



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

---

---

**INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR**

**Caracterización de Anticuerpos Monoclonales  
contra el Receptor Tipo III del TGF- $\beta$**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:**

**Licenciada en Investigación Biomédica Básica**

**P R E S E N T A**

**Nancy Monterrubio López**

**DIRECTOR DE TESIS: Dr. Fernando López Casillas**



**Ciudad Universitaria, México D.F., Agosto de 2006**



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.

**El presente trabajo se realizó bajo  
la dirección del Dr. Fernando López Casillas  
y la Co-dirección del Dr. José Esparza López  
y de la M. en C. Patricia Juárez Camacho,  
en el Instituto de Fisiología Celular  
de la Universidad Nacional Autónoma de México  
y con el financiamiento del proyecto auspiciado por el  
Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología # 37749-N  
“Modulación in vivo del TGF-beta por el betaglicano”.**

Los miembros del Jurado son:

Presidente: Dr. Pascal Hérion Scohy

Secretario: Dra. Marina Macías Silva

Vocal: Dr. Fernando López Casillas

Suplente: Dr. Rafael Saavedra Durán

Suplente: Dr. Carlos Rosales Ledezma

Dedico esta tesis  
a las personas que han estado conmigo  
desde el principio de mi vida,  
porque gracias a su ejemplo y amor  
adquirí la fortaleza y dedicación  
que me han llevado a concluir esta etapa:

A mis padres Rosalba y Rodrigo

A mi tía Lili

A mi abuelita Lupita

Quisiera agradecer al Dr. Fernando López Casillas por haberme permitido formar parte de su grupo en el Instituto de Fisiología Celular, también deseo agradecer al Dr. José Esparza López y a la M. en C. Patricia Juárez Camacho, por sus consejos y todo el apoyo que me proporcionaron durante la realización de este trabajo.

También deseo agradecer a todas esas personas que tuve la fortuna de conocer durante estos cinco años y que con paciencia y dedicación contribuyeron a mi formación

tanto en el laboratorio como en la vida:

Gracias a Valentín Mendoza, a Paty Juárez, a Adverqueydi Zúñiga, a Dulce Mata, a Male Vilchis, a Marce Ramírez, Ana Rojas, Selma Rivas, Paco Martínez, Silvana Pertuz, Horacio Villafán, Ramsés Chávez, Gerardo Boni, Rocío Tirado, Rosa Elena Sarmiento, Ekaterina Vinadogrova, Nurit Mirkin, Juan Pablo Reyes, David Jáuregui, así como a los doctores que amablemente me recibieron en sus laboratorios para hacer rotación en la Licenciatura:

Dr. Eduardo García Zepeda, Dra. Beatriz Gómez García y  
Dr. Abel Moreno Cárcamo.

De manera muy especial quisiera agradecer mis amigos porque gracias a ustedes, la vida es más sencilla.

Gracias Edgar por estar conmigo en algunos de los momentos más difíciles que he pasado y por no dejar de repetirme que no debo rendirme nunca. Por apoyarme y compartir conmigo tantos momentos.

## Índice:

Índice de figuras y tablas.....	3
Abreviaturas.....	4
Resumen.....	5
Introducción.....	6
La superfamilia del TGF- $\beta$ .....	6
Propiedades estructurales del TGF- $\beta$ .....	7
Actividad biológica del TGF- $\beta$ .....	8
Los receptores del TGF- $\beta$ .....	9
Receptores tipo I y II .....	9
Vías de señalización activadas por TGF- $\beta$ .....	11
Características estructurales de las SMADS.....	12
Receptor tipo III o betaglicano.....	14
El betaglicano regula al TGF- $\beta$ .....	16
El betaglicano regula también activinas y BMPs.....	17
El dominio citoplásmico del betaglicano.....	17
El betaglicano en el desarrollo embrionario.....	18
Anticuerpos monoclonales.....	18
Generalidades.....	18
Estructura y función.....	20
Generación <i>in vitro</i> de anticuerpos monoclonales.....	23
Ventajas y desventajas de los anticuerpos monoclonales.....	25
Aplicaciones.....	27
Justificación y Objetivos .....	29
Materiales y métodos.....	30
Reactivos.....	30
Proteínas recombinantes (hrBGs, $\Delta 10$ y $\Delta 11$ ).....	30
Inmunización.....	31
Fusión.....	31
Clonación.....	31
Obtención de ascitis en ratón.....	32

ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay).....	32
Western Blot (WB).....	33
Marcado por afinidad .....	33
Inmunoprecipitación.....	34
Digestión de betaglicano con plasmina.....	34
Resultados y discusión.....	35
Verificación de medios condicionados de los hibridomas positivos vs. hrBGs en ELISA.....	38
Producción de medios condicionados y ascitis de hibridomas seleccionados.....	39
Las ascitis reconocen hrBGs en WB.....	48
Ninguna ascitis inmunoprecipita BG a partir de extractos celulares.....	51
Determinación del dominio de BG reconocido por la ascitis.....	57
Conclusiones.....	62
Apéndice.....	63
Buffer de Tris.....	63
Stock de acrilamida.....	63
Gel separador.....	63
Gel concentrador.....	63
Buffer de muestra con SDS y DTT.....	64
Buffer de electrodos con SDS 10x, pH 8.3.....	64
Buffer de transferencia.....	64
TBS (Tris Buffered Saline) 20x.....	64
Desnudado de membranas.....	65
Tinción con azul de Coomassie (0.05%).....	65
Tinción de plata.....	65
KRH (Krebbs-Ringers-Hepes buffer).....	66
STE (Sacarosa-Tris-EDTA).....	66
DSS (Disuccimidil Suberato) para solución entrecruzadora.....	66
TTE(Tris-Tritón-EDTA), pH 7.4.....	67
Coctel de inhibidores de proteasas 100x.....	67
Bibliografía.....	68

## Índice de figuras y tablas

Figura 1 Receptores tipo I y II.....	10
Figura 2 Activación de la vía de TGF- $\beta$ .....	11
Figura 3 Características estructurales de las SMAD.....	13
Figura 4 Estructura del betaglicano y proteínas recombinantes usadas.....	15
Figura 5 El BG actúa como regulador dual del acceso de TGF- $\beta$ a las células.....	16
Figura 6 Estructura de los anticuerpos.....	21
Figura 7 Isotipos que pueden presentar los anticuerpos.....	22
Figura 8 Generación de hibridomas.....	24
Tabla 1 Diferencias entre los antisueros y los anticuerpos monoclonales.....	27
Tabla 2 Lista de hibridomas positivos para BG.....	35
Figura 9 SDS-PAGE para comprobar la integridad del hrBGs.....	37
Figura 10 ELISA con los medios condicionados de hibridomas.....	41
Figura 10 ELISA con ascitis disponibles y sobrenadantes concentrados.....	42
Figura 12 ELISA con sobrenadantes recién obtenidos.....	43
Figura 13 ELISA de ascitis del hibridoma F comparado con control negativo.....	44
Figura 14 ELISA de ascitis del hibridoma G comparado con control negativo.....	45
Figura 15 ELISA de ascitis del hibridoma I comparado con control negativo.....	46
Figura 16 ELISA de ascitis del hibridoma K comparado con control negativo.....	47
Figura 17 WB contra diferentes concentraciones de BG para probar ascitis.....	49
Figura 18 WB para determinar si la ascitis identifica BG a partir de extractos celulares.....	50
Figura 19 IP de ascitis F y antisuero, WB de ascitis F.....	53
Figura 20 IP de BG a partir de extractos de células marcadas con $^{125}\text{I}$ TG F- $\beta_2$ . usando ascitis.....	54
Figura 21 IP de extractos marcados, usando más ascitis.....	55
Figura 22 IP de extractos marcados, usando proteína G-Sefarosa.....	56
Figura 23 WB contra hrBGs, sol $\Delta$ 10 y sol $\Delta$ 11 con antisuero#822 y ascitis F.....	58
Figura 24 Tinción con plata de la cinética de digestión de hrBGs con plasmina.....	59
Figura 25 WB para ver qué dominio del BG es reconocido.....	60
Tabla 3 Resumen de resultados.....	61

## Abreviaturas

<i>As #822:</i>	Antisuero contra BG generado en conejo
<i>BG:</i>	Betaglicano
<i>BMP:</i>	Factores Morfogenéticos de Hueso
<i>Dominio E:</i>	Dominio del BG similar a la endoglina
<i>Dominio U:</i>	Dominio del BG similar a la uromodulina
<i>ELISA:</i>	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
<i>GAGs:</i>	Glicosaminoglicanos
<i>GDF:</i>	Factor de crecimiento y diferenciación
<i>HAT:</i>	Hipoxantina, Aminopterina, Timidina
<i>HGPRT:</i>	Hipoxantina Guanosil Fosforribosil Transferasa
<i>hrBGs:</i>	Betaglicano humano recombinante soluble
<i>HT:</i>	Hipoxantina, Timidina
<i>Ig:</i>	Inmunoglobulina
<i>IP:</i>	Inmunoprecipitación
<i>MIS:</i>	Sustancia Inhibidora Mülleriana
<i>PEG:</i>	Polietilenglicol
<i>sol<math>\Delta</math>10:</i>	Proteína recombinante soluble correspondiente a la mutante $\Delta$ 10 de BG
<i>sol<math>\Delta</math>11:</i>	Proteína recombinante soluble correspondiente a la mutante $\Delta$ 11 de BG
<i>TGF-<math>\beta</math>:</i>	Transforming Growth Factor-beta
<i><sup>125</sup>I TGF-<math>\beta</math>2:</i>	Isoforma 2 del TGF- $\beta$ yodinada
<i>TK:</i>	Timidina Cinasa
<i>WB:</i>	Western Blot

## Resumen

En el presente trabajo se describe la caracterización de cuatro anticuerpos monoclonales dirigidos contra el betaglicano humano recombinante soluble (hrBGs). En experimentos previos del laboratorio, fueron generados 13 hibridomas a partir de ratones de la cepa Balb/c inmunizados durante un mes con 30 µg de hrBGs. Los hibridomas fueron clonados y subclonados mediante diluciones seriadas. Por medio de ELISA fueron identificados los hibridomas productores de anticuerpos capaces de reconocer al hrBGs, posteriormente se expandieron los cultivos y se guardaron los medios condicionados de cada hibridoma, así como líquidos de ascitis de sólo 4 de ellos: F, G, I y K. Para su caracterización, se probaron nuevamente por ELISA los medios condicionados, y como no hubo señal se probaron las ascitis disponibles, se utilizó el antisuero #822 (contra betaglicano de rata, generado en conejo) como control positivo. Dado que las ascitis sí dieron señal, se decidió expandir cinco de los hibridomas: C, F, G, I y K. Sólo a partir de los cuatro últimos se logró generar líquido de ascitis, pues el otro generó tumor sólido.

Por ensayos de Western Blot (WB) se verificó que los anticuerpos presentes en las ascitis efectivamente fueran capaces de identificar al hrBGs. Se probaron distintas concentraciones (0, 25, 50, 100 y 250ng) de hrBGs y se vio que las ascitis dan señal a partir de los 100ng, mientras que el antisuero #822 detecta a partir de 50ng. También por WB se probó si las ascitis serían lo suficientemente sensibles para detectar al BG a partir de extractos de líneas celulares (*LM13*, que no expresa el gen de BG y fue el control negativo; *HepG-2*, expresa el BG humano completo; *dm10*, sobrepresa BG de rata sin GAGs; y *BG22*, que sobrepresa la proteína completa de rata). No obstante, el betaglicano no pudo ser detectado en ningún extracto. Las mismas líneas celulares mencionadas fueron marcadas con <sup>125</sup>I TGF-β2 y lisadas; los extractos celulares fueron incubados con las diferentes ascitis y se hicieron inmunoprecipitaciones con proteína A-sefarosa. Por autorradiografía se vio que sólo el antisuero #822 inmunoprecipitó al betaglicano.

Finalmente, por WB se intentó determinar el dominio reconocido por cada uno de los cuatro anticuerpos monoclonales trabajados. Se probaron los dominios recombinantes de BG de rata así como el hrBGs digerido con plasmina, la cual en condiciones controladas separa los dos dominios (pues no se dispone de los dominios recombinantes de BG humano). Sólo hubo reconocimiento del hrBGs íntegro por parte de las ascitis, mientras el anticuerpo #822 detectó la proteína completa y a los dominios tanto de BG humano como de rata. En este, como en todos los ensayos descritos, el hecho de que no se haya visto la señal esperada puede deberse a que el epítipo, según las condiciones del ensayo, quede alterado o inaccesible al anticuerpo. Se esperaba obtener al menos un monoclonal efectivo para detectar al BG, pero ninguno de los hibridomas cumplió las expectativas.

## Introducción:

### La superfamilia del TGF- $\beta$

La superfamilia del TGF- $\beta$  (Transforming Growth Factor-beta) comprende un grupo de factores de crecimiento y diferenciación involucrados en un amplio rango de procesos biológicos, tanto en organismos vertebrados como invertebrados.

El primer miembro de la superfamilia en ser estudiado fue precisamente el TGF- $\beta$  en 1985 [1]. A partir de entonces se han ido describiendo a los demás miembros, como por ejemplo las activinas, inhibinas, la sustancia inhibidora mülleriana (MIS) o las proteínas morfogenéticas de hueso (BMP), entre otros.

Las activinas y las inhibinas originalmente se identificaron por su capacidad de regular la secreción de hormonas de las células de la glándula pituitaria. Posteriormente se descubrió su participación en la diferenciación de eritrocitos en mamíferos y el desarrollo del mesodermo en *Xenopus*. [2,3]

Por otra parte, la sustancia inhibidora mülleriana (MIS) puede inducir la regresión del primordio de los genitales femeninos (el ducto Mülleriano) en embriones masculinos. [4] Mientras las proteínas morfogenéticas de hueso (BMP) forman un grupo heterogéneo, muchos de sus miembros han sido identificados por sus efectos en morfogénesis ósea y su papel en inducción de hueso durante el desarrollo. [5, 6] Asimismo pueden actuar como factores neurotróficos [7], promover la diferenciación / migración de células de la cresta neural [8], inhibir la diferenciación biogénica y participar en la formación del mesodermo. [3]

La superfamilia del TGF- $\beta$  a su vez se clasifica en 2 subfamilias según la similitud de secuencias de sus miembros y las vías de señalización que activan: la de TGF- $\beta$ / Activina / Nodal y la de BMP (Proteína Morfogenética de Hueso) / GDF (Factor de Crecimiento y Diferenciación) / MIS (Sustancia Inhibidora Mülleriana)

Todos ellos son factores secretados, similares a TGF- $\beta$  en su estructura terciaria y en su capacidad de regular procesos de diferenciación tanto en tejidos embrionarios como adultos. No obstante, al comparar su estructura primaria y sus actividades biológicas *in vivo* e *in vitro* se observa que su relación con TGF- $\beta$  es relativamente distante.

