agregando 100 μ l de albúmina sérica bovina al 1% disuelta en PBS-Tween-20 0.05% e incubando una hora a 37°C. La placa se lavó con PBS-Tween.

La placa se incubó con 100 μ l del sobrenadante de los híbridos (medio de cultivo), durante 2 horas a 37°C. Se descartó el sobrenadante y se lavó la placa.

Las inmunoglobulinas unidas específicamente se detectaron con el conjugado peroxidasa anti-IgG de ratón, diluido 1:2000 en PBS-Tween con albúmina al 1%. Se incubaron 100 μ l por pozo durante 2 horas y se lavó la placa.

Para detectar el conjugado unido se agregaron 100 μ l por pozo de la solución del sustrato que contenía o-fenilendiamina 2.7×10^{-3} M, H_2O_2 al 0.01% en amortiguador de citratos 3.7×10^{-3} M pH 5, la reacción transcurrió a 37°C en la oscuridad durante 15 minutos o hasta que se desarrolló el color en los controles positivos. La reacción enzimática se detuvo mediante la adición de una gota de H_2SO_4 4N.

Los resultados se analizaron visualmente en relación a los controles negativos.

B. Inmunofluorescencia de células en cultivo

Para las inmunotinciones se utilizaron las líneas celulares Rat 1 derivada de fibroblastos y la L6E9 derivada de mioblastos de rata. Las células se crecieron sobre cubreobjetos de vidrio. Se les retiró el medio de cultivo y se lavaron 3 veces con PBS. Se fijaron en formaldehído al 3.7% en PBS durante 30 minutos. Se lavaron 3 veces durante 5 minutos con PBS y se permeabilizaron adicionando tritón X-100 al 0.5% en PBS, incubando 10 minutos. Se lavaron con PBS 3 veces durante 5 minutos. Se adicionaron 30 μ l del medio de cultivo de hibridomas y se incubó durante 20 minutos. Los cubreobjetos se sumergieron 3 veces en PBS y se lavaron 3 veces. Se agregó el 2° anticuerpo (conejo anti-IgG de ratón conjugado a fluoresceína) diluido 1 a 50 en PBS y se incubó durante 20 minutos. Se sumergieron 3 veces en PBS y se lavaron 3 veces. Se enjuagaron con agua bidestilada y se montaron en el portaobjetos con una gota de gelvatol-fenilendiamina. Se observó la tinción en el microscopio de fluorescencia.

C. Inmunodetección de proteínas electrotransferidas de poliacrilamida a nitrocelulosa

a) Electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS

La electroforesis se hizo en geles planos de poliacrilamida de 14 X 14 cm y 1.5 mm de espesor, preparados de acuerdo con el procedimiento descrito por Laemmli (55).

El gel separador se preparó a las concentraciones finales siguientes: acrilamida 10%, bisacrilamida 0.27%, SDS 0.1% y Tris-HCl 0.38 M de pH 8.8. La polimerización se realizó al agregar persulfato de amonio al 0.06% y Temed al 0.08%.

El gel concentrador se preparó con las concentraciones finales siguientes: acrilamida 5%, bisacrilamida 0.14%, SDS 0.1% y Tris-HCl 0.125 M de pH 6.8. Para polimerizar el gel se adicionaron persulfato de amonio al 0.05% y Temed al 0.01%.

La solución amortiguadora que se utilizó para la electroforesis contenía: glicina 0.192 M, SDS 0.1% y Tris-HCl 0.025 M de pH 8.3. La electroforesis se corrió a 100 voltios durante el tiempo necesario para que el colorante usado como marcador llegara a un centímetro de la base del gel.

En la mayor parte de los casos las muestras para la electroforesis fueron liofilizadas y posteriormente disueltas en la solución de Laemmli (55) para muestras, compuesta por rojo de fenol 2.8×10^{-5} M, SDS al 2%, glicerol al 10% y Tris-HCl 0.6 M pH 6.8. A continuación se ajustaron a una concentración final de 5% de β -mercaptoetanol y se calentaron a 100°C por tres minutos y se aplicaron al gel. La cantidad de proteína fue de 3 mg de gel de cerebro en un volumen de 1 ml.

b) Transferencia a papel de nitrocelulosa

Este método está basado en lo descrito por Towin y colaboradores (63). El gel se incubó 2 veces durante 30 minutos en el amortiguador de transferencia (glicina 192 mM, metanol 20%, Tris-

HCl 25 mM de pH 8.3). Se cortó el papel de nitrocelulosa (PNC) ligeramente mayor al tamaño del gel y se incubó 5 minutos en agua. Se equilibró el PNC en el amortiguador de transferencia durante 15 minutos. Se humedecieron 2 hojas de papel Whatman en el amortiguador y se hizo el "sandwich" de manera que el gel y el papel de nitrocelulosa quedaran en contacto sin atrapar burbujas entre ellos.

Se colocaron el gel y el papel unidos en la cámara llena de amortiguador asegurándose que el gel quedara orientado hacia el cátodo (-) y el PNC hacia el ánodo (+). Se transfirió durante la noche a 50 voltios.

Después de la transferencia el gel se tiñó con azul de Coomassie para verificarla (ácido tricloroacético al 50% y 0.1% de azul de Coomassie). Se recortó una tira del PNC y se tiñó un minuto con negro de amido (negro de amido 0.1% en 45% metanol y 10% ácido acético) y se destiñó unos minutos con una solución 90% de metanol y 2% de ácido acético.

Para bloquear los sitios de unión inespecífica el papel se incubó en albúmina sérica bovina al 3% en una solución salina (NaCl 0.9%, Tris-HCl 10 mM pH 7.4) durante 12 horas a temperatura ambiente y con agitación.

c) Inmunodetección

La inmunodetección se realizó básicamente con el método descrito por De Blas (56). Se lavó el papel con PBS-Tween 0.05% y se recortó en tiras de 3 mm. Las tiras se incubaron con el medio

de cultivo de hibridomas de 2 a 3 horas a temperatura ambiente y con agitación. Se lavaron las tiras 3 veces con PBS-Tween y se agregó el 2° anticuerpo (conejo anti-IgG de ratón acoplado a peroxidasa) diluido 100 veces en PBS-Tween y se incubó una hora a temperatura ambiente. Se lavó tres veces con PBS-Tween durante 5 minutos. Se lavó con una solución de fosfatos 50 mM pH 7.4 durante 5 minutos.

Para revelar la reacción se incubaron las tiras de papel a temperatura ambiente durante 10 minutos en la solución de preincubación (solución saturada de diaminobencidina DAB en fosfatos 50 mM pH 7.4). Se incubó de 30 a 40 minutos más en el revelador (Solución saturada de DAB en fosfatos 50 mM pH 7.4, 0.03% de cloruro de cobalto, 0.03% de sulfato de nickel amonio y 0.005% de H_2O_2) con agitación constante. Se usaron guantes, mascarilla y se realizaron las operaciones en la campana extractora, ya que el DAB es carcinogénico (56). Se lavaron las tiras 4 veces con amortiguador de fosfatos durante 5 minutos. Se lavaron 2 veces con agua bidestilada. Se incubaron las tiras con 0.1% de OsO_4 en agua por cinco segundos y se lavaron con agua bidestilada.

V. Gelificación de extractos Citoplásmicos de Cerebros de Ratas

Los cerebros de un número variable de ratas de 8 días de edad, de la cepa Wistar-Porton, fueron disecados, lavados con una solución 0.15 M de NaCl, a 0°C, y secados sobre papel filtro Whatman No. 2. Este tejido nervioso fue pesado y homogeneizado con un volumen de una solución amortiguadora que contenía 40 mM de Tris-

HCl pH 7.4, 0.5 mM ATP, 1.0 mM EDTA y 10 mM de β -mercaptoetanol. La homogeneización se hizo en un homogeneizador del tipo Dounce, mediante 7 movimientos del émbolo. El homogeneizado fue centrifugado a 10,000 X g, a 4°C, durante 15 minutos; el sobrenadante de esta centrifugación fue centrifugado nuevamente, en esta ocasión a 100,000 X g, a 4°C, durante 60 minutos. El sobrenadante fue incubado a 25°C por 60 minutos. El gel tridimensional formado durante esta última incubación fue roto mediante agitación en un agitador tipo "vortex", y fue centrifugado a 10,000 X g, a 25°C, durante 15 minutos. La pastilla de esta centrifugación fue lavada en dos ocasiones con solución GM-1 que contenía 0.5% de Tritón X-100. Las pastillas lavadas fueron denominadas "geles citoplasmicos". En general estas pastillas fueron almacenadas a -70°C hasta antes de ser usadas.

R E S U L T A D O S

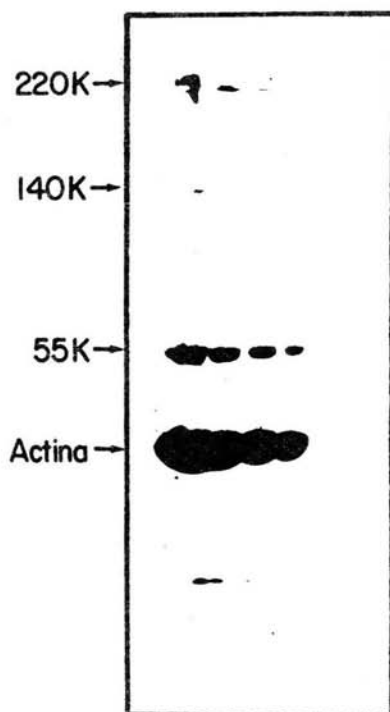
I. Análisis electroforético de las proteínas de geles citoplásmicos de cerebro de rata

Antes de inmunizar a los ratones las pastillas de geles citoplásmicos de cerebro de rata de 8 días de nacidas se analizaron electroforéticamente en un gel de poliacrilamida con SDS y 8 M urea con la finalidad de verificar la composición de las proteínas que constituyen el gel y que han sido descritas en trabajos anteriores (113, 114). En la Figura 7 puede verse que estos geles están constituidos principalmente por la proteína actina y por lo menos otras tres proteínas que tienen pesos moleculares de alrededor de 55,000, 140,000 y 220,000 daltones. En cada uno de los carriles se corrieron distintas cantidades de proteína de la misma pastilla de geles citoplásmicos. Las proteínas contenidas en esta pastilla se utilizaron tanto para la inmunización de los ratones como para la detección de los híbridos productores de anticuerpos específicos dirigidos contra ellas.

II. Análisis de los sueros de los ratones inmunes

Los ratones inmunizados con el esquema descrito en la sección de métodos fueron sangrados ocho días después de la 3a. inmunización para obtener los sueros. La inmunoreactividad de los sueros fue analizada primero con un ensayo inmunoenzimático (ELISA), donde se obtuvieron los resultados que se presentan en la Tabla III. Como puede verse los sueros de los tres ratones inmunizados fueron igual

Figura 7. Análisis electroforético de las proteínas de geles citoplásmicos de cerebro de rata. La pastilla de geles citoplásmicos se disolvió en el amortiguador de lisis y se aplicaron las siguientes cantidades de proteína; 100, 80, 60 y 40 μg de izquierda a derecha. Se corrió un gel de poliacrilamida al 10% que contenía SDS y 8 M urea. Se observan las proteínas que constituyen el gel: actina, 55K, 140K y 220K. La proteína de 220K ha sido identificada en el laboratorio como la fodrina (116).



T A B L A I I I

TITULACION DE LOS SUEROS DE LOS RATONES INMUNES

Ratón BALB/c	Título del Suero
1	negativo (control)
2	1/5000
3	1/5000
4	1/5000

Los títulos de los sueros de los ratones inmunes se determinaron con el ensayo de ELISA y la valoración se realizó de manera visual comparándolos con los controles negativos (suero de ratones no inmunizados). El suero del ratón marcado con el número uno es un suero normal de un animal que no fue inmunizado.

mente positivos, lo cual indica que hubo una buena producción de anticuerpos específicos en todos los casos.

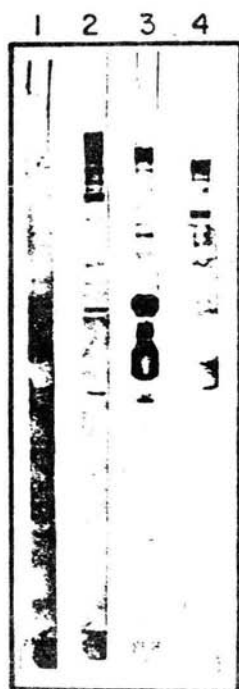
De acuerdo a los resultados del ensayo de ELISA los tres ratones inmunes eran buenos candidatos para la fusión. Para determinar cual de los ratones inmunes se utilizaría se decidió realizar una inmunodetección de las proteínas del gel citoplásmico electrotransferidas de un gel de poliacrilamida a papel de nitrocelulosa. Con este ensayo puede determinarse contra cuales de las proteínas están dirigidos los anticuerpos de los sueros de los ratones inmunes. Como puede verse en la Figura 8 el suero del ratón marcado con el número 2 reconoce principalmente proteínas de alto peso molecular. El suero del ratón número 3 muestra inmunoreactividad con la mayoría de las proteínas que constituyen el gel. En el caso del ratón número 4 la inmunoreactividad principal es con las proteínas de alto peso molecular y un reconocimiento más débil de la proteína actina.

Basándonos en los resultados de estos ensayos se decidió emplear el bazo del ratón número 3 para la fusión, ya que el suero de este ratón presentaba inmunoreactividad con todos los componentes del gel citoplásmico de cerebro, teniendo la posibilidad de obtener anticuerpos monoclonales contra cada uno de ellos.

III. Fusión Celular

Las células obtenidas del bazo del ratón inmune marcado como número 3 se fusionaron con células de mieloma de la línea P3K63-Ag8.653 en la forma descrita en la sección de métodos. El

Figura 8. Inmunodetección de proteínas electrotransferidas de un gel de poliacrilamida a papel de nitrocelulosa. Se corrieron las proteínas del gel citoplásmico y se transfirieron a papel de nitrocelulosa como se describe en la sección de métodos. Carril 1, inmunodetección con el suero de un ratón no inmunizado (control). Carriles 2, 3 y 4, inmunodetección con los sueros de los ratones inmunes marcados con los números 2, 3 y 4 respectivamente.



total de las células resultantes de esta fusión se distribuyó en 8 placas de microcultivo, cada una de estas placas tiene 96 pocillos independientes y suman en total 768 cultivos individuales. Quince días después de la fusión cada uno de los cultivos se inspeccionó visualmente, con la ayuda de un microscopio invertido, para detectar el crecimiento de colonias de híbridos. En la Tabla IV se resume el número de colonias presentes por cultivo y el total de cultivos con colonias en cada placa de microcultivo. Como puede verse del total de 768 microcultivos, 720 mostraron crecimiento, variando de una colonia por pocillo hasta más de siete.

En la Tabla V se muestra la eficiencia de hibridación que fue del 93.7%, esta eficiencia indica que de cada 100 cultivos sembrados en 93.7 de ellos se detectó crecimiento celular. En esta misma tabla se presenta el porcentaje de colonias por cultivo, puede observarse que el porcentaje más alto corresponde a 2 colonias por cultivo, este porcentaje disminuye conforme aumenta el número de colonias. En la línea que corresponde a 7 o más colonias se han agrupado todos aquellos pozos que tenían entre 7 y 13 colonias, siendo 13 el número máximo de colonias detectadas por cultivo.

IV. Detección de hibridomas productores de inmunoglobulinas específicas

En la tercera semana después de la fusión se observó que en la mayoría de los pocillos el medio de cultivo se había tornado amarillo, lo que indica que los cultivos han alcanzado el crecimiento necesario para realizar los ensayos de detección de anti-

TABLA IV

RESUMEN DEL NUMERO DE COLONIAS DE HIBRIDOS Y DE CULTIVOS CON COLONIAS OBTENIDAS DE LA FUSION DEL BAZO DEL RATON NUMERO 3 INMUNIZADO CON PROTEINAS DE GELES CITOPASMICOS DE CEREBRO DE RATA

Número de colonias por cultivo	Placa de microcultivo								Total
	3A	3B	3C	3D	3E	3F	3G	3H	
1	21	14	12	16	15	14	5	8	105
2	19	22	29	28	23	20	16	12	169
3	15	24	20	21	15	16	18	8	137
4	11	14	14	11	15	15	12	11	103
5	8	7	13	4	8	7	6	15	68
6	4	5	3	4	5	6	10	8	45
7	6	9	4	5	10	10	19	30	93
Cultivos con colonias	84	95	95	89	91	88	86	92	720

El número de colonias por cultivo y el número de cultivos con colonias se determinó por inspección visual en un microscopio invertido.

T A B L A V

FUSION DE CELULAS ESPLENICAS DE RATON BALB/c
(INMUNIZADO CON GELES CITOPLASMICOS DE CEREBRO DE RATA) CON CELULAS DE MIELOMA DE LA LINEA P3X63 - Ag8.653.

Eficiencia de hibridación	93.7 %
Colonias por cultivo	
1	14.6 %
2	23.5 %
3	19.0 %
4	14.3 %
5	9.4 %
6	6.3 %
7	12.9 %
Eficiencia específica	18.3 %

La presencia de anticuerpos contra proteínas de los geles citoplásmicos de cerebro se determinó por el ensayo de ELISA.

cuerpos específicos en el medio de cultivo. Se tomaron 100 μ l del medio de cultivo de cada uno de los 720 pocillos que mostraron crecimiento para analizarlos mediante el ensayo inmunoenzimático en fase sólida (ELISA), como se describe en la sección de métodos. Para este ensayo se utilizó como ligando (antígeno) la misma mezcla de proteínas de los geles citoplásmicos que se empleó en las inmunizaciones.

En la Tabla VI se presentan los resultados del ELISA. El desarrollo de color en el ensayo se evaluó de manera visual por comparación con los controles negativos (medio de cultivo de mielomas) y se les asignó un valor de una, dos o tres cruces en orden creciente de intensidad del color desarrollado durante la reacción. Como puede verse, de los 720 medios de cultivo ensayados, 132 fueron positivos en el ensayo de ELISA, lo cual indica la presencia en los cultivos de híbridos productores de anticuerpos específicos contra proteínas de los geles citoplásmicos. La eficiencia específica de hibridación que se muestra en la Tabla V se calculó basándonos en estos resultados del ELISA y significa que de cada cien cultivos en los que se presentó crecimiento celular 18.3 contenían hibridomas productores de anticuerpos específicos contra proteínas de los geles citoplásmicos.