## Propiedades estructurales del TGF- $\beta$

Se han descrito cinco isoformas de TGF- $\beta$ , nombradas TGF- $\beta$ 1 a TGF- $\beta$ 5; se ha identificado que TGF- $\beta$  1, 2 y 3 están en mamíferos. La carencia de cualquiera de las tres isoformas de TGF- $\beta$  es letal, demostrando que a pesar de su similitud estructural y funcional no son redundantes. Mientras TGF- $\beta$ 4 sólo se ha encontrado en aves y TGF- $\beta$  5 sólo en anfibios [9].

TGF- $\beta$ 1 se sintetiza como un pro péptido de 390 aminoácidos, que forma un homodímero y posteriormente sufre un corte proteolítico (entre los aminoácidos 112 y 113 de ambas proteínas) en el aparato de Golgi por parte de una familia de convertasas, quedando al extremo carboxilo 112 aminoácidos y del extremo amino 278 aminoácidos. Entonces el extremo amino rodea al carboxilo, impidiendo así su interacción con el receptor y formando el complejo **TGF- $\beta$  latente**. Por lo tanto, el extremo amino terminal es considerado el **péptido asociado a latencia** (LAP). Aún dentro del aparato de Golgi, el péptido asociado a latencia interactúa con **proteínas de unión a TGF- $\beta$  latente** (LTBP) que mejoran la estabilidad y optimizan la secreción del complejo. [10]. El TGF- $\beta$  latente puede ser almacenado en los gránulos alfa de las plaquetas – que es el principal reservorio de TGF- $\beta$  – o ser secretado. *In vitro* el complejo puede activarse al calentarse, bajar el pH, exponerlo a especies reactivas de oxígeno o añadir proteasas como plasmina o catepsina D. La forma activa es un homodímero de 25 KDa unido por un enlace disulfuro entre los extremos carboxilo. Las isoformas de TGF- $\beta$  1, 2 y 3 forman homodímeros, aunque también se han visto heterodímeros de TGF- $\beta$  1-2 y de TGF- $\beta$  2-3. [11]

Las formas maduras de TGF- $\beta$  tienen nueve cisteínas conservadas en las cinco isoformas, siete de las cuales se conservan en todos los miembros de la superfamilia. De acuerdo a la estructura cristalográfica de TGF- $\beta$ 2 y a la de TGF- $\beta$ 1 obtenida a partir de NMR (Resonancia Magnética Nuclear), las cisteínas conservadas son importantes para mantener la estructura y función.

Los dímeros de TGF- $\beta$  tienen una estructura extendida, una cisteína participa en el puente disulfuro entre los monómeros y las otras ocho forman puentes disulfuro dentro de la misma proteína, dándole una estructura poco común. Se cree que dada la conservación de las cisteínas, otras moléculas de la superfamilia tienen patrones de plegamiento similares. [12]

## Actividad biológica del TGF- $\beta$

El TGF- $\beta$  controla una diversa gama de procesos celulares como: proliferación, diferenciación y apoptosis tanto en tejidos embrionarios como maduros y en organismos tan variados como moscas, gusanos o mamíferos.

El TGF- $\beta$  regula la diferenciación de preadipocitos, mioblastos y precursores osteogénicos. Se expresa en niveles particularmente altos en los sitios donde se lleva a cabo la condrogénesis y la osteogénesis durante la etapa embrionaria. Generalmente tiene un efecto negativo en la proliferación de muchos tipos celulares incluyendo células de origen epitelial, endotelial y hematopoyético. La inactivación de esta vía contribuye a la formación de tumores, ya que actúa deteniendo el ciclo celular al final de la fase G1, por medio de la represión de c-myc (un factor transcripcional mitogénico) y la inducción de inhibidores de CDKs (quinasas dependientes de ciclinas). [13] Como también estimula la angiogénesis puede facilitar la salida de células tumorales hacia el torrente sanguíneo y además suprimir la actividad de las células del sistema inmune que pudieran haberse infiltrado al tumor. [14]

El efecto del TGF- $\beta$  sobre la respuesta inmune también cubre otros aspectos: suprime la proliferación y diferenciación de células T y B *in vitro*, antagoniza los efectos de citocinas pro inflamatorias como IL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$ , IFN $\gamma$ ; bloquea la producción de especies reactivas de oxígeno y nitrógeno (ROS y NOS) y es un potente quimioatrayente de monocitos y en menor medida de fibroblastos. Además controla la producción de los componentes de la matriz extracelular y la remodela, alterando así la adhesión celular. Aumenta la síntesis y depósito de proteínas como fibronectina, proteoglicanos y algunas formas de colágena, mientras disminuye la expresión de proteasas como la colagenasa y el activador de plasminógeno, llevando a la acumulación de proteínas de matriz y facilitando la reparación tisular [15].

Sin embargo un aumento no controlado en la producción y activación del TGF- $\beta$  se asocia con enfermedades como osteoporosis, hipertensión, cirrosis hepática, fibrosis pulmonar idiopática, escleroderma, glomerulonefritis, ciertas formas de artritis reumatoide, vitreoretinopatías, y todas se caracterizan por la inflamación crónica. Este fenómeno se conoce como “*el lado oscuro del TGF- $\beta$* ”.

## Los receptores del TGF- $\beta$

Las principales proteínas que unen TGF- $\beta$  son los receptores tipo I, II, III o betaglicano y la endoglina. Todos ellos son glicoproteínas con un pase transmembranal.

Los receptores tipo I y II presentan cada uno un dominio de cinasa de serinas y treoninas, gracias a los cuales la señal puede ser propagada en el interior de la célula y llegar hasta el núcleo, donde se regula la transcripción de genes blanco. El betaglicano forma un homodímero no covalente que optimiza la interacción del ligando con los receptores tipo I y II; no obstante, cuando se encuentra en forma soluble puede actuar como un regulador negativo del TGF- $\beta$ . La endoglina también es un homodímero, identificado inicialmente en células endoteliales y que tiene un alto grado de similitud con el betaglicano, sobre todo en los dominios transmembranal e intracelular y también regula el acceso del ligando al receptor. Su ausencia resulta letal debido a defectos en la formación del corazón y vasos sanguíneos. De igual forma la carencia de betaglicano también conduce a la letalidad debido a malformaciones en corazón, hígado y defectos en la eritropoiesis. [18, 34]. Más adelante se tratará con más detalle a los receptores tipo I, II y III.

Además de los receptores de superficie, TGF- $\beta$  se une a varias proteínas solubles como  $\alpha$ 2 macroglobulina, decorina, biglicano, trombospondina,  $\alpha$  fetoproteína y la proteína precursora del  $\beta$ -amiloides. [16]

### Receptores tipo I y II

Ambos tipos de receptores constan de alrededor de 500 aminoácidos, el tipo I tiene un peso molecular de alrededor de 55 KDa y el tipo II de unos 75 KDa; con el extremo amino terminal de unión al ligando rico en cisteínas, seguido por una región transmembranal y finalmente un dominio de cinasa de serina/ treonina hacia el extremo carboxilo. El arreglo dimérico del ligando sugiere la formación de un complejo con 2 receptores tipo I y 2 tipo II. Los receptores tipo I tienen un dominio de glicinas y serinas caracterizado por la secuencia GSGSGS (llamado **dominio GS**) antes del dominio cinasa. Cuando el receptor se activa, este dominio es fosforilado por el receptor tipo II; ya que posee un dominio rico en serinas y treoninas en seguida del dominio cinasa y ausente en el receptor tipo I. Ver figura 1. [13, 16]

Los ligandos de la subfamilia del TGF- $\beta$  y activinas tienen gran afinidad por los receptores tipo II; y no interactúan con los tipo I. No obstante, TGF- $\beta$ 2 representa una excepción, pues su afinidad tanto por los receptores tipo I y II es baja. El resto de los ligandos de esta subfamilia se unen al ectodominio del receptor tipo II, lo que favorece la incorporación del receptor tipo I en un complejo que queda formado por un dímero del ligando y cuatro moléculas de receptor. Esta asociación permite que la cinasa del receptor tipo II (que está siempre activa) se autofosfore y a su vez fosfore la región GS del tipo I; la cual en estado inactivo tiene unida la **FKBP12** que mantiene a la cinasa en una conformación incapaz de fosforilar. Al fosforilarse la región GS, FKBP12 se libera y deja el sitio accesible para los sustratos del receptor I, las R-Smads. Las Smads son miembros de una familia de factores de transcripción regulados por receptores, que forman a su vez complejos para luego migrar hacia el núcleo y regular la expresión genética. [17]

La familia de receptores-cinasa de treonina y serina se compone de 12 miembros en el genoma humano: siete tipo I y cinco tipo II, todos para la señalización de miembros de la superfamilia del TGF- $\beta$ .

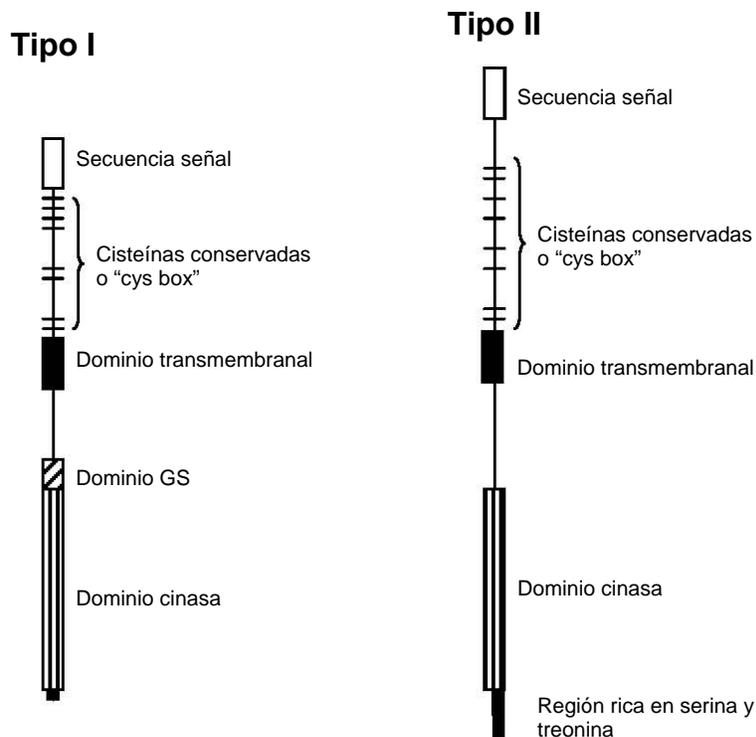


Figura 1. **Receptores tipo I y II.**

Modelo esquemático donde se muestran las características compartidas por los receptores de los miembros de la superfamilia del TGF- $\beta$  (Basado en Biochimica et Biophysica Acta , 1994; 1222: 71-80)

## Vías de señalización del TGF- $\beta$

El mecanismo general de señalización consiste en que el TGF- $\beta$  interacciona con el betaglicano y éste lo presenta a los receptores tipo II –aunque también son capaces de unir directamente al ligando, excepto en el caso de TGF- $\beta$ 2- que a su vez recluta y fosforila a los receptores tipo I.

Los receptores tipo I activos (es decir, fosforilados) fosforilan a su vez a proteínas de la familia de las Smads, capaces de formar complejos que son transportados al núcleo celular donde, junto con otros factores de transcripción, regulan la expresión de los genes blanco del TGF- $\beta$ . Ver figura 2.

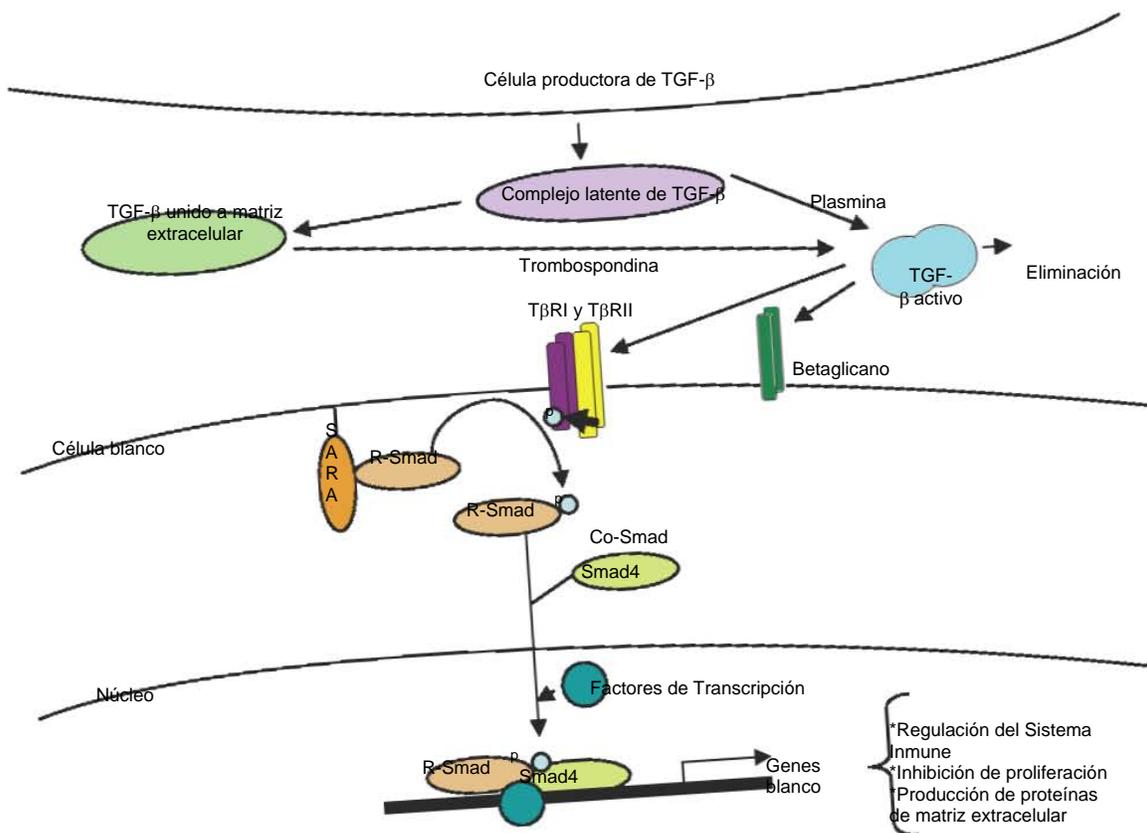


Figura 2. **Activación de la vía de TGF- $\beta$**

Esquema donde se muestra la producción y activación del TGF- $\beta$  para la posterior inducción de cambios en la expresión genética de la célula blanco.

El reconocimiento de las R-Smads por parte de los receptores es facilitado por proteínas auxiliares. Por ejemplo: Smad2 y 3 pueden ser inmovilizadas cerca de la superficie celular por SARA (Ancla de Smad para la Activación del Receptor), lo cual da mayor eficiencia al reclutamiento de las Smad a su receptor. (Figura 2)

En estado basal, SARA-Smad2 están en endosomas tempranos. Cuando el complejo del receptor es activado, existen dos posibilidades: que sea internalizado y dirigido a los endosomas ricos en SARA-Smad2 o que se fusione a vesículas con caveolina para su posterior degradación. La fosforilación de las Smads tiene varios efectos: desestabiliza su unión con SARA, expone su dominio de importación al núcleo y aumenta su afinidad por Smad4; para luego ensamblar complejos de regulación transcripcional. Cabe destacar que hay otras proteínas adaptadoras que facilitan la señalización como: Hgs, Disabled-2, Axina y  $\beta$ -espectrina.

Para regular negativamente la señalización, Smad7 o I-Smad compite con las R-Smads por el receptor activado y favorece su ubiquitinación y degradación con ayuda de las E3-ubiquitina-ligasas, las Smurfs (Factores reguladores de la ubiquitinación por Smads). El complejo receptor-Smad7-Smurf es internalizado por vesículas ricas en caveolina y dirigido hacia proteosomas para su eliminación.

Clásicamente, el TGF- $\beta$  se ha asociado con la vía de las SMADS, cuyas características y clasificación se describen enseguida. Sin embargo, hay que mencionar que TGF- $\beta$  activa otras cascadas de señalización. Algunas de ellas regulan la activación de las SMADS, pero otras inducen respuestas no relacionadas con la transcripción. TGF- $\beta$  puede activar las vías ERK, JNK y p38 MAPK; pero hasta ahora los mecanismos no han sido elucidados con profundidad. [37]

### **Características estructurales de las SMADS**

Las SMADS son proteínas que se encuentran en el citoplasma y que al ser activadas permiten la transducción de señales hasta el núcleo celular, donde regulan la expresión genética. Existen en vertebrados 8 proteínas Smad, que constituyen 3 clases funcionales:

- Smad regulada por el receptor o **R-Smad**
- Smad co-mediadora o **Co-Smad**
- Smad inhibidora o **I-Smad**

Las R-Smad (Smad 1, 2, 3, 5 y 8) son fosforiladas por el receptor tipo I, forman homotrímeros y luego complejos con Co-Smad (Smad 4) [19]. Dichos complejos se translocan al núcleo y con otros cofactores nucleares regulan la transcripción de genes blanco. Las I-Smad (Smad 6 y 7) compiten con las R-Smad por la interacción con el receptor o con Co-Smads. [20] Las Smad2 y 3 responden a

la señalización por la subfamilia de TGF- $\beta$ / activina/nodal, mientras Smad1, 5 y 8 corresponden a la subfamilia BMP/GDF/MIS.

Los extremos amino y carboxilo terminal de las SMADS reciben los nombres de dominio MH1 y MH2 respectivamente; y están altamente conservados. Existe una región intermedia de longitud y secuencia variables. Cada dominio está relacionado con funciones específicas que además varían dependiendo del estado (ya sea basal o activo) en que se encuentra la proteína.

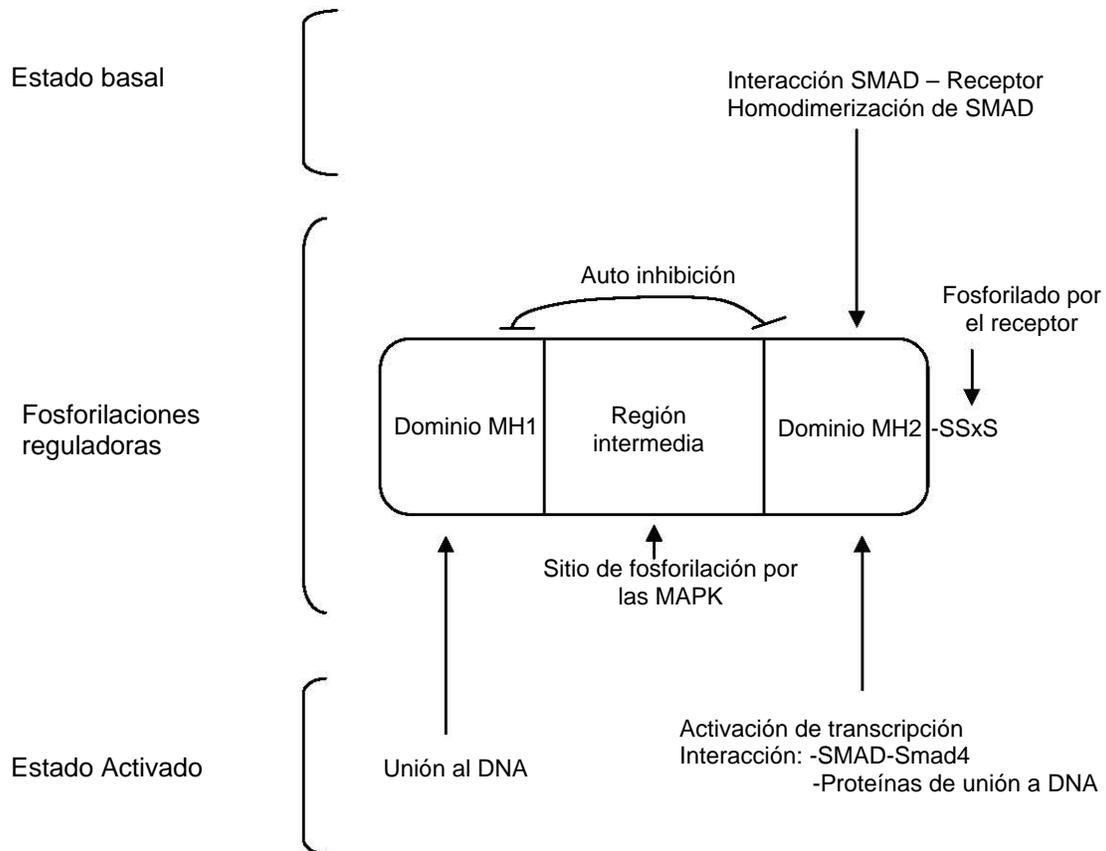


Figura 3. **Características estructurales de las SMAD.**

Aquí se resumen las principales funciones de los 3 dominios conservados en la familia de las SMAD tanto en estado basal como activado. (Basado en Annu Rev Biochem,1998; 67: 753-91)

El dominio MH1 es de aproximadamente 130 aminoácidos y se conserva entre las SMAD reguladas por el receptor y en la Smad4, pero no entre las SMAD inhibitoras. En estado basal inhibe la actividad transcripcional del dominio MH2, y en estado activado es capaz de unir al ADN.

El dominio MH1 de Smad4 contribuye a la unión a DNA del complejo transcripcional formado por Smad2-Smad4. Aunque dicha actividad se inhibe en presencia del dominio MH2 en estado basal, sugiriendo que en estado basal se inhiben mutuamente.

El dominio MH2 consta de 200 aminoácidos, es responsable de la activación de la transcripción, contiene sitios de fosforilación por el receptor y está involucrado con interacciones proteína-proteína entre los complejos oligoméricos que las SMAD de las 3 clases forman en estado basal. [21, 22]La región intermedia contribuye a la formación de homo oligómeros de SMAD. En las SMAD reguladas por receptores, esta región tiene sitios fosforilables por las MAPK lo cual inhibe su translocación al núcleo.

### **Receptor tipo III o betaglicano**

El betaglicano se expresa en células mesenquimales, epiteliales, neuronales y otros tipos celulares tanto de tejido fetal como adulto. Pero también hay células que responden al TGF- $\beta$  y no presentan betaglicano, como: mioblastos, endotelio y células hematopoyéticas. Por ello al principio se le consideró un receptor accesorio pero es más apropiado el término de **co-receptor**, pues puede regular los efectos del TGF- $\beta$ .

Es una glicoproteína membranal dimérica sintetizada a partir de un precursor de 853 aminoácidos, con un gran dominio extracelular, una región transmembranal y una pequeña cola citoplásmica de 43 aminoácidos rica en serinas y treoninas que carece de dominios estructurales que la relacione con la señalización de TGF- $\beta$  (Figura 4).

El dominio extracelular contiene sitios potenciales de glicosilación en asparaginas y 2 serinas 535 y 546 donde se unen glicosaminoglicanos (GAGs) del tipo de sulfatos de heparano y condroitina, dándole una movilidad electroforética que oscila entre 280-330 KDa. Cuando carece de GAGs disminuye a 120-130KDa y es considerado el "core" de betaglicano. La capacidad del betaglicano por unirse al TGF- $\beta$  radica en su ectodominio. Aunque sus cadenas GAG son capaces de unir al factor de crecimiento de fibroblastos (FGF), no son indispensables para la unión del TGF- $\beta$ . [24]

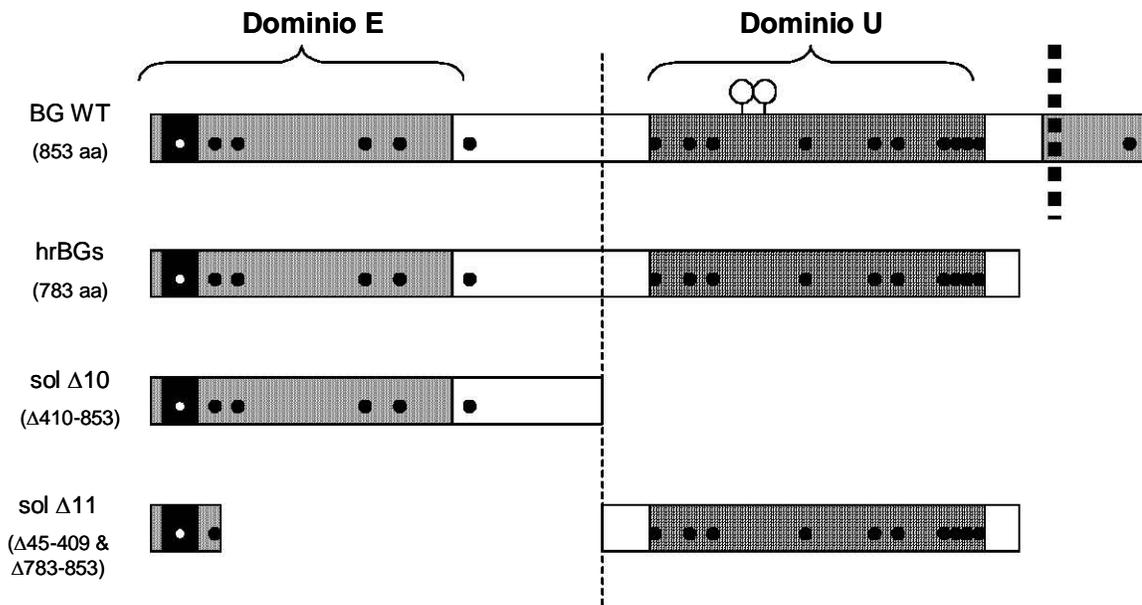


Figura 4. **Estructura del Betaglicano y proteínas recombinantes usadas.**

Se muestran esquemáticamente tanto el BG silvestre (WT), como el betaglicano humano recombinante soluble (hrBGs), y las proteínas de rata  $\Delta 10$  y sol  $\Delta 11$ ; éstas tres últimas son proteínas recombinantes solubles ocupadas en este trabajo. El área sombreada corresponde a la región similar a endoglina, la rayada a la región similar a uromodulina; los círculos negros representan cisteínas, el cuadro negro al péptido señal, los círculos blancos indican serinas donde se unen GAGs, y los cuadros blancos son regiones que no se parecen a ninguna otra proteína. La línea punteada divide las regiones de unión de TGF- $\beta$ : una es la próxima a la membrana y semejante a la uromodulina mientras la otra es distal o semejante a la endoglina; de ahí que se denominen dominio U y dominio E respectivamente. (Basada en J Biol Chem. 2001, Vol 276, No 18 14588-14596)

El betaglicano (BG) contiene regiones parecidas a otras proteínas: es similar a la endoglina en el extremo amino terminal, y las regiones transmembranal y citoplásmica (de los aminoácidos 45 a 409) (Figura 4). Mientras que de los aminoácidos 410 al 718 es similar a la uromodulina (de ahí que se consideren dominio E y dominio U), a la proteína granular de zimógeno pancreático GP-2 y a los receptores de esperma Zp2 y Zp3; y se caracteriza por el patrón de cisteínas así como de residuos hidrofóbicos y polares que generan estructuras semejantes entre estas proteínas. [26]

Las estructuras primarias de los betaglicanos de humano, rata, ratón, cerdo y pollo indican que es una proteína muy conservada, sin embargo la ausencia de genes ortólogos en especies de invertebrados (como *D. melanogaster* o *C. elegans*) sugiere su importancia en la biología de los vertebrados.

Las regiones transmembranales e intracelulares son las mejor conservadas y tienen un 63% de identidad con los dominios correspondientes de endoglina. Las regiones citoplásmicas de todos los betaglicanos secuenciados tienen un 42% de serinas y treoninas que pueden ser potencialmente fosforiladas. [27,28]

## El betaglicano regula al TGF- $\beta$

El betaglicano es capaz de unir todas las isoformas de TGF- $\beta$  con alta afinidad, regulando así su acceso a los receptores tipo I y II. En presencia del TGF- $\beta$ , el betaglicano se asocia al receptor tipo II formando un complejo ternario que aumenta los efectos del TGF- $\beta$ . Esta potenciación es hasta un orden de magnitud mayor para el TGF- $\beta$ 2. Este fenómeno se describió como “presentación de TGF- $\beta$ ” [30] y es una de las habilidades mejor caracterizadas del betaglicano.

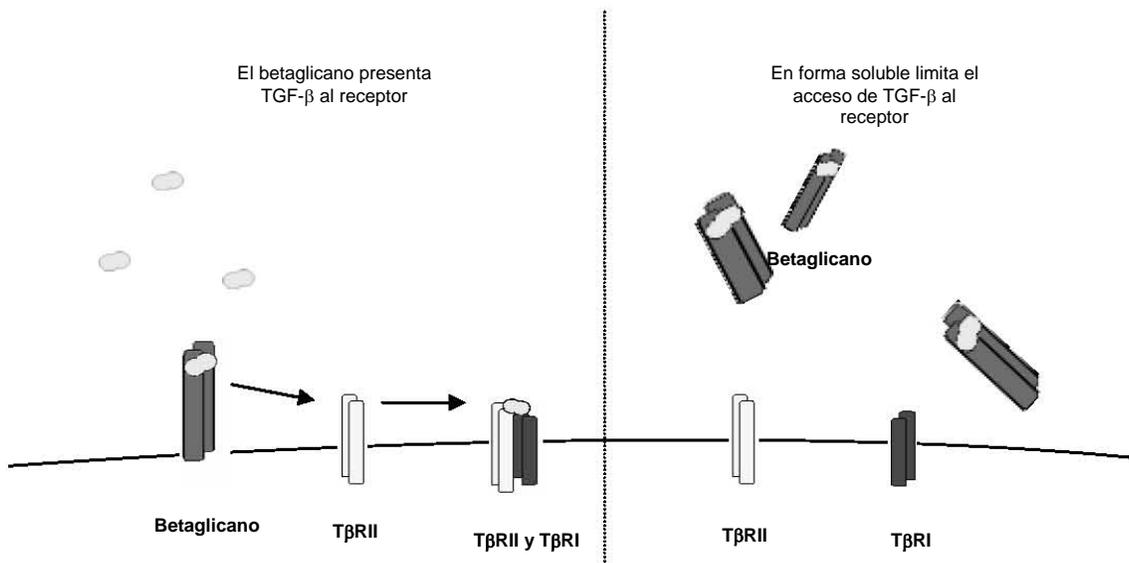


Figura 5. **El betaglicano actúa como regulador dual del acceso de TGF- $\beta$  a las células.** En la superficie celular favorece la interacción del TGF- $\beta$  con el receptor tipo II. En cambio cuando se encuentra soluble “secuestra” al ligando e impide la formación del complejo de señalización.