V. Inmunofluorescencia de células en cultivo

De los 132 cultivos que resultaron positivos en el ELISA, 110 fueron ensayados para la tinción de células en cultivo por inmunofluorescencia, empleando un segundo anticuerpo anti-inmunoglobulinas de ratón acoplado a fluoresceína, de la manera descrita en la

CULTIVOS DE HIBRIDOS CON RESULTADOS POSITIVOS EN ELISA

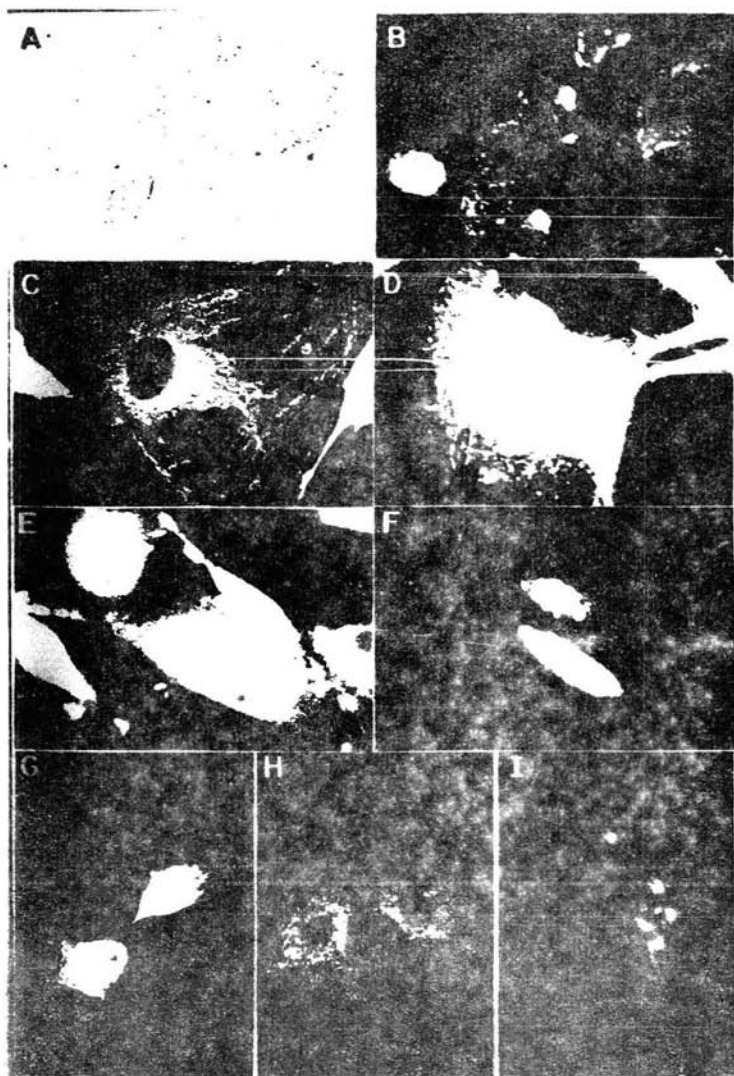
<u>CULTIVO ELISA</u>	<u>CULTIVO ELISA</u>	<u>CULTIVO ELISA</u>	<u>CULTIVO ELISA</u>
1. 3AA3 +++	34. 3CB11 +	67. 3EF8 ++	100. 3GH5 +
2. 3AA9 +	35. 3CC1 ++	68. 3EF12 +	101. 3GH8 +
3. 3AB3 +	36. 3CC2 +	69. 3EG1 ++	102. 3HA2 ++
4. 3AB4 +	37. 3CC4 +	70. 3EG9 +	103. 3HA5 +
5. 3AB10 +	38. 3CC5 ++	71. 3EH1 +	104. 3HA8 +
6. 3AC2 ++	39. 3CC8 +	72. 3EH5 +	105. 3HA10 ++
7. 3AD2 +	40. 3CD2 +	73. 3EH11 +	106. 3HA12 ++
8. 3AD5 +	41. 3CD4 ++	74. 3FB4 ++	107. 3HB1 +
9. 3AD10 +	42. 3CD8 ++	75. 3FC2 ++	108. 3HB4 ++
10. 3AE1 +	43. 3CE6 +	76. 3FC3 ++	109. 3HB8 +
11. 3AE7 +	44. 3CE11 +	77. 3FC4 ++	110. 3HB10 ++
12. 3AG10 ++	45. 3CF10 +	78. 3FC6 +	111. 3HB11 +
13. 3AH2 ++	46. 3CH4 +	79. 3FC11 +	112. 3HC11 ++
14. 3AH7 ++	47. 3CH7 ++	80. 3FC12 +	113. 3HC12 ++
15. 3AH8 ++	48. 3CH9 ++	81. 3FD2 ++	114. 3HD1 ++
16. 3BA9 ++	49. 3CH10 ++	82. 3FD7 ++	115. 3HD3 ++
17. 3BB1 +	50. 3DA8 ++	83. 3FE7 +	116. 3HD4 ++
18. 3BB3 ++	51. 3DB3 +	84. 3FF7 +	117. 3HD9 ++
19. 3BC10 +	52. 3DB5 ++	85. 3FG3 +	118. 3HD10 ++
20. 3BD2 +	53. 3DC10 +	86. 3FH1 +	119. 3HE1 ++
21. 3BD8 ++	54. 3DD2 ++	87. 3FH11 +	120. 3HE6 ++
22. 3BD11 +	55. 3DD8 ++	88. 3GC6 ++	121. 3HE7 ++
23. 3BF10 ++	56. 3DF2 ++	89. 3GD2 ++	122. 3HE12 ++
24. 3BG3 +	57. 3DG3 ++	90. 3GD5 ++	123. 3HF1 ++
25. 3BG4 +	58. 3DG11 +	91. 3GD11 ++	124. 3HF5 ++
26. 3BG5 +	59. 3DH9 +	92. 3GE10 +	125. 3HF8 ++
27. 3BG11 ++	60. 3DH11 +	93. 3GE11 +	126. 3HG1 ++
28. 3BH4 ++	61. 3EA12 +	94. 3GF1 +	127. 3HG2 ++
29. 3CB1 ++	62. 3EC12 +	95. 3GF9 ++	128. 3HG7 ++
30. 3CB2 +	63. 3ED10 +	96. 3GF12 ++	129. 3HG8 ++
31. 3CB3 ++	64. 3EE3 ++	97. 3GG1 ++	130. 3HH1 +
32. 3CB4 +	65. 3EE8 +	98. 3GG10 ++	131. 3HM2 ++
33. 3CB8 +	66. 3EE11 +	99. 3GG11 ++	132. 3HH8 +

La evaluación del ensayo se realizó de manera visual por comparación con los controles negativos (medio de cultivo de mielomas). Se les asignó un valor de 1, 2 ó 3 cruces en orden creciente de

sección de métodos. De los 110 medios de cultivo probados 39 fueron positivos y 71 negativos.

En la Figura 9 se muestran algunos de los patrones de tinción observados; en los recuadros A y B se presentan imágenes del mismo campo en microscopia de contraste de fases y microscopia de fluorescencia respectivamente. Como puede verse el patrón de tinción en inmunofluorescencia corresponde a lo que parece ser gran cantidad de vesículas de diversos tamaños, distribuidas en el citoplasma, que se observan claramente en la microscopia de contraste de fases. En el recuadro C vemos una tinción típica de filamentos de actina, se pueden observar racimos y mallas o redes de microfilamentos. La tinción del recuadro D resulta muy similar a las que suelen obtenerse con anticuerpos dirigidos a proteínas asociadas con actina como la α -actinina que muestran cierta periodicidad a lo largo de los racimos de microfilamentos (115). En el recuadro E vemos una tinción difusa de todo el citoplasma con algunos puntos más focalizados. En la fotografía del recuadro F se observa una tinción del núcleo celular y sus alrededores. En el recuadro G vemos una tinción que muestra lo que parecen ser microtúbulos. En la fotografía del recuadro H vemos una tinción difusa del citoplasma que se torna más intensa cerca del núcleo, además gran cantidad de vesículas que muestran una tinción similar a la que se obtiene con anticuerpos anti-clathrina, una proteína que reviste ciertas vesículas endocíticas (115). Finalmente en el recuadro I vemos una tinción que muestra un solo agregado fluorescente localizado cerca del núcleo.

Figura 9. Inmunofluorescencia de células en cultivo.
Recuadros A y B microscopia de contraste de fases y de fluorescencia del mismo campo. Recuadro B inmunofluorescencia de células L6E9 con el medio del cultivo 3CD8. Recuadro C, tinción de células Rat 1 con el medio del cultivo 3BB1. Recuadro D, tinción de células Rat 1 con el medio del cultivo 3FC4. Recuadro E tinción de células L6E9 con el medio del cultivo 3ED10. Recuadro F, tinción de células L6E9 con el medio del cultivo 3BF10. Recuadro G tinción de células L6E9 con el medio del cultivo 3GD11. Recuadro H tinción de células Rat 1 con el medio del cultivo 3FG3. Recuadro I, tinción de células L6E9 con el medio del cultivo 3FC2.