El betaglicano puede ser liberado al medio extracelular gracias al corte proteolítico de la metaloproteasa de matriz -1 de tipo membranal (MT MMP-1) en la porción extracelular. La forma soluble une al TGF- $\beta$  pero impide su unión al receptor tipo II, en este caso neutraliza al TGF- $\beta$ . Por lo que se considera que el betaglicano puede ser un regulador tanto positivo como negativo del acceso del TGF- $\beta$  a las células. Dicha forma está en suero y matriz extracelular. Ver figura 5. [24]

Dado que el exceso de TGF- $\beta$  está relacionado con procesos patológicos de inflamación y fibrosis, el betaglicano soluble ya ha sido aplicado exitosamente con fines terapéuticos, pues ha resultado ser un

potente inhibidor de TGF- $\beta$ . Un caso es el modelo murino de tuberculosis pulmonar donde se ha demostrado que el incremento de los niveles de TGF- $\beta$  en pulmón correlacionan con el avance de la enfermedad, pero al administrar betaglicano soluble recombinante se restaura la respuesta inmune y se reduce la carga de bacilos. Otro ejemplo es que el daño renal presentado por los ratones diabéticos db/db, considerado modelo de la nefropatía diabética humana, es exitosamente evitado al administrar betaglicano soluble recombinante. [31, 32]

### **El betaglicano también regula activinas y BMPs**

En presencia de la inhibina A, el betaglicano también puede interactuar con receptores tipo II de otros miembros de la superfamilia del TGF- $\beta$ : como al receptor tipo II de activina y de BMP (proteínas morfogenéticas de hueso), lo cual muestra que es un co-receptor versátil para al menos tres miembros distintos de la superfamilia del TGF- $\beta$ . Los complejos constituidos por BG-Inhibina-Receptor tipo II de activina y BG-Inhibina-Receptor tipo II de BMP evitan la formación de complejos regulares de señalización con activina o BMP y con sus respectivos receptores tipo I [33, 34]. Este “secuestro” afecta la actividad de BMP y de la activina. Es probable que la presencia del betaglicano afecte el resultado de procesos fisiológicos y de desarrollo en los que participan los diferentes miembros de la superfamilia del TGF- $\beta$ .

### **El dominio citoplásmico del betaglicano**

Durante la formación del complejo de presentación, el receptor tipo II del TGF- $\beta$  fosforila a la treonina 841 del betaglicano, lo cual permite la unión de la  $\beta$ -arrestina 2, y en consecuencia, la endocitosis del complejo integrado por el betaglicano y el receptor tipo II. La internalización del complejo de receptores es otra forma de regular negativamente la señal mediada por el TGF- $\beta$  [46].

Las regiones citoplásmicas de todos los betaglicanos secuenciados son ricas en serinas y treoninas que potencialmente pueden ser fosforiladas, y por tanto son regiones muy conservadas. Alguno de estos aminoácidos al ser fosforilado puede actuar como sitio de anclaje de otras proteínas citoplásmicas. Queda abierta la posibilidad de que pueda efectuar diversas funciones según los receptores tipo II con los que esté formando complejos de señalización, [24] como los receptores tipo II de activinas o los de BMPs.

## El betaglicano en el desarrollo embrionario

El ratón *knock-out*  $BG^{-/-}$ , muere durante la etapa embrionaria alrededor del día 13.5 de gestación debido a defectos en la proliferación del miocardio, apoptosis en hígado y la consecuente interrupción en la eritropoiesis. El betaglicano además se requiere para la transición epitelial hacia células endoteliales en corazón, lo cual permite la formación de las válvulas cardíacas. Lo cual no era de esperarse por la ausencia de un “receptor accesorio” prescindible, al menos, *in vitro*. Este fenotipo trató de explicarse con la ausencia de señalización de TGF- $\beta$ 2, pero si ésta fuera la causa, sería el mismo fenotipo que el del ratón deficiente de TGF- $\beta$ 2 y no es así. De los TGF- $\beta$ 2<sup>-/-</sup>, alrededor de una tercera parte nacen vivos (aunque mueren poco después de haber nacido a causa de colapso respiratorio) y sus defectos son propios de estadios tardíos en la gestación: esqueléticos, oculares, craneofaciales y del tracto urogenital; sin defectos hepáticos. Lo cual muestra que la función real del betaglicano no está limitada a la señalización de TGF- $\beta$ 2 [35, 36]

Debido a la presencia de dominios estructurales como funcionales en el betaglicano, conviene tener anticuerpos para poder identificarlos específicamente y estudiar mejor sus funciones biológicas.

## Anticuerpos Monoclonales

### Generalidades

A finales del siglo XIX Emil von Behring y Shibasaburo Kitasato descubrieron que el suero de animales que habían estado enfermos de difteria o tétanos contenía una “actividad antitóxica” que podía conferir protección a corto plazo a otros. Posteriormente se identificó que dicho efecto está mediado por **anticuerpos**, que para su producción es precisa una infección previa y que además son capaces de reconocer al patógeno responsable. Los anticuerpos son proteínas producidas por el sistema inmune en respuesta a moléculas ajenas al organismo; cada uno de ellos se une específicamente a su molécula blanco, denominada **antígeno**. Así como potencialmente hay millones de antígenos distintos, también es posible generar gran variedad de anticuerpos diferentes. El término antígeno a veces se confunde con **inmunógeno**, sin embargo el primero se usa sólo para las moléculas que reconocen los anticuerpos y el segundo se refiere a aquéllas que son capaces de inducir una respuesta inmune, que no implica necesariamente la producción de anticuerpos.

La función principal del sistema inmune es proteger contra organismos infecciosos y sus productos tóxicos, para lo cual ha desarrollado una amplia variedad de mecanismos para localizar, neutralizar y eliminar virus, así como células y macromoléculas no propias. Clásicamente se ha considerado a la respuesta inmune dividida en Innata y Adaptativa. Esta última mediada, entre otras células, por

linfocitos B, capaces de producir y secretar anticuerpos, dirigidos específicamente contra moléculas extrañas. [38]

En estado inmaduro los linfocitos B presentan en su superficie el receptor de células B (BCR), que es un anticuerpo o **inmunoglobulina**, y cada uno expresa un receptor de especificidad diferente respecto a otro.

En la década de 1950, Macfarlane Burnet propuso el mecanismo de selección para explicar por qué los anticuerpos, que pueden inducirse en principio contra cualquier antígeno, sólo se producen contra aquéllos a los que se expone el organismo. Los postulados de Burnet se conocen como **Teoría de la Selección Clonal para la Producción de Anticuerpos**. Sugirió la preexistencia de muchas células potencialmente productoras de anticuerpos, cada una con un receptor de diferente especificidad. Si alguna era capaz de unir antígeno con suficiente avidéz podía entonces activarse y proliferar para producir progenie idéntica. Estas células provenientes de una sola se llaman **clonas** y se dice que secretan **anticuerpos clonotípicos** con especificidad idéntica a la del receptor de superficie que originalmente propició la activación y la expansión clonal.

Potencialmente, se pueden generar hasta  $10^{11}$  anticuerpos diferentes [38]. En 1976 Susumu Tonegawa descubrió que esto es posible gracias a que los genes de las inmunoglobulinas se heredan como segmentos que durante el desarrollo del linaje linfocitario se recombinan hasta formar un receptor funcional, asegurando así que con los millones de linfocitos que hay en el cuerpo hayan millones de receptores diferentes y sólo aquéllos que encuentren su antígeno serán activados para proliferar y diferenciarse.

Mientras tanto, los linfocitos que reconocen antígenos propios son eliminados durante el desarrollo, quedando ausentes del repertorio de linfocitos maduros con el fin de evitar autoinmunidad.

Un anticuerpo reconoce generalmente sólo una región pequeña de la superficie de una molécula. La estructura que reconoce el anticuerpo se llama **determinante antigénico** o **epítotope**. Se define como **epítotope conformacional** al formado por aminoácidos que no se encuentran adyacentes en la estructura primaria de la proteína. Mientras que se define como **epítotope lineal** al formado por residuos adyacentes en la estructura primaria [39].

Al introducirse un antígeno al organismo, éste es reconocido por las células presentadoras de antígeno para luego ser endocitado y degradado. Algunos fragmentos se unirán al Complejo Mayor de Histocompatibilidad tipo II (MHC-II) para luego ser presentados en la superficie celular y así estimular a células como las T cooperadoras ( $T_h$ ) para producir citocinas que promuevan la activación y proliferación de células B en tejidos linfáticos (como bazo y ganglios linfoides), con la consecuente inducción de anticuerpos. Durante la respuesta inmune natural o después de una **inmunización** – esto es la inducción deliberada de la respuesta inmune-, resulta una mezcla de anticuerpos con

diferentes especificidades y afinidades hacia el antígeno, de hecho entre 5 y 20 días después de la inmunización ya es posible detectarlos. Como no todas las moléculas de interés son buenos inmunógenos, es conveniente el uso de **adyuvantes**, sustancias cuyas características físicas y biológicas afectan la respuesta inmune, aumentando la eficiencia en la presentación de antígeno e impidiendo su rápida degradación para así potenciar la generación de anticuerpos. [40]

### **Estructura y Función.**

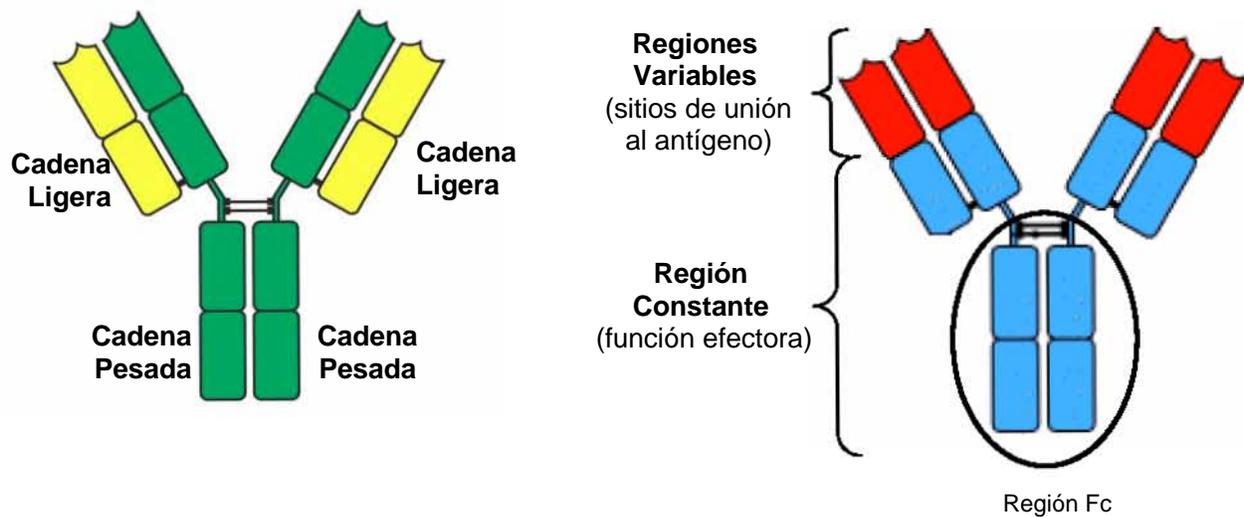
Cada molécula de anticuerpo tiene forma de “Y” y se compone de 2 regiones:

- *Región constante:* Define la clase y determina sus propiedades funcionales. Adopta una de las 5 formas o **isotipos**.
- *Región variable:* Compuesta de secuencias con diferencias sutiles, lo cual favorece su unión a gran variedad de antígenos.

Además cada anticuerpo se compone de 2 cadenas pesadas idénticas (ya sean  $\gamma$ ,  $\mu$ ,  $\alpha$ ,  $\epsilon$  o  $\delta$ ) y de 2 cadenas ligeras idénticas (que pueden ser  $\kappa$  o  $\lambda$ ), ambas con regiones tanto variables como constantes. (Figura 6) La región variable de ambas cadenas se combina para formar el sitio de reconocimiento de antígeno, de tal forma que ambas cadenas contribuyen a la especificidad antigénica del anticuerpo.

Las regiones Fc tienen las siguientes funciones efectoras:

- Ser reconocidas por receptores especializados de células del sistema inmune. Ejemplo: Las porciones Fc de IgG1 e IgG3 las reconocen los receptores Fc<sub>γ</sub>R de macrófagos y neutrófilos, mientras la porción Fc de IgE se une al receptor Fc<sub>ε</sub>R de células cebadas, basófilos y eosinófilos activados induciendo la liberación de mediadores inflamatorios.
- Unir complemento al complejo antígeno: anticuerpo.
- Permitir la distribución de anticuerpos a lugares que no llegarían de no ser por el transporte activo. Esto incluye secreciones mucosas, lágrimas, leche, y transferencia de IgG de la madre al feto.



**Figura 6 Estructura de los anticuerpos.**

Los anticuerpos se forman de 2 cadenas ligeras y 2 cadenas pesadas unidas tanto de forma covalente como no covalente, ambas con regiones variables y constantes, y sólo parte de las cadenas pesadas constituyen la región Fc.

Los 5 isotipos de anticuerpos o inmunoglobulinas son: IgM, IgD, IgG, IgE e IgA (Figura 7). Las inmunoglobulinas representan alrededor del 20% de las proteínas del suero, que equivale a 15-20 mg/ml. Las clases más abundantes son IgG (75% de las Ig totales) e IgM (aproximadamente el 10%). En humanos, los IgG a su vez se subdividen en IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4, nombrados así de mayor a menor abundancia en el suero, IgG1 predomina al representar el 60-70% de las IgG totales. Tanto IgM como IgA son capaces de formar multímeros a partir de la estructura básica de la inmunoglobulina. Este evento es indispensable para que la IgA pueda transportarse a través del epitelio (aunque en plasma se encuentre como monómero). Anticuerpos de diferente isotipo se encuentran en compartimentos diferentes del cuerpo y difieren en los mecanismos efectores.

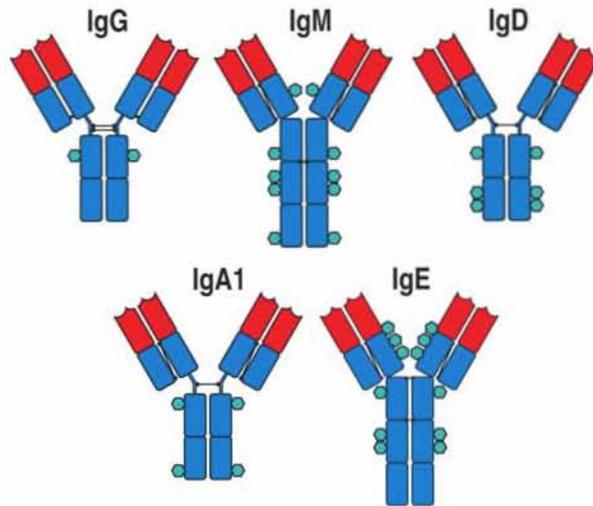


Figura 7 **Isotipos que pueden presentar los anticuerpos**

Confieren propiedades particulares así como determinan su distribución en el organismo. (Los hexágonos representan sitios de glicosilación).

La respuesta primaria ocurre ante la primera inmunización y se caracteriza por la secreción de IgM. Ocurre gradualmente un cambio en las cadenas pesadas, pasando de la  $\mu$  a  $\gamma$ , y algunas mutaciones en las regiones variables; fenómenos conocidos como *cambio de isotipo* e *hipermutación somática* respectivamente. Entonces deja de secretarse IgM y se producen IgG con afinidad mejorada hacia el antígeno, con lo que se logra optimizar la afinidad y aumentar la vida media del anticuerpo. [38]

La manera más simple en que los anticuerpos nos protegen de patógenos o sus productos tóxicos es uniéndoseles, bloqueando así su acceso a las células que pueden afectar. Esto se conoce como **neutralización** y es importante en la protección contra toxinas y virus.

La unión de anticuerpos a bacterias facilita su ingestión y destrucción por las células fagocíticas, que poseen receptores para la región constante de los anticuerpos (FcR). El recubrimiento de patógenos y partículas extrañas se llama **opsonización**.

La tercera función de los anticuerpos es activar un sistema de proteínas plasmáticas conocido como *Complemento*. Aunque también puede activarse sin ayuda de los anticuerpos, su función es promover la fagocitosis de los patógenos y la formación de poros en la superficie de éstos para facilitar su eliminación.

La interacción entre un anticuerpo y su antígeno es *no covalente* y *reversible*, por lo que puede ser alterada por concentraciones elevadas de sal, pH extremos, detergentes y a veces por la competencia con altas concentraciones del epítipo puro.

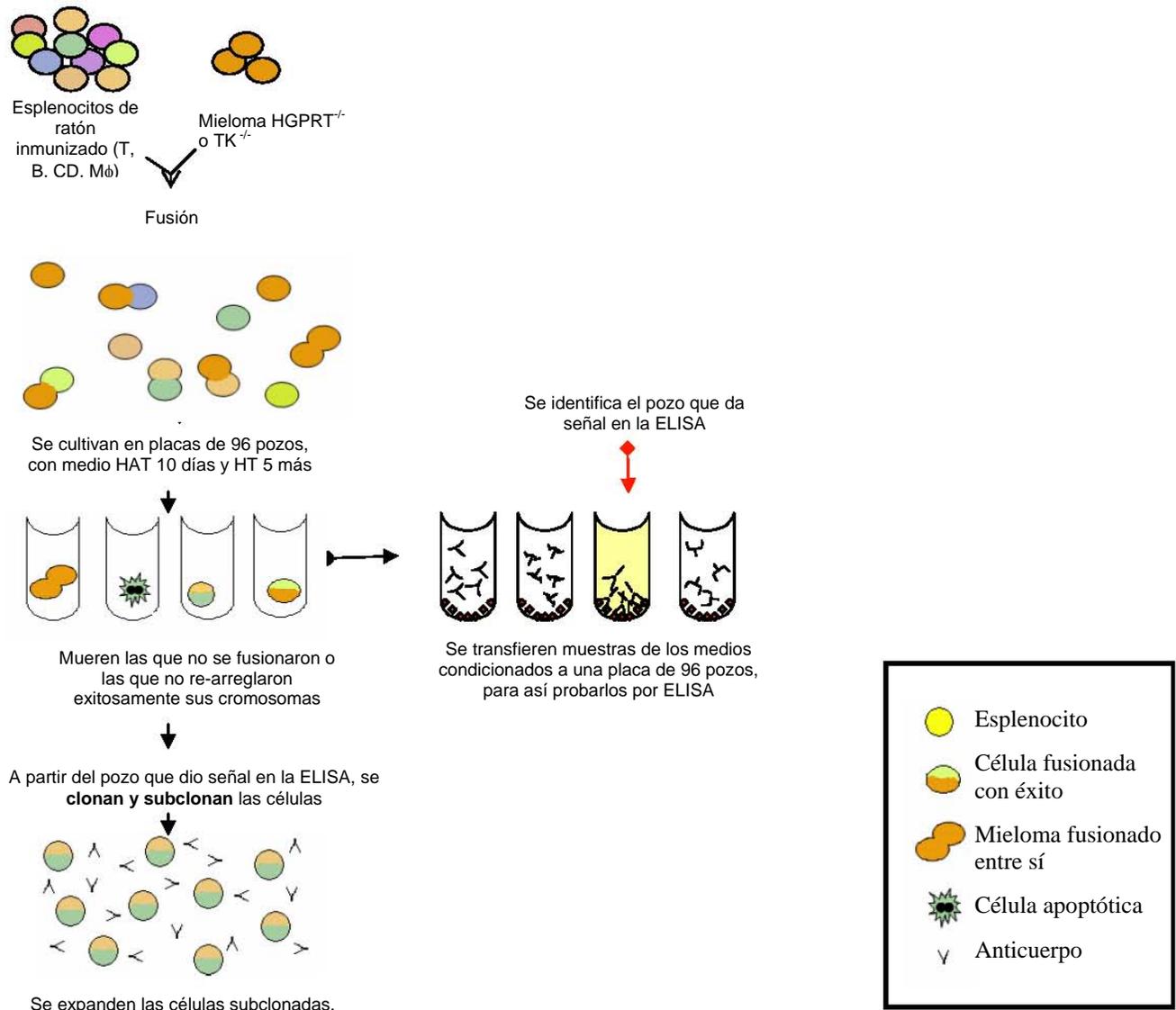
## **Generación in vitro de anticuerpos monoclonales**

Fue observado que en sueros de pacientes con mieloma múltiple (tumor de células plasmáticas, productoras de anticuerpo) se encontraban abundantes cantidades de proteína de mieloma, que no era otra cosa que inmunoglobulinas. Estos estudios sugirieron que los anticuerpos podrían obtenerse de células plasmáticas inmortalizadas. Desafortunadamente, la especificidad antigénica de la mayoría de las proteínas de mieloma era desconocida, limitando su uso como herramientas inmunológicas.

Este problema fue resuelto en 1975 por Georges Köhler y Cesar Milstein, quienes desarrollaron la técnica que permitiría obtener poblaciones homogéneas de células productoras de anticuerpos específicos. Dicha técnica consiste en fusionar células de bazo -de un ratón previamente inmunizado- con células de un mieloma, para así producir células híbridas o **hibridomas** que fueran capaces de proliferar indefinidamente y de secretar anticuerpos específicos contra la proteína usada para la inmunización. Como cada hibridoma produce un solo anticuerpo, en cultivo se obtienen grandes cantidades de células provenientes a partir de una sola y sus sobrenadantes contienen un mismo anticuerpo, de ahí que se les llame **anticuerpos monoclonales**. Los linfocitos provenientes del bazo aportan la capacidad de hacer el anticuerpo deseado y el mieloma la de proliferar. [42, 43]. Originalmente el agente de fusión o **fusógeno** era un virus inactivado, el más común era el virus Sendai. Actualmente es más común utilizar fusógenos químicos como el polietilenglicol (PEG). Sin embargo, el mieloma producía su propio anticuerpo y frecuentemente las cadenas pesadas y ligeras de las inmunoglobulinas de la célula B y del mieloma recombinaban entre sí, lo cual reducía la eficiencia de la producción de anticuerpos monoclonales específicos para el antígeno usado para inmunizar. Esta técnica se ha ido refinando con la utilización de una línea tumoral incapaz de producir cadenas de inmunoglobulina para asegurar que el hibridoma sólo producirá el anticuerpo deseado.

Frecuentemente los ratones de la cepa Balb/c se usan para inmunizar, pues muchas líneas parentales de mieloma se obtuvieron a partir de esta cepa y además esto facilita que el hibridoma sea crecido posteriormente como **líquido de ascitis**, lo cual da mayor rendimiento en la obtención de anticuerpo: generalmente 1000 veces más concentrado que en sobrenadantes de cultivo celular.

Una vez que las células han sido fusionadas (Figura 8) se cultivan en medio con **aminopterina**, (medio HAT por contener Hipoxantina, Aminopterina y Timidina) un inhibidor de la síntesis de ácidos nucleicos. Como las células del mieloma carecen de las enzimas indispensables para el reciclaje de ácidos nucleicos -ya sea de la Hipoxantina Guanosil Fosforribosil Transferasa (HGPRT) o de la Timidina Cinasa (TK)- en unos pocos días todas mueren por la falta de purinas.



**Figura 8. Generación de hibridomas.**

Luego de haber sido inmunizados los ratones se sacrifican para obtener esplenocitos (que son una mezcla de células B, T, células dendríticas (CD) y macrófagos (Mφ)) y fusionarlos con un mieloma deficiente en enzimas de la vía de reciclaje de ácidos nucleicos (HGPRT: Hipoxantina Fosfo-Ribosil Transferasa, TK: Timidina Cinasas). Después de varias semanas en cultivo se seleccionan las células que lograron proliferar en medios con HAT (Hipoxantina, Aminopterina, Timidina). Y por ensayos de ELISA se seleccionan los hibridomas que producen anticuerpo contra el antígeno para luego clonarlos y expandirlos.

Además, los esplenocitos que tampoco se fusionen no sobrevivirán, pues a pesar de que poseen la HGPRT y por tanto el HAT no es tóxico para ellas, no son líneas inmortalizadas. De tal forma que después de unas semanas de haberse llevado a cabo la fusión, las colonias que pudieran observarse se deben al rearreglo exitoso de los cromosomas de los esplenocitos con el mieloma, y serían entonces células inmortales y resistentes a la aminopterina, pues la deficiencia se complementa. Pero sólo unas pocas tendrán la capacidad de producir anticuerpo contra el antígeno usado en la inmunización.

Entonces los hibridomas que producen el anticuerpo específico se identifican por medio de ELISA y se vuelven a poner en cultivo haciendo diluciones seriadas, esto se conoce como **clonación**. Repitiendo el proceso varias veces se asegura que su progenie sea idéntica y que produzca sólo un tipo de anticuerpo, de ahí que se les llame **anticuerpos monoclonales**.

Es indispensable la clonación y subclonación de dichas colonias, para estar seguros de obtener una población donde todas las células provengan de una, que por tanto produzcan el mismo anticuerpo y que éste cuente con la especificidad que se requiera.

### **Ventajas y Desventajas de los anticuerpos monoclonales**

Los anticuerpos se unen a sus antígenos en forma específica y estable, con una constante de disociación ( $K_D$ ) de alrededor de  $10^{-4} - 10^{-12}$ . Son muchas las técnicas que explotan esta unión. Las características más importantes de una respuesta mediada por anticuerpos son la clase o isotipo, la especificidad y la afinidad.

La cantidad de anticuerpo producida está en función del número de células B, su velocidad de síntesis y la persistencia del anticuerpo después de su producción. Esta última característica, sobre todo en plasma y fluido extracelular, depende de su isotipo; pues cada uno tiene vida media diferente. Además el isotipo también determina las funciones biológicas del anticuerpo y los sitios a los cuales tendrá acceso.

La **especificidad** determina la capacidad del anticuerpo de distinguir al antígeno de otras proteínas. La **afinidad** se refiere a la fuerza de unión del anticuerpo con su antígeno considerando al primero *con un solo sitio de unión* y al segundo como *monovalente*. Por lo tanto, a mayor afinidad, menor cantidad de anticuerpo se requiere para detectar el antígeno.

Si se toma la *fuerza total* de unión de una molécula con *más de un sitio* de unión se llama **avidez**, en otras palabras, es la estabilidad del complejo antígeno- anticuerpo. [41]

Para monitorear una respuesta inmune se analiza el suero, la fase fluida de la sangre coagulada, que por ser rica en anticuerpos específicos contra la proteína con que se inmunizó se llama **antisuero** y, por su naturaleza policlonal, es útil para varios propósitos. No obstante, su uso tiene varias desventajas:

Cada antisuero es distinto de otro, incluso si se hace en animales genéticamente iguales siguiendo los mismos protocolos de preparación de antígeno e inmunización. La afinidad cambia según el estado en que se encontraba el animal en el momento en que se tomó sangre para obtener el antisuero.

Además sólo se produce en volúmenes limitados, haciendo imposible el uso del mismo para experimentos largos y complejos o pruebas clínicas.

Incluso si los anticuerpos se purifican por cromatografía de afinidad, pueden haber pequeñas poblaciones de anticuerpos que interactúen inespecíficamente con el antígeno (**reacción cruzada**) y confundan el análisis de resultados.

No obstante, el hecho de provenir de varias clonas también le otorga su principal ventaja: la capacidad de formar grandes complejos inmunes con el antígeno, siendo muy eficiente (a diferencia de los anticuerpos monoclonales) para precipitar proteínas o aglutinar células

Para evitar estos problemas y aprovechar al máximo las propiedades de los anticuerpos, se ha recurrido a la generación de anticuerpos monoclonales: su disponibilidad es prácticamente ilimitada, su estructura homogénea y su especificidad seleccionada durante el proceso. Sin embargo, la producción de anticuerpos monoclonales consume mucho más tiempo y dinero que la producción del antisuero convencional; por lo que es necesario considerar con más detalle las ventajas de su uso respecto al antisuero. Tabla 1

	<b>Antisuero</b>	<b>Anticuerpo Monoclonal</b>
<b>Núm. de Determinantes Antigénicos</b>	Varios	Uno
<b>Especificidad</b>	Según el animal y las condiciones de sangrado	Estándar
	Reacción cruzada con determinantes comunes	Puede ocurrir reacción cruzada
<b>Afinidad</b>	Varía según el momento en que se obtiene	Seleccionada durante la clonación
<b>Rendimiento de anticuerpo</b>	Hasta 1 mg/ml	Hasta 100 µg/ml en cultivo y hasta 20 mg/ml en ascitis
<b>Inmunoglobulina contaminante</b>	Hasta el 100%	Nada en cultivo. Hasta el 10% en ascitis

Tabla 1 **Diferencias entre los antisueros y los anticuerpos monoclonales.**  
 El costo de su obtención varía significativamente, por lo que dependiendo de los objetivos que se tengan se escoge lo que cumpla las expectativas.