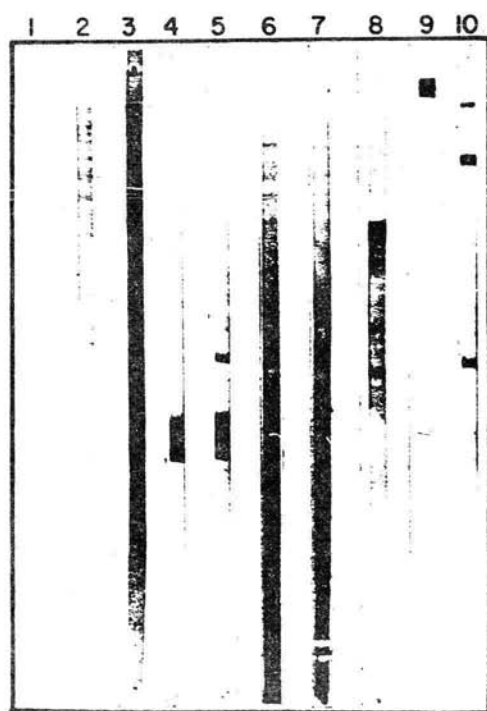


VI. Inmunodetección de proteínas electrotransferidas a nitrocelulosa

La inmunodetección de proteínas electrotransferidas de geles de poliacrilamida a papel de nitrocelulosa tiene como finalidad identificar por su peso molecular las proteínas reconocidas específicamente por los anticuerpos producidos por los híbridos. Los medios de cultivo de 81 de los pocillos analizados por inmunofluorescencia se emplearon para este ensayo, 49 fueron positivos reconociendo una o más bandas de proteína y 34 resultaron negativos ya que no revelaron ninguna banda.

En la Figura 10 carril 1 y 2 se muestra la inmunodetección, de electrotransferencias, con medio de cultivo de mielomas (control negativo) y medio del híbrido 3DH11 respectivamente, en ambos casos no existe reconocimiento de bandas de proteína, el híbrido 3DH11 es un ejemplo de los medios de cultivo que fueron negativos en este ensayo y que sin embargo, presentan inmunoreactividad en ELISA. En el carril 3 de la Figura 10 se observa el reconocimiento de una gran cantidad de bandas de proteína. En los carriles 4 y 5 se presenta la inmunodetección con los medios de cultivo de los híbridos 3GG10 y 3EA12 respectivamente; en el primer caso se aprecia la inmunoreactividad con la proteína actina y en el segundo con la actina y con otra proteína de 55,000 daltones. En la Figura 10, carril 6, el reconocimiento específico es contra la proteína 55K. En el carril 7 la inmunodetección corresponde a una proteína de peso molecular de 68,000 daltones. El carril 8 muestra la detección de un grupo de bandas de proteína de alto peso molecular, se observan por lo menos seis bandas bien definidas. En el carril

Figura 10. Inmunodetección de proteínas electrotransferidas de un gel de poliacrilamida a papel de nitrocelulosa. Se corrieron las proteínas de geles citoplásmicos y se transfirieron a papel de nitrocelulosa como se describe en la sección de métodos. Carril 1, inmunodetección con medio de cultivo de mielomas (control). Carril 2, inmunodetección con medio del cultivo 3DH11. Carril 3, inmunodetección con medio del cultivo 3DD7. Carril 4, inmunodetección con el medio del cultivo 3GG10. Carril 5, inmunodetección con el medio del cultivo 3EA12. Carril 6, inmunodetección con el medio del cultivo 3HG8. Carril 7, inmunodetección con el medio del cultivo 3FB4. Carril 8, inmunodetección con el medio del cultivo 3AE1. Carril 9, inmunodetección con el medio del cultivo 3AG10. Carril 10, inmunodetección con el medio del cultivo 3HF5.



9 el medio de cultivo 3AG10 reconoce específicamente 3 bandas claramente definidas de peso molecular mayor de 200,000 daltones, probablemente isoformas de la proteína fodrina (116). En el carril 10 se muestra la inmunoreactividad con tres proteínas; una de ellas 55K y las otras dos de alto peso molecular.

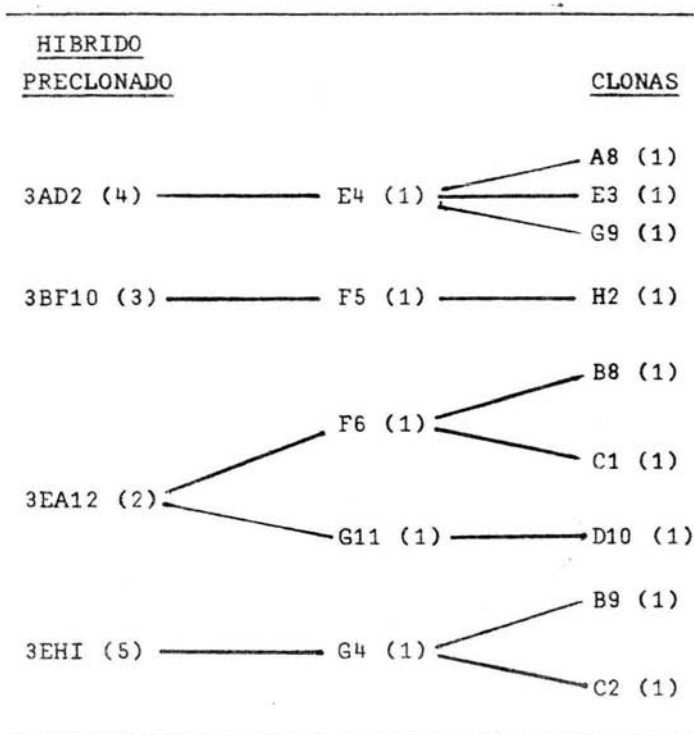
En la Figura 10 se muestran algunos ejemplos de los patrones encontrados en la inmunodetección de proteínas electrotransferidas. Cuando la detección fue positiva se observaron patrones que pueden agruparse en tres tipos básicos: reconocimiento de un número discreto de entre 2 y 6 bandas bien definidas; reconocimiento de una sola banda de proteína; reconocimiento de gran cantidad de bandas de varios pesos moleculares. De los 49 medios de cultivo positivos 29 mostraron inmunoreactividad con la actina, lo que representa un 59%, el 41% restante mostró especificidad para todos los demás componentes de los geles citoplásmicos.

VII. Clonación de los híbridos

De todos los cultivos productores de anticuerpos específicos únicamente cuatro fueron clonados. La selección de las clonas se realizó mediante el ensayo de ELISA y la clonación se efectuó por dilución limitada como se describe en la sección de métodos. En la Tabla VII se muestra la derivación de los híbridos monoclonales productores de anticuerpos. El híbrido preclonado 3AD2 mostró inmunoreactividad con la actina en la detección de proteínas electrotransferidas y fue negativo en la tinción de células por inmunofluorescencia. Del híbrido 3AD2 se derivaron las clonas A8, E3, y G9, productoras de anticuerpos monoclonales contra la actina. El

T A B L A VII

DERIVACION DE LOS ANTICUERPOS MONOCLONALES
 CONTRA LA ACTINA DE GELES CITOPLASMICOS DE
 CEREBRO DE RATA



Los híbridos productores de anticuerpos se seleccionaron por ELISA y se clonaron. Los números entre paréntesis indican las colonias presentes por cultivo.

híbrido 3BF10 dió origen a la clona H2, originalmente este cultivo mostró especificidad por la actina en la detección de proteínas electrotransferidas y la inmunofluorescencia reveló la localización del antígeno en el núcleo celular como se muestra en la Figura 9F. Del cultivo 3EA12 se obtuvieron los híbridos B8, C1 y H3, este medio de cultivo fue inicialmente positivo para la actina en la electrotransferencia y mostró una tinción típica de microfilamentos en inmunofluorescencia. El híbrido 3EH1 dió origen a las clonas B9 y C2, este híbrido también mostró inmunoreactividad con la actina por electrotransferencia y su tinción en células fue negativa.

Todos los híbridos clonados fueron seleccionados por su inmunoreactividad con la actina y presentan reacción cruzada en ELISA con actina alfa purificada a partir de músculo esquelético de conejo.

VIII. Clasificación y congelación de los híbridos

Después de realizar todos los ensayos descritos, en las secciones anteriores, los híbridos preclonados se clasificaron en 4 grupos en función de los resultados obtenidos en la inmunodetección de proteínas electrotransferidas y en la tinción por inmunofluorescencia como se muestra en la Tabla VIII. Esta clasificación es hasta cierto punto arbitraria pero tiene como finalidad el permitir un manejo práctico de la información obtenida de los ensayos a los que fueron sometidos los cultivos, lo cual permitirá un análisis posterior para determinar en el futuro los híbridos que serán descongelados y clonados de acuerdo a los planes de trabajo del laboratorio.

T A B L A VIII

CLASIFICACION DE LOS HIBRIDOS PRODUCTORES DE ANTICUERPOS
CONTRA PROTEINAS DE GELES CITOPLASMICOS DE CEREBRO DE RATA

GRUPO	CARACTERISTICAS	NUMERO	%
1	Electrotransferencia negativa Inmunofluorescencia negativa	13	17
2	Electrotransferencia negativa Inmunofluorescencia positiva	16	21
3	Electrotransferencia positiva Inmunofluorescencia negativa	26	33
4	Electrotransferencia positiva Inmunofluorescencia positiva	23	29

Los híbridos productores de anticuerpos se clasificaron de acuerdo a los resultados obtenidos en el ensayo de inmunodetección de proteínas electrotransferidas de geles de poliacrilamida a papel de nitrocelulosa y el ensayo de tinción por inmunofluorescencia de células en cultivo de las líneas Rat 1 y L6E9.