## **Aplicaciones**

Algunos de los posibles usos de los anticuerpos son:

### *Identificación y estudio de moléculas*

Permiten la detección de antígenos en muestras complejas, determinar sitios de producción, expresión, deposición y actividad de moléculas en células o tejidos, también para definir antígenos de diferenciación celular o definir poblaciones –incluso tumorales.

### *Diagnóstico*

Para determinar componentes de la sangre que pudieran servir como marcadores de enfermedad. (diagnóstico de enfermedades parasitarias, bacterianas o virales por medio de la detección de antígenos, niveles alterados de complejos inmunes, proteínas de fase aguda, marcadores de cáncer, endocrinopatías, embarazo, drogas, toxinas y medidores de actividad celular como interferones, factores de crecimiento, etc.)

### *Purificación de moléculas y células*

Cromatografía por afinidad, usando anticuerpos para purificar su antígeno; o para hacer marcaje fluorescente de células para su separación por FACS (Fluorescence Activated Cell Sorting)

### *Potenciales aplicaciones terapéuticas*

En la inducción de inmunosupresión a fin de tratar enfermedades autoinmunes o para neutralizar toxinas, o incluso para dirigirlos contra antígenos de células tumorales que permita visualizarlos e inducir citotoxicidad. [44]

## **Justificación**

Los anticuerpos monoclonales contra betaglicano caracterizados en el presente trabajo permitirán ofrecer una útil herramienta para el estudio de las funciones biológicas de este correceptor al permitir su identificación en ELISA, western blot e inmunoprecipitación.

## **Objetivos**

### *Generales:*

Caracterizar hibridomas que produzcan anticuerpos monoclonales dirigidos contra el betaglicano humano recombinante soluble (hrBGs).

### *Específicos:*

- 1) Determinar el título de los anticuerpos monoclonales contra el hrBGs por ELISA
- 2) Determinar si los anticuerpos monoclonales reconocen al BG en ensayos de western blot
- 3) Determinar si los anticuerpos monoclonales inmunoprecipitan al betaglicano a partir de extractos celulares
- 4) Determinar si alguno es capaz de reconocer específicamente cualquiera de los dominios del BG recombinante, ya sea de humano o de rata.

## **Materiales y Métodos**

### **Reactivos**

El TGF- $\beta_2$  se obtuvo de CIBA-Geigy (Basel, Switzerland). Las sales para preparar amortiguadores e inhibidores de proteasas fueron adquiridos y preparados a partir de reactivos de SIGMA-Aldrich Co. (México). Las proteínas recombinantes hrBGs,  $\Delta 10$  y  $\Delta 11$  fueron generadas en el laboratorio como se describe a continuación.. El cultivo celular se hizo con RPMI 1640, complementado con Suero Fetal Bovino (SFB) al 10%, 100 U/ ml de Penicilina, 100 $\mu$ g/ ml de Estreptomicina, 2mM de L-Glutamina y 1mM de Piruvato de sodio. Todos los reactivos para cultivos celulares fueron adquiridos de GIBCO/BRL. El HAT usado proviene de un stock 50X comercializado por Sigma-Aldrich Co. La Plasmina Humana se obtuvo de Boehringer Mannheim (Germany) comercializada en México por Roche. El material de plástico empleado para cultivos celulares se obtuvo de CORNING COSTAR Corp. Cambridge, MA. El antisuero #822 se obtuvo como se describe en [30], los anticuerpos secundarios usados son: ImmunoPure Goat anti-Mouse IgG + IgM (H+L) peroxidase conjugated (Pierce) e ImmunoPure Goat anti-Rabbit IgG (H+L), peroxidase conjugated (Pierce). Las placas de ELISA usadas fueron Nunc –Immunoplate Maxi Sorp, y el OPD con que se reveló fue ImmunoPure OPD tablets 5mg (Pierce). Los western blots se revelaron ECL plus de Amersham Biosciences.

### **Proteínas recombinantes (hrBGs, sol $\Delta 10$ y sol $\Delta 11$ )**

Los procedimientos para generar, expresar y purificar el hrBGs son similares a aquéllos descritos anteriormente para el betaglicano soluble de rata. Brevemente, el cDNA del betaglicano humano fue insertado en un plásmido vector de expresión, después del Asp781 (el último residuo de la región extracelular) tiene una cola de hexahistidina seguida de un codón de paro. El cDNA de betaglicano de rata se usó como plantilla para la construcción del cDNA mutante de  $\Delta 10$ , éste último fue obtenido eliminando los aminoácidos 410-853 utilizando sitios únicos para endonucleasas de restricción presentes en la secuencia del cDNA. La mutante  $\Delta 11$  ( $\Delta 45$ -409 y  $\Delta 783$ -853) fue construida a partir de la mutante  $\Delta 8$  ( $\Delta 45$ -282). Los cDNAs se usaron para generar baculovirus recombinante para luego infectar células High Five. Después de dos días de infección, las proteínas recombinantes solubles el hrBGs se purifican a partir del medio condicionado usando cromatografía de afinidad a metales inmovilizados (IMAC) usando sefarosa quelante de flujo rápido (Amersham Pharmacia Biotech, UK). Las fracciones positivas se juntaron y se concentraron en un sistema Amicon de Ultrafiltración (Millipore, Bedford, MA), se dializaron contra amortiguador de fosfatos con 1% (v/v) de glicerol y PMSF 1mM y se almacenaron a -70°C. [17]

**Inmunización:**

Mezclar el antígeno con el adyuvante Completo de Freund (Sigma Aldrich Co.) a una proporción 1:1 de volumen, considerando que el volumen administrado no debe exceder 200µl. Inyectar intraperitonealmente 30 µg de antígeno por ratón, repitiendo el proceso cada 7 días por 3 semanas. Sacrificar los ratones 10 días después de la última inmunización. Utilizar 5 machos Balb/c de 7 semanas, sangrar 2 como control de suero pre-inmune.

**Fusión:**

Hacer sangrado retro- orbital al ratón, sacrificar y sanitizar para luego obtener el bazo en condiciones de esterilidad para luego disgregar en un tamiz de tela de organza de 5 x 5cm previamente esterilizado. Resuspender las células en 50 ml de RPMI 1640 complementado con todo excepto SFB.

Usar 4 botellas de 25cm<sup>2</sup> confluentes al 75% con el mieloma Sp2/O-Ag8, lavar tres veces con RPMI sin SFB. Para el último lavado juntar con los esplenocitos. Centrifugar la mezcla de células y resuspender el botón golpeando suavemente las células. Agregar 1ml de PEG (PEG 1300-1600 Sigma, diluido al 43% con RPMI, pH 7.5) gota a gota durante 1minuto y luego resuspender muy suavemente sólo una vez con la micropipeta de 1000µl. Adicionar gota a gota y agitar suavemente 5ml de RPMI sin SFB en 3 minutos y 12 ml en un minuto. Después centrifugar a 600 rpm por 10 minutos. Resuspender en 20 ml de RPMI con 15% de SFB y HAT a partir del stock comercial 50X. Sembrar 200µl por pozo en una placa de 96 por 10 días, después dejar 5 días más sin aminopterina (HT). Para seleccionar qué células se expandirán, los medios condicionados y se prueban en ELISA.

**Clonación:**

Poner 100µl de RPMI 1640 complementado en una hilera de pozos de una placa de 96. Tomar 100µl de medio con células del pozo que dio señal positiva por ELISA y se depositar en A1, posteriormente hacer diluciones dobles hasta llegar a A12 y dejar hasta el día siguiente. Seleccionar el pozo que tenga aproximadamente 30-40 células, tomar con la micropipeta y diluir con 18ml de medio. Y entonces repartir en el resto de la placa, poniendo 200µl por pozo. Una vez que hayan proliferado tomar una muestra de sobrenadante para probar por ELISA y determinar en qué pozo hay células productoras de anticuerpo que reconozcan hrBGs. Una vez identificados uno o más pozos positivos, se repite el proceso descrito –subclonación- para asegurar que sólo está creciendo una clona por pozo.

### **Obtención de ascitis en ratón:**

A partir de una botella confluyente de hibridoma, tomar  $5 \times 10^6$  células (por ratón que se vaya a usar). Centrifugar y resuspender en un volumen máximo de 500  $\mu$ l de PBS estéril. El ratón es inyectado intraperitonealmente con las células y dejado entre 15 y 20 días, hasta que el tumor se haya desarrollado. Los ratones fueron entonces sacrificados y en condiciones de esterilidad fue recuperado el líquido de ascitis, centrifugado a 1200 r.p.m. por 10 minutos y alicuoteado para finalmente ser preservado a  $-20^{\circ}\text{C}$ . Las células obtenidas se congelaron con SFB 40%-RPMI 1640 50% y 10% de DMSO (Dimetil Sulfoxido).

### **ELISA:**

Preparar una solución de  $5\mu\text{g/ml}$  de hrBGs en buffer de carbonatos  $0.1\text{M}$  pH 9.6. Usar  $100\mu\text{l}$  de esta solución por pozo en una placa de 96 (Nunc-Immunoplate Maxi Sorp) y dejar toda la noche a  $4^{\circ}\text{C}$ . Lavar tres veces con  $200\mu\text{l}$  de solución de lavado ( $50\text{mM}$  Tris-HCl pH 8,  $150\text{mM}$  NaCl y  $0.05\%$  de Tween 20). Poner  $200\mu\text{l}$  por pozo de solución de bloqueo ( $50\text{mM}$  Tris-HCl pH 8,  $0.5\%$  de gelatina y  $0.2\%$  de Tween 20) y dejar 2 horas a  $37^{\circ}\text{C}$ , para luego lavar 3 veces con  $200\mu\text{l}$  la solución de lavado. Poner  $100\mu\text{l}$  de anticuerpo primario (ya sean medios condicionados, ascitis o antisuero#822) concentrado o en solución diluyente ( $50\text{mM}$  Tris-HCl pH8,  $500\text{mM}$  de NaCl,  $0.05\%$  de Tween 20 y  $0.1\%$  de gelatina) y dejar 1 hr a  $37^{\circ}\text{C}$ . Lavar 3 veces con  $200\mu\text{l}$  de solución de lavado. Poner  $100\mu\text{l}$  de anticuerpo secundario diluido 1:5000 (acoplado a HRP, ya sea anti IgG + IgM ratón o anti IgG de conejo) en solución diluyente e incubar por 1hr a  $37^{\circ}\text{C}$ . Lavar 3 veces con  $200\mu\text{l}$  de solución de lavado. Para revelar usar una tableta de  $5\text{mg}$  de ortofenilendiamina, también conocida por sus siglas en inglés como OPD (Immuno Pure OPD tablets, Pierce) disuelta en  $9.5\text{ml}$  de buffer de citratos  $0.1\text{M}$  pH 5.0 y  $100\mu\text{l}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$  al  $30\%$ . Una vez que ha dado color la reacción, parar con  $50\mu\text{l}$  de ácido sulfúrico  $4\text{N}$  y leer la placa a  $450\text{ nm}$ .

## **Western Blot:**

Se hicieron minigeles (Bio-Rad) de acrilamida-bisacrilamida al 8.5% (ver apéndice) y se corrieron a 90V por 2hr; antes de que salga el frente de corrida se sacaron y se dejaron equilibrar 5 minutos en buffer de transferencia (ver apéndice). Se transfirió en membranas de PVDF (Immobilon-P, Millipore) con amperaje constante de 500 mA por 180 minutos.

Dejar secar la membrana 10 minutos. Para luego sumergir 15 segundos en metanol, 2 minutos en agua y finalmente bloquear al menos 1 hora en TBS-Tween 20 al 0.01%-leche descremada al 5% (Difco). Luego lavar la membrana en TBS-Tween. El anticuerpo primario se diluyó en TBS-Tween con leche al 1%. (Las ascitis se usaron 1: 2000 y el antisuero 1: 5000). Dejar 45 minutos el anticuerpo y lavar exhaustivamente con TBS-Tween en el agitador orbital.

Los anticuerpos secundarios (uno anti-conejo y el otro anti-ratón, acoplados a HRP) se diluyeron en TBS-Tween 1:5000 y las incubaciones fueron de 30 minutos. Para después lavar perfectamente con TBS-Tween (ver apéndice) [45]. Para revelar, se usó el reactivo ECL Plus de Amersham Biosciences, fijador y revelador de Kodak.

## **Marcado por afinidad:**

Crece en monocapas las células correspondientes a las líneas HepG-2, LM13, dm10 y BG22. Las primeras son hepatocitos humanos que expresan betaglicano humano. Las otras 3 son mioblastos de rata incapaces de expresar el betaglicano, pero que fueron transfectadas establemente con un vector que permite sobreexpresar betaglicano de rata sin GAGs (dm10) o completo (BG22); las LM13 fueron transfectadas con un vector vacío. Usar cuando alcanzan 80% de confluencia. Mantener siempre en hielo y todas las soluciones deben estar frías. Lavar 2 veces con KRH-BSA. (ver apéndice)

Centrifugar el  $^{125}\text{I}$ -TGF- $\beta$ 2 (yodinado en el laboratorio [25]) a máxima velocidad un minuto y tomar el necesario para obtener la concentración de 100pM en KRH-BSA, en un volumen suficiente para cubrir todas las cajas. Guardar 50  $\mu\text{l}$  para al final medir cuentas iniciales. Incubar a 4°C en agitación lenta por 2.5-3 horas. Lavar 3 veces con KRH-BSA y lavar dos veces con KRH

Usar la solución entrecruzadora (ver apéndice) preparada justo al momento y dejar 15 minutos agitando suavemente a 4°C, su función es hacer enlaces covalentes entre el ligando y el receptor. Lavar las células con STE-PMSF (ver apéndice). Añadir 10ml de STE-PMSF y se colectar las células, para luego centrifugar 10 minutos a 1,500 r.p.m. a 4°C y quitar el sobrenadante. Añade el buffer de lisis al pellet, (el TTE con cóctel de inhibidor de proteasas, más pepstatina y PMSF (ver

apéndice) y pasar a un tubo de 1.5ml, donde se agita suavemente 30 minutos más a 4°C. Centrifugar 15 minutos a 14,000 r.p.m. y poner el sobrenadante en tubos para medir cuentas. Una vez obtenida la lectura, determinar la concentración de proteína con reactivo de Bradford, hacer alícuotas de 100 microgramos y congelar, cada alícuota se usó para una inmunoprecipitación. [30]

### **Inmunoprecipitación:**

Los lisados celulares marcados con  $^{125}\text{I}$ -TGF- $\beta$ 2 son diluídos con buffer de Tris 10mM pH 7.4, 1% de NP40, EDTA 1mM y 1mM de PMSF hasta tener un volumen final de aproximadamente 500  $\mu\text{l}$ . Según el caso, cada condición experimental se hizo con 100 $\mu\text{g}$  de extracto total, 10  $\mu\text{l}$  de ascitis o 1  $\mu\text{l}$  de antisuero y 10  $\mu\text{l}$  de proteína-A sefarosa o proteína G-sefarosa. Una vez mezclados el lisado, el anticuerpo primario y la sefarosa en tubos de 1.5ml, agitar lentamente a 4°C toda la noche. Al día siguiente centrifugar los tubos a 14,000 r.p.m. durante 10 minutos. Como la sefarosa forma un pellet translúcido, desechar el sobrenadante con cuidado. Poner 1.5ml de buffer de lavado (PBS-Tritón 0.1%- SDS 0.02%) a cada tubo, resuspendiendo suavemente el pellet y centrifugar. Repetir el proceso 2 veces más. En el último lavado, quitar el sobrenadante y resuspender el pellet en 25  $\mu\text{l}$  de buffer de muestra con DTT (ver apéndice) para luego hervir los tubos por 5 minutos y cargar minigeles de acrilamida-bisacrilamida al 8.5%. Correr a 90V por 2 horas y teñir con azul de Coomassie (ver apéndice).