Los cultivos se transfirieron de las placas de microcultivo de 96 pocillos a cajas de 24 pozos para expandir el cultivo y se congelaron como se describe en la sección de métodos. Se congelaron en total 78 híbridos preclonados cuyas características se describen detalladamente en las Tablas IX, X, XI y XII que corresponden a los grupos 1, 2, 3 y 4 respectivamente.

TABLA IX

HIBRIDOS PRODUCTORES DE ANTICUERPOS ESPECIFICOS DEL
GRUPO NUMERO 1

	<u>CULTIVO</u>	<u>No. COLONIAS</u>	<u>ELISA 1</u>	<u>ELISA 2</u>
1	3AA3	1	+++	+
2	3AD10	4	+	+
3	3BG4	2	+	+
4	3CC5	1	++	+++
5	3DB3	2	+	+
6	3DD2	2	++	+
7	3EG1	4	++	+
8	3FD7	6	++	+
9	3GD5	13	++	+
10	3GF12	9	++	++
11	3HA10	8	++	+
12	3HC12	6	++	+++
13	3HD9	5	++	+

Híbridos del grupo 1 con inmunodetección de proteínas electrotransferidas e inmunofluorescencia de células en cultivo negativas. ELISA 1 se refiere al ensayo inicial realizado para detectar los cultivos productores de inmunoglobulinas específicas y ELISA 2 al ensayo realizado antes de la congelación para verificar la estabilidad en la producción de anticuerpos.

TABLA X

HÍBRIDOS PRODUCTORES DE ANTICUERPOS ESPECÍFICOS DEL GRUPO NÚMERO 2					
	<u>CULTIVO</u>	<u>COLONIAS</u>	<u>ELISA 1</u>	<u>ELISA 2</u>	<u>INMUNOFUORESCENCIA</u>
1	3AB3	2	+	+	Microfilamentos, Membrana P.
2	3ED8	3	++	+	Agregado perinuclear
3	3EH4	4	++	+	Filamentos Intermedios
4	3CE6	6	+	+	Filamentos Intermedios
5	3CH7	2	++	+	Membrana plasmática
6	3DD8	2	++	+++	Agregado perinuclear
7	3DH11	3	+	+	Microfilamentos
8	3DG3	5	++	+	Microfilamentos
9	3ED10	4	+	+	Citoplasma difuso, puntos.
10	3FC11	4	+	+	Microfilamentos, Membrana P.
11	3FG3	3	+	+	Núcleo y alrededores
12	3FH11	2	+	+	Membrana plasmática
13	3GD11	4	++	+	Microtúbulos
14	3GG11	3	++	+	Microfilamentos, Membrana P.
15	3AA8	5	+	+	Filamentos Intermedios
16	3HB4	6	++	++	Microfilamentos, Membrana P.

Híbridos del grupo 2 con inmunodetección de proteínas electrotransferidas negativa e inmunofluorescencia positiva. ELISA 1 se refiere al ensayo inicial realizado para detectar los cultivos productores de inmunoglobulinas específicas y ELISA 2 al ensayo realizado antes de la congelación para verificar la estabilidad en la producción de anticuerpos.

TABLA XI

HÍBRIDOS PRODUCTORES DE ANTICUERPOS ESPECÍFICOS DEL GRUPO NÚMERO 3

<u>CULTIVO</u>	<u>COLONIAS</u>	<u>ELISA 1</u>	<u>ELISA 2</u>	<u>ELECTROTRANSFERENCIA</u>
3AC2	5	++	++	actina
3AD2	4	+	+	actina
3AH2	2	++	++	actina
3AH8	5	++	++	actina, 55 K
3BA9	7	++	+	actina
3BB3	4	++	+	actina
3BC10	2	+	+	68 K
3CB4	4	+	++	actina
3CC1	2	++	+	actina
3CH10	2	++	++	actina
3DH9	4	+	+	actina
3EE3	2	++	++	actina
3EH1	5	+	+	actina
3FB4	4	++	+	68 K
3FC4	3	++	+	alto peso molecular
3GF9	3	++	++	actina, 68 K
3GG10	5	++	++	actina
3HA2	1	++	+++	alto peso molecular
3HA5	2	+	+	68 K
3HB1	5	+	+	alto peso molecular
3HC11	4	++	++	actina
3HD3	5	++	++	actina
3HD10	8	++	+	actina
3HF8	13	++	++	actina
3HG2	5	++	++	actina
3GH7	9	++	+	alto peso molecular

Híbridos del grupo 3 con inmunodetección de proteínas electrotransferidas positiva e inmunofluorescencia negativa. ELISA 1 se refiere al ensayo inicial realizado para detectar los cultivos productores de inmunoglobulinas específicas y ELISA 2 al ensayo realizado antes de la congelación para verificar la estabilidad en la producción de anticuerpos.

TABLA XII

HIBRIDOS PRODUCTORES DE ANTICUEROS ESPECIFICOS DEL GRUPO NUMERO 4

<u>CULTIVO</u>	<u>COLONIAS</u>	<u>ELISA 1</u>	<u>ELISA 2</u>	<u>INMUNOFUORESCENCIA</u>	<u>ELECTROTRANSFERENCIA</u>
3AE1	5	+	+++	Puntos en citoplasma	140 K
3AG10	2	++	+++	Puntos en citoplasma	alto P.M.
3AH7	3	++	+++	Vesículas	actina
3BE1	3	+	+	Microfilamentos	varias
3BF10	3	++	++	Núcleo	actina
3BG3	2	+	+	Microfilamentos	actina, 55 K
3CE1	3	++	++	Puntos en citoplasma	actina, 55 K
3CE11	2	+	+	Microfilamentos	actina
3CF10	4	+	+	Filamentos Intermedios	68 K
3CE11	5	+	+	Redes perinucleares	alto P.M.
3DA8	3	++	+	Microfilamentos	varias
3DE5	2	++	++	Difusa	actina
3DF2	3	++	+	Microfilamentos	actina, 55 K
3EA12	2	+	+	Microfilamentos	actina, 55 K
3FC2	2	++	++	Agregado perinuclear	actina
3FF7	3	+	+	Filamentos intermedios	alto P.M.
3GG1	9	++	++	Membrana plasmática	varias
3HA12	13	++	+	Microfilamentos	actina
3HD1	3	++	+	Puntos en citoplasma	alto P.M.
3HE1	4	++	+	Microfilamentos	55 K
3HE7	7	++	+	Microfilamentos	55 K
3HF5	3	++	++	Filamentos intermedios	55 K
3HG8	7	++	++	Filamentos intermedios	55 K

Híbridos del grupo 4 con inmunodetección de proteínas electrotransferidas positiva e inmunofluorescencia positiva. ELISA 1 se refiere al ensayo inicial realizado para detectar los cultivos productores de inmunoglobulinas específicas y ELISA 2 al ensayo realizado antes de la congelación para verificar la estabilidad en la producción de anticuerpos.

D I S C U S I O N

La fusión celular reportada en este trabajo fue muy exitosa como lo indica la eficiencia de hibridación obtenida, que fue del 93.7%. La eficiencia específica de hibridación de 18.3% muestra que aproximadamente una quinta parte de los cultivos presentó crecimiento de híbridos con producción de anticuerpos específicos contra proteínas de los geles citoplásmicos. Debido a la alta eficiencia específica obtenida no fue necesario realizar más fusiones ya que se obtuvieron gran cantidad de híbridos que fueron inicialmente seleccionados con el ensayo de ELISA.

Para la producción de hibridomas y anticuerpos monoclonales es necesaria cierta habilidad en el manejo de cultivos celulares y de algunas técnicas inmunológicas, que implican una dificultad más o menos relativa. Sin embargo, la obtención exitosa de anticuerpos monoclonales depende en gran medida de los ensayos para la detección de los híbridos productores de inmunoglobulinas específicas. La elección del o los ensayos para la detección de anticuerpos depende no solamente de la rapidez, eficiencia y confiabilidad del ensayo sino que deberá tenerse muy presente en qué será empleado el anticuerpo obtenido. Por ejemplo, si el anticuerpo será empleado para la localización intracelular del antígeno, sería recomendable seleccionarlo por inmunofluorescencia, si se desea emplearlo para cuantificar el antígeno en una mezcla de varias proteínas, digamos por radioinmunoensayo, debe seleccionarse un anticuerpo que reco-

nozca al antígeno en estas condiciones. En ocasiones se desea obtener un anticuerpo que bloquee cierta función, entonces debería contarse con un ensayo donde se observe el efecto del anticuerpo sobre la función.

Es de suma importancia establecer desde el inicio del trabajo si todos los anticuerpos producidos son de interés, por ejemplo, si se desea obtener una colección completa de anticuerpos contra proteínas de membrana, de citoesqueleto, etc., o si se desea seleccionar anticuerpos contra alguno o algunos de los componentes del inmunógeno y de qué manera se realizará esta selección.