### **Digestión de betaglicano con plasmina:**

Incubar 10  $\mu\text{g}$  de hrBGs con 2 $\mu\text{l}$  de plasmina humana (5 U/ml, Roche) en un volumen final de 200 $\mu\text{l}$  de:

NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	100mM	
NaCl	150mM	con pH 6

Incubar a 30°C a diferentes tiempos para hacer una cinética, parar la reacción con 1mM de PMSF. Correr 400ng en un gel, para luego teñir con plata (ver apéndice) y el resto usar en WB.

## Resultados y Discusión

En experimentos previos del laboratorio se generaron 13 hibridomas, cuyos medios condicionados resultaron ser positivos contra el hrBGs en ensayos de ELISA. En este trabajo se presentará una caracterización completa de algunos de estos anticuerpos.

Para simplificar su manejo se les asignó un nombre corto como se aprecia en la tabla 2.

Nombre Corto	Hibridoma		
A	5A6 D	/D3	/B11
B	5A6 D	/D3	/B3
C	5A6 D	/D3	/D3
D	5A6 D	/D3	/B5
E	5A6 D	/F3	/G3
F	3B3 O	/C9	/B10
G	4H7 D	/D4	/B5
H	2D2	/E3	/E4
I	2D2 D	/E3	/C11
J	2D2 D	/E3	/D3
K	2D2 D	/D6	/C7.F7.G5
L	2D2 D	/D6	/A2 /D2
M	5A6 O	/C6	

Tabla 2. **Lista de hibridomas positivos para betaglicano.**  
El último (M) no fue trabajado, pues le faltó ser subclonado; por lo que quizá no se trate de un cultivo monoclonal.

Como se podrá observar en la tabla 2, es probable que varios de los hibridomas en realidad se traten del mismo, debido a que provienen del mismo pozo. Tal sería el caso de los hibridomas A, B, C, D, E y M; obtenidos a partir de la placa 5 y el pozo 6D e incluso cuatro de ellos (A-D) se subclonaron a partir del pozo D3.

De hecho es más factible que al momento de la clonación o de la subclonación células idénticas se hayan sembrado en diferentes pozos, a que se hayan tenido dos o más hibridomas distintos y positivos para el antígeno por coincidencia en el mismo pozo después de la fusión.

Una vez subclonados los hibridomas, no todos proliferaron bien *in vitro*; por lo que se decidió inyectarlos intraperitonealmente en ratones de la cepa Balb/c (hembras de más de 6 semanas) para así generar líquidos de ascitis. A partir de las ascitis se separaron las células y éstas se congelaron, mientras los sobrenadantes se guardaron por su abundancia de anticuerpo. Este fue el caso de los hibridomas F, G, I y K; de los cuales los dos últimos podrían ser el mismo. Del resto de los hibridomas, se guardaron mayores cantidades de medios condicionados y no fue necesario producir líquidos de ascitis.

Por lo tanto, al inicio de la caracterización se tenían 13 medios condicionados del cultivo de hibridomas, 4 líquidos de ascitis y varios viales de células congeladas correspondientes a cada hibridoma.

Tanto para la inmunización como para los experimentos se utilizaron diferentes lotes de hrBGs, sin embargo su integridad fue minuciosamente supervisada al momento de su purificación. Aún así antes de iniciar cualquier experimento, se hizo un SDS-PAGE para rectificar que el betaglicano humano soluble recombinante (hrBGs) que se usará para probar afinidad y especificidad de los anticuerpos se encuentra íntegro (Figura 9) Se aprecia una banda principal de aproximadamente 120KDa que corresponde al peso de la proteína sin GAGs. Las bandas difusas de menor peso corresponden a productos de degradación, siendo más evidentes en el carril 5 porque se cargó más proteína, sin embargo siempre se han observado y este hecho no ha interferido para los ensayos en que se a usado previamente [25]. Posteriormente se hicieron alícuotas de 10 $\mu$ l y se conservaron a -20°C, procurando no descongelarlas más de tres veces para evitar su degradación.

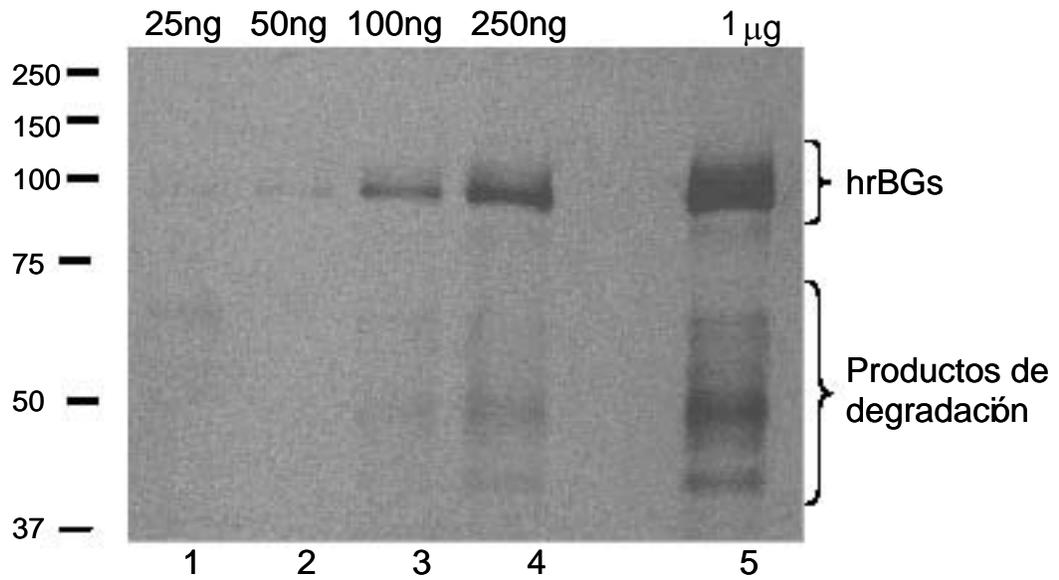


Figura 9. **SDS-PAGE para comprobar la integridad del hrBGs**  
 En un gel de acrilamida al 8.5% se cargaron las cantidades de proteína indicadas en la parte superior de la figura y se tiñó con plata. El peso molecular corresponde a los aproximadamente 120KDa esperados para el hrBGs. Las bandas adicionales que se aprecian sobre todo en el carril de un microgramo corresponden a productos de degradación y algunas de ellas podrían comprender los dos dominios del betaglicano: el semejante a la endoglina y el semejante a la uromodulina.

## **Verificación de medios condicionados de los hibridomas positivos vs. hrBGs en ELISA**

El paso inicial de la caracterización fue verificar que los medios condicionados almacenados efectivamente dieran señal en ELISA, para después poder proceder con otro tipo de ensayos funcionales.

En la figura 10 se observa que se probaron sólo doce de los trece medios condicionados de los hibridomas, debido a que el último no fue subclonado y quizá se trataba del mismo anticuerpo producido por los hibridomas A al D.

La respuesta de la mayoría de los anticuerpos no fue la que se esperaba, pues los sobrenadantes teóricamente debían tener un buen título de anticuerpo además que se usaron sin diluir. Este problema podría deberse a que no se almacenaron apropiadamente o a que quizá la concentración de anticuerpos no era muy elevada. El control positivo empleado fue el antisuero #822 [30] que, por su naturaleza policlonal, reconoce varios epítopes de la proteína, dando así mayor señal con el anticuerpo secundario. El control negativo consistió en poner antígeno en la placa y anticuerpo secundario, sin anticuerpo primario.

Los que parecieron dar una mejor señal, los cuatro últimos: F, G, I y K, se concentraron por medio de centrifugación a alta velocidad combinada con una membrana que deja pasar las moléculas con peso molecular inferior a 10KDa (Centricon, de Millipore) para ser probados nuevamente. (Figura 11). Aprovechando que de cuatro de los hibridomas se tenían líquidos de ascitis, fue conveniente usarlos y así comparar su señal con la de los medios condicionados.

Si bien las ascitis se utilizaron sin diluir, el resultado fue mucho mejor respecto al de los medios condicionados. Dado que la respuesta de los sobrenadantes fue incluso menor que en el experimento anterior (habían sido los que mejor respondían y ahora ni siquiera rebasaron la barra del control negativo, donde también se puso anticuerpo secundario y sin ningún primario); podía sugerirse que el problema no era la falta de interacción del anticuerpo con el antígeno, sino que algo había ocurrido con el anticuerpo al momento de su preservación. Si se observa el caso de los hibridomas I y K, es mucha la diferencia entre usar ascitis o medio condicionado, y aunque se trata del mismo anticuerpo, parece ser que la diferencia más significativa es su concentración.

Sin embargo, cabía la posibilidad de que el pH de los medios condicionados no fuera el adecuado para que los anticuerpos interactuaran adecuadamente con el antígeno; por lo que se les elevó el pH con buffer de Tris pH 8.0, pero así tampoco se consiguió una señal satisfactoria. Fue entonces que se decidió concentrarse en trabajar con las ascitis, para lo cual sería necesario generar más.

## **Producción de medios condicionados y ascitis de hibridomas seleccionados**

En vista de que las ascitis almacenadas de los hibridomas F, G, I y K fueron positivas en la ELISA mostrada en la figura 10, se procedió a descongelarlos para así producir más. El hibridoma C se descongeló porque al momento de su selección fue uno de los que dio mejor señal, pero no había garantía de que también fuera a producir ascitis. Para evitar el riesgo de contaminar los hibridomas durante su cultivo, se optó por descongelar en un inicio sólo 2 de ellos.

Como la producción de ascitis implica crecer un tiempo las células en cultivo, también se estaban obteniendo medios condicionados frescos. Así que pensando en que las ELISAs anteriores no dieron muy buena señal porque los sobrenadantes no se hubieran preservado apropiadamente o que los anticuerpos se hubieran dañado al momento de descongelar, se procedió a repetir un ensayo (figura 12) con medios condicionados recién tomados del cultivo. Los resultados no fueron los esperados: el hecho de que a las distintas concentraciones la señal sea tan similar entre sí y respecto al control negativo, no parece indicar que los medios condicionados contengan anticuerpo. Confirmando de esta manera, que lo más adecuado para llevar a cabo la caracterización de los anticuerpos será trabajar con las ascitis.

Aunque en principio se expandieron 5 hibridomas, sólo 4 de ellos formaron líquido de ascitis. Sólo uno de los hibridomas, el F, produjo abundante ascitis (mínimo 5ml por ratón) y prácticamente nada de tumor sólido. Con el G, I y K sólo se recuperaban entre 2 y 3 ml de ascitis por ratón y alrededor del 20 – 30% de los ratones ni siquiera generaba tumor líquido, sino sólido (dato que corresponde con el hecho de que podrían tratarse de un mismo hibridoma). Del hibridoma C definitivamente no pudo colectarse ascitis, ya que todos los ratones desarrollaron tumores sólidos. No se sabe muy bien de qué dependa que algunos hibridomas generen ascitis mientras otros no, lo que sí se sabe es que no hay mucho que se pueda hacer al respecto. Así que nos quedamos con sólo 4 ascitis para probar en los ensayos posteriores.

Una vez obtenidas las cuatro ascitis con las cuales se iba a trabajar, lo primero que se hizo fue probarlas en ELISA (Figuras 13, 14, 15 y 16) sin diluir (SD) y con diluciones seriadas de 1:3, y que por tanto van desde 1:3 hasta 1:243; además de compararlas con la ascitis de un hibridoma productor de un anticuerpo monoclonal contra una proteína distinta al BG (antígeno de *Clamidia sp.*) y que servirá como control negativo de los experimentos en lo sucesivo. Esta serie de ensayos son importantes porque nos dan una idea de la afinidad de cada uno de estos anticuerpos. La señal observada es debida a que la interacción de los anticuerpos con el betaglicano es estable, de lo contrario con cada lavado estaríamos perdiendo anticuerpo primario.

En la figura 13 se muestra que la ascitis F es el que da mejor señal, lo cual podría deberse a que tuviera una mayor concentración de anticuerpos o que su afinidad fuera mayor, sin embargo ésta no fue determinada para ninguno de los anticuerpos caracterizados en el presente trabajo. Incluso a la más baja dilución su señal es más alta que el control sin anticuerpo. A pesar de que esta dilución (1:243) pudiera dar una señal semejante a la de la ascitis usada como control negativo sin diluir, esta última tiene 243 veces más anticuerpo y ese poco reconocimiento se debe más a la abundancia de anticuerpo que a la especificidad del mismo. En las figuras 14 y 15 se observa que las ascitis G e I presentan un comportamiento muy similar al irse diluyendo, dando buena señal hasta 1:81, pues ya en las siguientes diluciones se alcanzan los valores del control negativo. Finalmente, la ascitis K (ver figura 16) no parece muy eficiente: diluyendo 1:9 en adelante la señal prácticamente se pierde, sugiriendo que su afinidad no es muy alta.

Se ha visto que cuando se usan grandes cantidades de anticuerpo, éste se unirá a proteína(s) presente(s) y no porque sea específico de ésta(s). Este fenómeno es más evidente cuando también se usa un exceso de proteína. Seguramente esto ocurre con el control negativo, que pareciera dar señal, pero no es más que ruido de fondo. Como se mencionó, una ascitis tiene hasta 20mg/ml de anticuerpo y en las ELISAS se usan aproximadamente 500ng de betaglicano por pozo, y en cuanto se empieza a diluir la señal alcanza los valores del control negativo (sin anticuerpo primario).