En este trabajo se emplearon 3 métodos de detección de anticuerpos:

1. El ensayo de ELISA mediante el cual se selecciona de manera rápida y confiable una gran cantidad de anticuerpos que pueden reconocer a la proteína en su conformación nativa o en forma parcialmente desnaturalizada, ya que la adsorción del antígeno al material plástico produce con frecuencia cambios conformacionales que exponen regiones de la proteína que normalmente no son accesibles al anticuerpo.
2. La inmunofluorescencia de células en cultivo que permite seleccionar aquellos anticuerpos que reconocen al antígeno en células previamente fijadas y permeabilizadas, cuando el determinante antigénico es accesible para la inmunoglobulina.
3. La inmunodetección de proteínas electrotransferidas a papel

de nitrocelulosa donde la proteína se encuentra desnaturada ya que fue transferida de un gel de poliacrilamida que contenía SDS. En este ensayo se puede identificar a la proteína reconocida por el anticuerpo en función de su peso molecular, sin embargo los anticuerpos no reconocen los determinantes antigénicos que dependen de la estructura tridimensional de la proteína.

El ensayo de ELISA es uno de los más empleados para la detección de híbridos productores de anticuerpos específicos que son de interés, en este trabajo se utilizó este ensayo para realizar una preselección de los cultivos que serían sometidos a los ensayos de inmunofluorescencia y electrotransferencia y disminuir de esta manera la carga de trabajo que habría ocasionado someter todos los cultivos a estos dos últimos ensayos.

La localización intracelular de las proteínas asociadas a la actina es de especial interés en nuestro laboratorio, por esta razón se ensayaron los medios de cultivo por inmunofluorescencia de células en cultivo. De acuerdo a los resultados obtenidos en estos ensayos únicamente 39 de los 100 medios probados son útiles para este tipo de trabajo. El contar con esta información nos permitirá descongelar y clonar únicamente los híbridos elegidos y puede evitar esfuerzos infructuosos tratando de obtener tinciones celulares con anticuerpos que no fueron seleccionados para este fin y que pueden no reconocer a las proteínas en células o tejidos fijados.

La ausencia de tinción de aproximadamente el 65% de los híbrido-

mas productores de anticuerpos puede tener varias interpretaciones: que el anticuerpo reconozca una secuencia primaria de aminoácidos que solo esta expuesta en la proteína desnaturalizada, que el determinante antigénico haya sido modificado por el procedimiento de fijación y permeabilización de la célula o por interacción con otras moléculas, que el determinante antigénico no sea accesible debido a interacciones de la proteína con otras moléculas que le bloquean espacialmente el acceso.

Los patrones de tinción fueron muy diversos; varios corresponden a tinciones típicas de microfilamentos (Figura 9-C) que se obtienen con anticuerpos anti-actina lo cual indica, junto con los resultados de las electrotransferencias, que una proporción alta de los anticuerpos producidos reconocen específicamente a esta proteína. Aunque la actina es la proteína que se encuentra en mayor proporción en los geles citoplásmicos que se emplearon en las inmunizaciones, por lo general es muy poco inmunogénica debido a que es una proteína con secuencia de aminoácidos muy conservada en la escala biológica y que se encuentra en todas las células procariotas. Sin embargo el suero del ratón 3 empleado en esta fusión muestra inmunoreactividad con la actina como se observa en la Figura 8, en contraste con el suero del ratón 2 que no muestra producción de anticuerpos contra esta proteína y con el suero del ratón 4 donde se observa una inmunoreactividad muy débil con la actina.

En los resultados de inmunofluorescencia se observaron patrones de tinción que parecen corresponder a microtúbulos (Figura 9-6) y

filamentos intermedios. Este tipo de tinciones indican la presencia de proteínas que forman parte de estos sistemas de polímeros y que podrían encontrarse en los geles citoplásmicos como contaminantes o mediante una interacción específica con las proteínas que los constituyen.

Se observaron dos tipos de tinción que resultan muy interesantes; la que se observa a la Figura 9-B que muestra gran cantidad de vesículas en el citoplasma y la de la Figura 9-F que muestra un reconocimiento del interior del núcleo celular y de su periferia. En ambos casos los resultados de electrotransferencia indican que los anticuerpos en los medios de estos cultivos reconocen a la actina. La tinción nuclear sugiere la posibilidad de que estos anticuerpos reconozcan a una isoforma de la actina que se encuentra en el interior del núcleo (117). Sin embargo, será necesario clonar estos híbridos para determinar si los anticuerpos son específicos contra la actina, ya que cabe la posibilidad de que en estos cultivos existan dos híbridos distintos; uno que produzca anticuerpos que reconocen a la actina en electrotransferencia pero no tienen en inmunofluorescencia y otro que produzca anticuerpos que si tienen pero no reconocen a la proteína electrotransferida.

La tinción de la Figura I muestra un patrón observado previamente con un antisuero contra la proteína 55K (114). En el laboratorio se ha demostrado que corresponde a una tinción específica del aparato de Golgi.

Los resultados de la inmunodetección de proteínas electrotransferidas nos proporcionan información sobre la identidad de las

proteínas reconocidas por los anticuerpos, sin embargo, estos datos deben analizarse con cautela ya que estos cultivos no han sido clonados y es muy posible que existan en ellos más de un tipo de anticuerpos. Generalmente la inmunodetección de proteínas electrotransferidas se realiza cuando los híbridos ya han sido clonados, ya que además de la limitación de la posible heterogeneidad de los anticuerpos, se puede retrasar la clonación de los híbridos corriéndose el riesgo de perderlos. A pesar de estos inconvenientes consideramos que la aplicación de este ensayo, en esta etapa temprana, ha sido útil pues nos proporciona mayores elementos para la elección de los híbridos que serán clonados y que por el momento fueron congelados.

Uno de los anticuerpos monoclonales anti-actina obtenido de esta fusión se está utilizando actualmente en un trabajo para la identificación y aislamiento de la actina en la planta del frijol. Además a partir del establecimiento, con este trabajo, de la metodología para la obtención de hibridomas y anticuerpos monoclonales ha sido posible aplicar este enfoque experimental en otros sistemas como lo demuestra la reciente obtención de anticuerpos monoclonales dirigidos contra flagelos de Trypanosoma cruzi en este mismo laboratorio.

Para la obtención de anticuerpos monoclonales es necesaria una cuantiosa inversión de recursos, en términos de lo que representa para un país como el nuestro el financiar este tipo de proyectos. Ante la creciente demanda de estos anticuerpos para la investigación, considero que se debe evaluar no solamente si son necesarios para la realización de un trabajo en particular, sino también si

se tiene la capacidad de obtener el mejor provecho de ellos. Resulta lamentable observar, en ocasiones, que se tienen congelados gran cantidad de híbridos productores de anticuerpos potencialmente útiles que eventualmente serán desechados.

R E F E R E N C I A S

1. Hood, L.E., Weissman, J.L., Wood, W.B. y Wilson, J.N. (1984) Immunology. The Benjamin Cumming Publishing Co. Menlo Park, California. pp. 81-111.
2. Roitt, I.M., Brostoff, J. y Male, D.K. (1985) Immunology. Gower Medical Publishing. London. 5.1-5.8.
3. Honjo, T. (1982) The molecular mechanism of the immunoglobulin class switch. Immunol. Today 3(8): 214-217.
4. Gaerhart, P.J. (1982) Generation of immunoglobulin variable gene diversity. Immunol. Today 3(4): 107-112.
5. Robertson, M. (1982) Gene rearrangement and the generation of diversity. Nature 297: 184-186.
6. Kohler, G. y Milstein, C. (1975) Continuous cultures of fused cells secreting antibodies of predefined specificity. Nature 256: 495-497.
7. Kohler, G. y Milstein, C. (1976) Derivation of specific antibody-producing tissue culture and tumor lines by cell fusion. Eur. J. Immunol. 61: 511-519.
8. Eisenbarth, G.S. (1981) Application of monoclonal antibody techniques to biological research. Anal. Biochem. 111: 1-16.

9. Springer, T. (1981) Monoclonal antibody analysis of complex biological systems. *J. Biol. Chem.* 256(8): 3833-3839.
10. Yelton, D.E. y Scharff, M.D. (1981) Monoclonal antibodies: a powerful new tool in biology and medicine. *Ann. Rev. Biochem.* 50: 657-680.
11. Kwan, S., Yelton, D.E. y Scharff, M.D. (1980) Production of monoclonal antibodies. En: Genetic Engineering (Setton, J. K. y Hollander, A. ed.). Plenum Press, New York. pp. 31-46.
12. Davidson, R.L., O'Malley, K.A. y Wheeler, T.E. (1976) Polyethylene glycol-induced mammalian cell hybridization: effect of polyethyleneglycol molecular weight and concentration. *Somat. Cell Genet.* 2: 271-280.
13. Maggio, B., Ahkong, Q.F. y Lucy, J.A. (1976) Poly(etilene-glycol) surface potential and cell fusion. *Biochem. J.* 158(3): 647-650.
14. Lovborg, U. (1982) Monoclonal Antibodies: production and maintenance. William Heinemann Medical Books. London, pp. 6-10.
15. Lehninger, A. (1981) Bioquímica, Ed. Omega, 2a. ed. España. 749.
16. Stryer, L. (1975) Biochemistry. W.H. Freeman and Co., San Francisco, pp.

17. Buck, D.W., Larrick, J.W., Raubitschek, A., Truitt, K.E., Senyk, G., Wang, J. y Dyer, E.J. (1984) Production of human monoclonal antibodies. En: Monoclonal antibodies and functional cell lines. (Kennett, R.H., Bechtol, K.B. y McKeearn, T.J.) Plenum Publishing Corporation, Nueva York. pp. 275-309.
18. Herrmann, S.H. y Mescher, M.F. (1979) Purification of the H-2K molecule of the murine major histocompatibility complex. J. Biol. Chem. 254: 8713-8716.
19. Mason, D.W. y Williams, A.F. (1980) The kinetics of antibody binding to membrane antigens in solution and at the cell surface. Biochem. J. 187: 1-20.
20. Kohler, G. (1984) Derivation and Diversification of monoclonal antibodies. Bioscience Reports 5: 533-549.
21. Valentino, K.L., Winter, J. y Reichardt, L.F. (1985) Applications of monoclonal antibodies to neuroscience research. Ann. Rev. Neurosci. 8: 199-232.
22. Goding, J.W. (1980) Antibody production by hybridomas. J. Immunol. Meth. 39: 285-308.
23. Lerner, E.A. (1981) How to make a hybridoma. Yale J. Biol. Med. 54: 387-402.
24. Fazekas de St Groth, S. y Scheidegger, D. (1980) Production of monoclonal antibodies: strategy and tactics. J. Immunol. Meth. 25: 1-21.

25. Oi, V.T. y Herzenberg, L.A. (1980) Immunoglobulin-producing hybrid cell lines. En: Selected Methods in Cellular immunology (Editores: Mishell, B.B. y Shiigi, S.M.) W.H. Freeman, San Francisco.
26. Köhler, G., Hengartner, H. y Shulman, M.J. (1978) Immunoglobulin production by lymphocyte hybridomas. Eur. J. Immunol. 8(2): 82-88.
27. Milstein, C. (1982) Monoclonal antibodies from hybrid myelomas. Proc. Roy. Soc. Lond. 211: 393-410.
28. Olsson, L., Kronstrom, H., Cambon-De Mouzon, A., Honsik, E., Brodin, T. y Jakobsen, B. (1983) Antibody producing human hybridomas. I. Technical Aspects. J. Immunol. Meth. 61: 17-32.
29. Horibata, K. y Harris, A.W. (1970) Mouse myelomas and lymphomas in culture. Exp. Cell Res. 60: 61-77.
30. Pettengell, G.S. y Sorensen, G.D. (1967) Murine myeloma cells in suspension culture. Exp. Cell Res. 47: 608-613.
31. Abrams, P.G., Knost, J.A., Clarke, G. (1983) Determination of the optimal human cell lines for development of human hybridomas. J. Immunol. 131(2): 1201-1204.
32. Kearney, J.F., Radbruch, A., Liesegang, B. y Rajewsky, K. (1979) A new mouse myeloma cell line that has lost immunoglobulin expression but permits the construction of antibody-secreting hybrid cell lines. J. Immunol. 123(4):

1548-1550.

33. Kadish, J.L. y Wenc, K.M. (1983) Contamination of polyethylene glycol with aldehydes: Implications for hybridoma fusion. *Hybridoma* 2(1): 87-89.
34. Lane, R.D., Crissman, R.S. y Lachman, M.F. (1984) Comparisons of polyethylene glycols as fusogens for producing lymphocyte-myeloma hybrids. *J. Immunol. Meth.* 72: 71-76.
35. Knutton, S. y Pasternak, C.A. (1979) The mechanism of cell-cell fusion. *Trends. Biochem. Sci.* 4: 220-223.
36. Kohler, G., Shulman, M.J. (1978) Cellular and molecular restrictions of the lymphocyte fusion. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 81: 143-148.
37. Schuurs, A.H.W.M. y Van Weemen, B.K. (1977) Enzyme-immunoassay *Clin. Chim. Acta* 81: 1-40.
38. King, T.P. y Kochoumian, L. (1979) A comparison of different enzyme-antibody conjugates for enzyme-linked immunosorbent assay. *J. Immunol. Meth.* 28: 201-210.
39. Mutler, J.E. (1981) The amplified ELISA: principles of and applications for the comparative quantitation of class and subclass antibodies and the distribution of antibodies and antigens in biochemical separates. *Methods in Enzymol.* 73: 482-523.
40. Boucheix, C., Perrot, J.Y., Mirshahi, M., Bernadou, A. y

- Rosenfeld, C. (1983) A rapid method for detection of membrane antigens by immunofluorescence and its application to screening hybridoma antibodies. *J. Immunol. Meth.* 57: 145-150.
41. Hopper, J.E., McDonald, A.B. y Nisonoff, A. (1970) Quantitative investigations of idiotypic antibodies. *J. Exp. Med.* 131: 41-56.
42. Mierendorf, R.C. y Diamond, R.L. (1983) Functional heterogeneity of monoclonal antibodies obtained using different screening assays. *Analyt. Biochem.* 135: 221-229.
43. Vaidya, H.C., Dietzler, D.N. y Ladson, J.H. (1985) Inadequacy of traditional ELISA for screening hybridoma supernatants for murine monoclonal antibodies. *Hybridoma* 4(3): 271-276.
44. Friguet, B., Djavadi-Ohanian, L. y Goldber, M.E. (1984) Some monoclonal antibodies raised with a native protein bind preferentially to denatured antigen. *Molec. Immunol.* 21(7): 673-677.
45. Ehrlich, P.H., Moyle, W.R., Moustafa, Z.A. y Canfeld, R. (1982) Mixing 2 monoclonal antibodies yields enhanced affinity for antigen. *J. Immunol.* 128(6): 2709-2713.
46. Sevier, E.D., David, G.S., Martinis, J., Desmond, W.J. Bartholomew, R.M. y Wang, R. (1981) Monoclonal antibodies in clinical immunology. *Clin. Chem.* 27(11): 1797-1806.

47. Stainer, N.A. y Leww, A.M. (1980) Whither monoclonal antibodies?. *Immunology* 40: 287-293.
48. Levy, R. y Miller, R.A. (1983) Biological and clinical implications of lymphocyte hybridomas: tumor therapy with monoclonal antibodies. *Ann. Rev. Med.* 34: 107-116.
49. Shulman, M., Wilde, C.D. y Kohler, G. (1978) A better cell line for making hybridomas secreting sepecific antibodies. *Nature* 276: 269-270.
50. Galfre, G. y Milstein, C. (1981) Preparation of monoclonal antibodies: strategies and procedures. *Meth. Enzymol.* 73: 3-46.
51. Trowbridge, I. (1978) Interspecies spleen-myeloma hybrid producing monoclonal antibodies against mouse lymphocyte surface glycoprotein T200. *J. Exp. Med.* 148: 313-323.
52. Margulis, D.H., Kuehl, W.M. y Scharff, M.D. (1976) Somatic cell hybridization of mouse myeloma cells. *Cell* 8: 405-415.
53. Galfre, G., Milstein, C. y Wright, B. (1979) Rat x rat hybrid myelomas and a monoclonal anti-Fc portion of mouse IgG. *Nature* 277: 131-132.
54. Groce, C.M., Linnenbach, A., Hall, W., Steplewski, Z. y Koprowski, H. (1980) Production of human hybridomas secreting antibodies to measles virus. *Nature (London)*

288: 488-489.

55. Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of head bacteriophage T4. *Nature* 227: 660-685.
56. De Blas, A.L. y Cherwinski, H.M. (1983) Detection of antigens on nitrocellulose paper immunoblots with monoclonal antibodies. *Analyt. Biochem.* 133: 214-219.
57. Wells, D.E. y Price, P.J. (1983) Simple rapid methods for freezing hybridomas in 96-well microculture plates. *J. Immunol. Meth.* 59: 49-52.
58. Barocci, S., Constantini, M., Kunkl, A. y Manca, F. (1984) A simple procedure for freezing and storing lymphocyte panels in trays. *J. Immunol. Meth.* 69: 17-21.
59. De Leij, L., Poppema, S. y The, T.H. (1983) Cryopreservation of newly formed hybridomas. *J. Immunol. Meth.* 62: 69-72.
60. Maurer, P.H. y Callahan, H.J. (1980) Proteins and polypeptides as antigens. *Methods in Enzymology* 70: 49-69.
61. Hurn, B.A.L. y Chautter, S.M. (1980) Production of reagent antibodies. *Meth. Enzymol.* 70: 104-121.
62. Siraganian, R.P., Fox, P.C. y Berenstein, E.H. (1983) Methods of enhancing the frequency of antigen-specific Hybridomas. *Meth. Enzymol.* 92: 17-39.

63. Towin, H., Staehelin, T. y Gordon, J. (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications. Proc. Natl. Acad. Sci. 76(9): 4350-4361.
64. Engvall, E. (1977) Quantitative enzyme immunoassay (ELISA) in microbiology. Med. Biology 55: 193-200.
65. Engvall, E. (1980) Enzyme Immunoassay ELISA and EMIT. Meth. Enzymol. 70: 419-439.
66. Sthali, C., Stachelin, T., Miggiano, V., Schmidt, J. y Haring, P. (1980) High frequencies of antigen-specific hybridomas: dependence of immunization parameters and prediction by spleen cell analysis. J. Immunol. Meth. 32: 297-
67. Lehtonen, O.P. y Viljanen, M.K. (1980) Antigen attachment in ELISA. J. Immunol. Meth. 34: 61-70.
68. Harwell, L.H., Bolognino, M., Bidlack, J.M., Knapp, R.J. y Lord, E.M. (1984) A freezing method for cell fusion to distribute and reduce labor and permit more through early evaluation of hybridomas. J. Immunol. Meth. 66: 59-
69. Haime, L.T. y Rosenbaum, J.L. (1981) Cilia, flagella and microtubules. J. Cell Biol. 91, 1255-1305.
70. Snyder, J.A. y McIntosh, J.R. (1976) Biochemistry and physiology of microtubules. Ann. Rev. Biochem. 45, 699-720.
71. Dustin, P., Eds. (1978) Microtubules. Spring-Verlag, Berlin.

72. Roberts, K. y Hyans, J.S., Eds. (1979) *Microtubules*. Academic Press., New York.
73. Korn, E.D. (1978) Biochemistry of actomyosin-dependent cell motility. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 75: 588-599.
74. Taylor, D.L. y Condeelis, J.S. (1979) Cytoplasmic structure and contractility in amoeboid cells. *Int. Rev. Cytol.* 56: 57-144.
75. Schliwa, M. (1981) Proteins associated with cytoplasmic actin. *Cell* 25: 587-590.
76. Lindberg, U., Carlsson, L., Markey, F. y Nyström, L.E. (1979) The unpolymerized form of actin in non-muscle cells. *Meth. Achiev. Exp. Pathol.* 8: 143-170.
77. Korn, E.D. (1982) Actin polymerization and its regulation by proteins from non-muscle cells. *Physiological Reviews.* 62(2): 672-737.
78. Lazarides, E. (1980) Intermediate filaments as mechanical integrators of cellular space. *Nature* 283: 249-256.
79. Lazarides, E. (1982) Intermediate filaments: a chemically heterogeneous, developmentally regulated class of proteins. *Ann. Rev. Biochem.* 51: 519-550.
80. Straub, F.B. (1942) Actin. *Stud. Szeged* 2: 3-15.
81. Hatane, S. y Oosawa, F. (1966) Isolation and characterization of plasmodium actin. *Biochem. Biophys. Acta* 127: 488-498.

82. Pollard, T.D. y Weihing, R.R. (1974) Actin and myosin in cell movement. En: Critical Reviews in Biochemistry (G. Gasman, ed.) Vol. 2: 1-65 CRC Press, Cleaveland, Ohio.
83. Goldman, R.D., Lazarides, E., Pollack, R. y Weber, K. (1975) The distribution of actin in non-muscle cells. *Expl. Cell Res.* 90: 333-344.
84. Straub, F. y Feuer, G. (1950) Adenosine triphosphate, the functional group of actin. *Biochem. Biophys. Acta* 4: 455-470.
85. Martonosi, A., Molino, C.H. y Gergely, G. (1964) The binding of divalent cations to actin. *J. Biol. Chem.* 239: 1057-1064.
86. Lazarides, E. y Lindberg, U. (1974) Actin is the naturally occurring inhibitor of deoxyribonuclease I. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 71: 4742-4746.
87. Carlsson, L., Nystrom, L.E., Sundkvist, I., Markey, F. y Lindberg, U. (1977) Actin polymerizability is influenced by profilin, a low molecular weight protein in non-muscle cells. *J. Mol. Biol.* 115: 465-483.
88. Van Baelen, H., Bouillen, R. y De Moor, P. (1980) Vitamin D-binding protein (Gc-globin) binds actin. *J. Biol. Chem.* 255: 2270-2272.
89. Bamburg, J.R., Harris, H.E. y Weeds, A.G. (1980) Partial purification and characterization of an actin depolymeri-

- zing factor from brain. FEBS Lett. 121: 178-182.
90. Harris, H.E. y Gooch, J. (1981) An actin depolymerizing protein from pig plasma. FEBS Lett. 123: 49-53.
91. Engel, J., Fasold, H., Hulla, F.W., Waechter, F. y Wegner, A. (1977) The polymerization reaction of muscle actin. Mol. Cell Biochem. 18: 3-13.
92. Yin, H.L. y Stossel, T.P. (1979) Control of cytoplasmic actin gel-sol transformation by gelsolin, a calcium-dependent regulatory protein. Nature London 281: 583-586.
93. Bretscher, A. y Weber, K. (1980) Villin is a major protein of the microvillus cytoskeleton which binds both G and F actin in a calcium-dependent manner. Cell 20: 839-847.
94. Wang, L.L. y Bryan, J. (1981) Isolation of calcium dependent platelet proteins that interact with actin. Cell 25: 637-649.
95. Isenberg, G., Aebi, U. y Pollard, T.D. (1980) An actin-binding protein from Acanthamoeba regulates actin filament polymerization and interactions. Nature London 288: 455-459.
96. Southwick, F.S. y Stossel, T.P. (1981) Isolation of an inhibitor of actin polymerization from human polymorphonuclear leukocytes. J. Biol. Chem. 256: 3030-3036.

97. Hasegawa, T., Takahashi, S., Hayashi, H. y Hatane, S. (1980) Fragmin: a calcium ion sensitive regulatory factor on the -- formation of actin filaments. *Biochemistry* 19, 2677-2683.
98. Glenney, J.R., Kaulfus, P., Watsudaira, P. y Weber, K. (1981) F-actin binding and bundling properties of fimbrin, a mayor cytoskeletal protein of microvillus core filaments. *J. Biol. Chem.* 256, 9283-9289.
99. Mimura, N. y Asane, A. (1979) Ca^{2+} -sensitive gelation of -- actin filaments by a new protein factor. *Nature London*, 282, 44-48.
100. Lazarides, E. y Burridge, K. (1975) α -actinin: immunofluo-- rescent localization of a muscle structural protein in -- nonmuscle cells. *Cell* 6, 289-298.
101. Shizuta, Y., Shizuta, H., Gallo, M., Pastan, I. y Lewis, M. (1976) Purification and properties of filamin an actin- ___ binding protein from chicken gizzard. *J. Biol. Chem.* 251, - 6562-6567.
102. Ralston, G. B. (1978) Physical-chemical studies of spectrin. *J. Supramol. Struct.* 8, 361-373.
103. Bryan, J. y Kane, R. E. (1978) Separation and interaction - of the major components of sea urchin actin gel. *J. Mol. - Biol.* 125, 207-224.
104. Feramisco, J. R. y Burridge, K. (1980) A rapid purification of α -actinin, filamin, and a 130,000-dalton protein from -- smooth muscle. *J. Biol. Chem.* 255, 1194-1199.

105. Maruta, H. y Korn, E. D. (1977) Purification from --- Acanthamoeba castellanii of proteins that induce gelation - and syneresis of F-actin. *J. Biol. Chem.* 252, 399-402.
106. Condeelis, J. (1981) Microfilament-membrane interactions in cell shape and surface architecture. En: *International Cell Biology* (H. G. Schweiger, Ed.) Spring - Verlag, Berlin. pp. 306-320.
107. Hartwig, J. H. y Stossel, T. P. (1975) Isolation and properties of actin, myosin, and a new actin-binding protein in - rabbit alveolar macrophages. *J. Biol. Chem.* 250, 5696-5705.
108. Clarke, F. M. y Masters, C. J. (1975) On the association of glycolytic enzymes with structural proteins of skeletal -- muscle. *Biochim. Biophys. Acta.* 381, 37-46.
109. Smith, S. S., Kelly, K. H. y Jackush, B. M. (1979) Actin -- co-purifies with RNA polymerase II. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 86, 161-166.
110. Kane, R. E. (1975) Preparation and purification of polyme-- rized actin from sea urchin egg extracts. *J. Cell Biol.* 66: 305-315.
111. Pollard, T. D. (1975) Functional implications of the biochemical and structural properties of cytoplasmic contractile - proteins. *Molecules and Cell Movements*. Raven Press, New -- York. 259-286.
112. Pollard, T. D., Aebi, U., Cooper, J. A., Fowler, W. E. y -- Tseng, P. (1981). Actin structure, polymerization, and gelation. *Cold. Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 46 : 513-524.

113. Palmer, E., Hernández, J. M. y Saborío, J. L. (1984)
Actin-based gelation of cytoplasmic extracts from brain
tissue. *J. Neurochem.* 43; 994-1002.
114. Saborío, J. L., Díaz-Barriga, F., Duran, G., Tsutsumi, V.
y Palmer, E. (1985). Purification and characterization
of GP-55, a protein associated with actin-based cytoplasmic
gels derived from brain tissue. *J. Biol. Chem.* 260(14):
8627-8636.
115. Willingham, M. C. y Pastan, I. (1985). An atlas of immuno-
fluorescence in cultured cells. Academic Press, Inc.
Orlando, Florida.
116. Sangerman Jarquín, J. (1984). La proteína fodrina esta
implicada en la gelificación de extractos citoplásmicos
de cerebro de rata. Tesis de licenciatura para obtener el
grado de Biólogo. ENEP-IZTACALA, UNAM.
117. Bremer, J. W., Busch, H. y Lecman, L. (1981). Evidence for
a species of nuclear actin distinct from cytoplasmic and
muscle actins. *Biochemistry* 20 : 2013-2017.