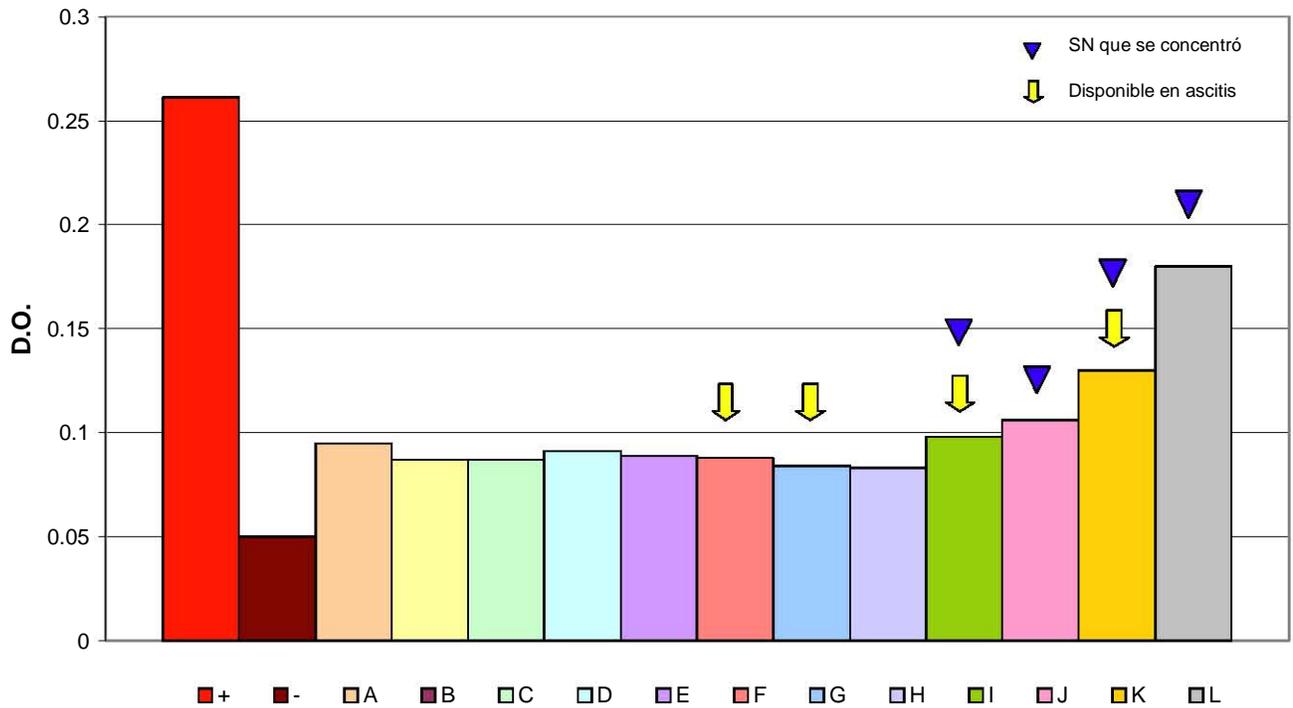


Figura 10 **ELISA con sobrenadantes de hibridomas positivos para BG.**

En las primeras dos columnas se muestran los controles positivo y negativo respectivamente (éste último es anticuerpo secundario sin el primario), seguidos los 12 medios condicionados obtenidos a partir de 12 de los 13 hibridomas de la Tabla 2. Para éste y todos los experimentos el control positivo es un antisuero contra betaglicano generado en conejo, el #822, usado 1:300. Para el control negativo no se usa ningún anticuerpo primario. El anticuerpo secundario, también en éste y los sucesivos experimentos, se usa 1:5000. Las flechas indican los hibridomas que se tenían disponibles como líquidos de ascitis, mientras las puntas de flecha señalan los medios condicionados que se concentraron.

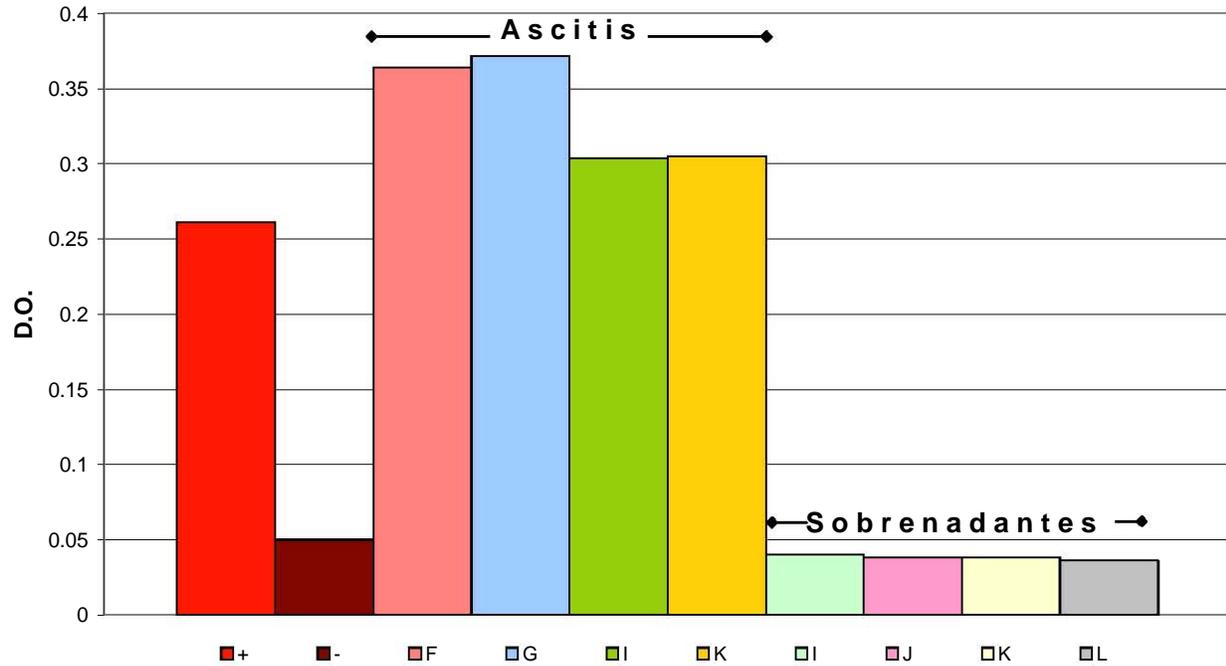


Figura 11 **ELISA con ascitis disponibles y sobrenadantes concentrados.**

En este ensayo se probaron las 4 ascitis que se tenían, ya que no se hicieron para todos los hibridomas; junto con cuatro sobrenadantes concentrados en tubos Amicon (Millipore) y cuyo pH fue neutralizado con buffer de Tris pH8.0

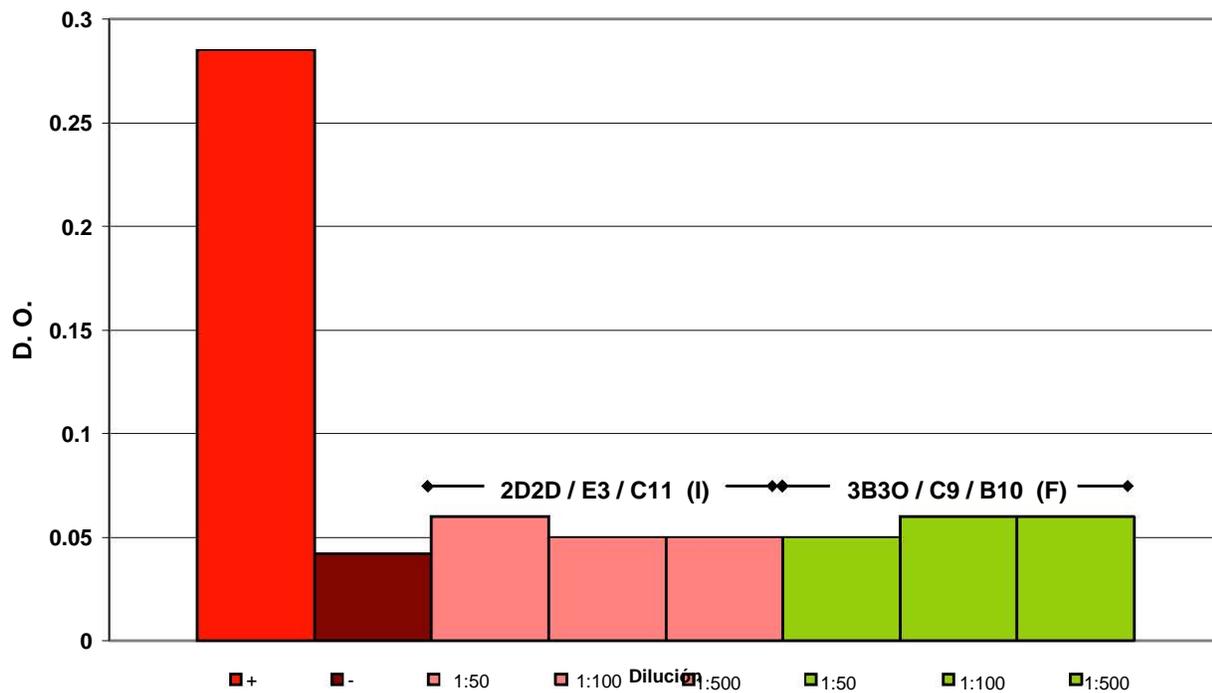
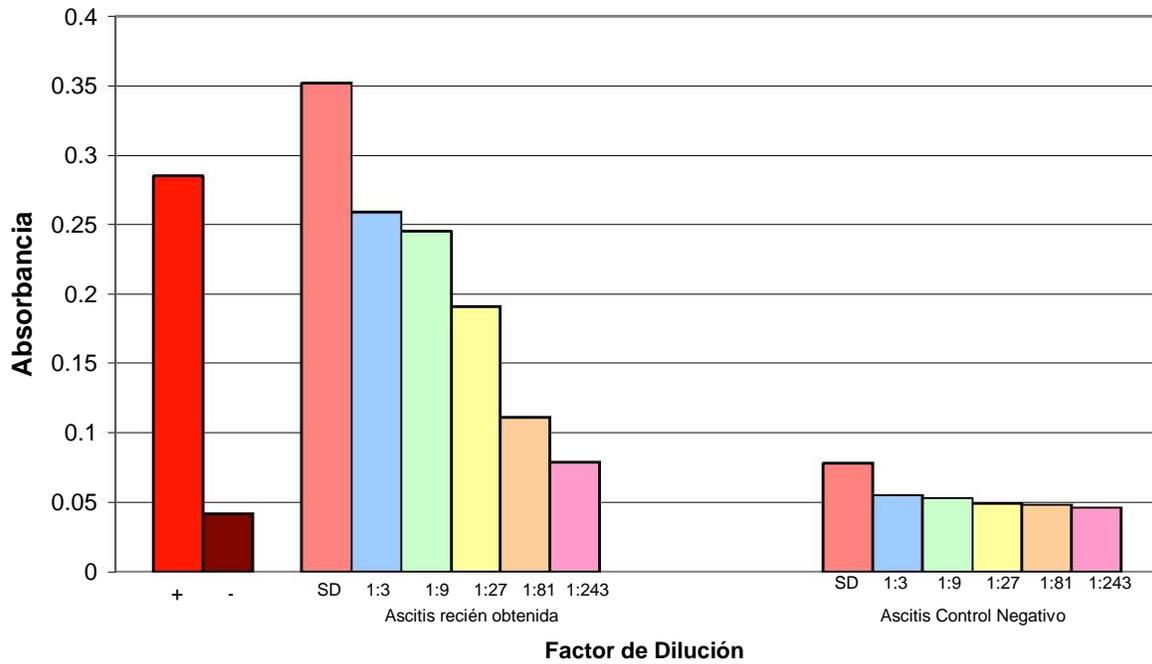


Figura 12 **ELISA con sobrenadantes recién obtenidos.**  
 Se obtuvo medio condicionado fresco cuando se expandieron los hibridomas para generar más ascitis, aunque se diluyeron serialmente, la señal no fue buena



**Figura 13. ELISA de ascitis del hibridoma F comparada con control negativo**

Junto con los controles positivo y negativo que ya se venían trabajando, éste ensayo incluye un nuevo control negativo: una ascitis generada contra una proteína que no es hrBGs. Ambas ascitis se usaron sin diluir (SD) y se diluyeron serialmente de 1:3 hasta 1:243

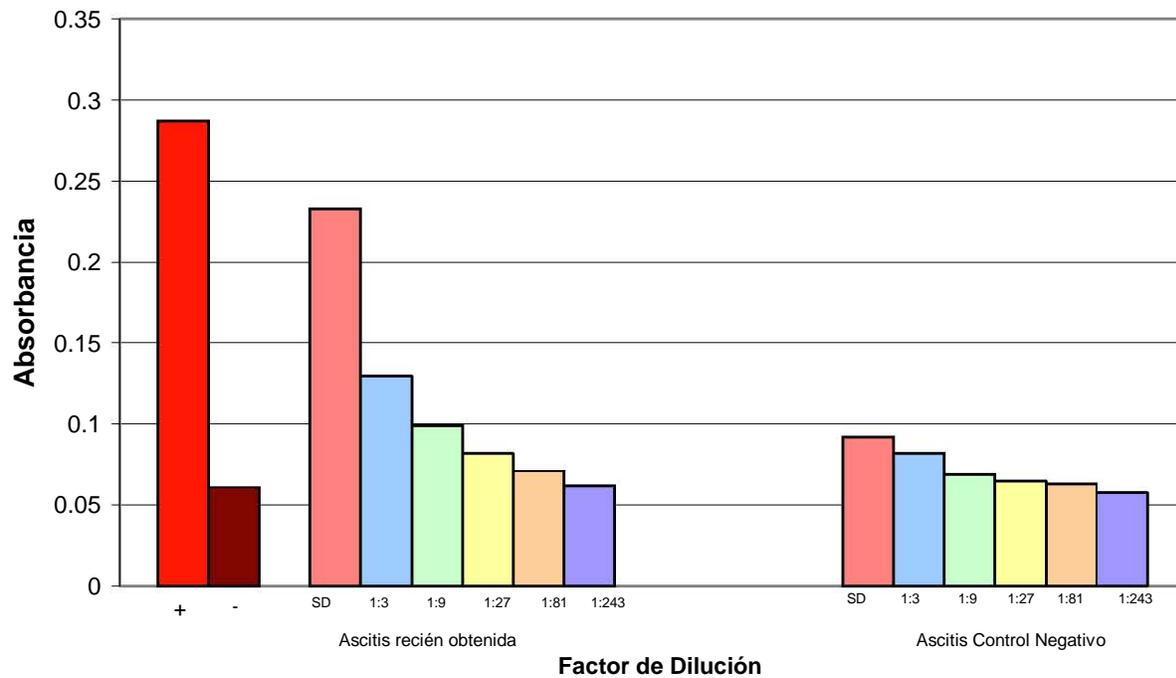
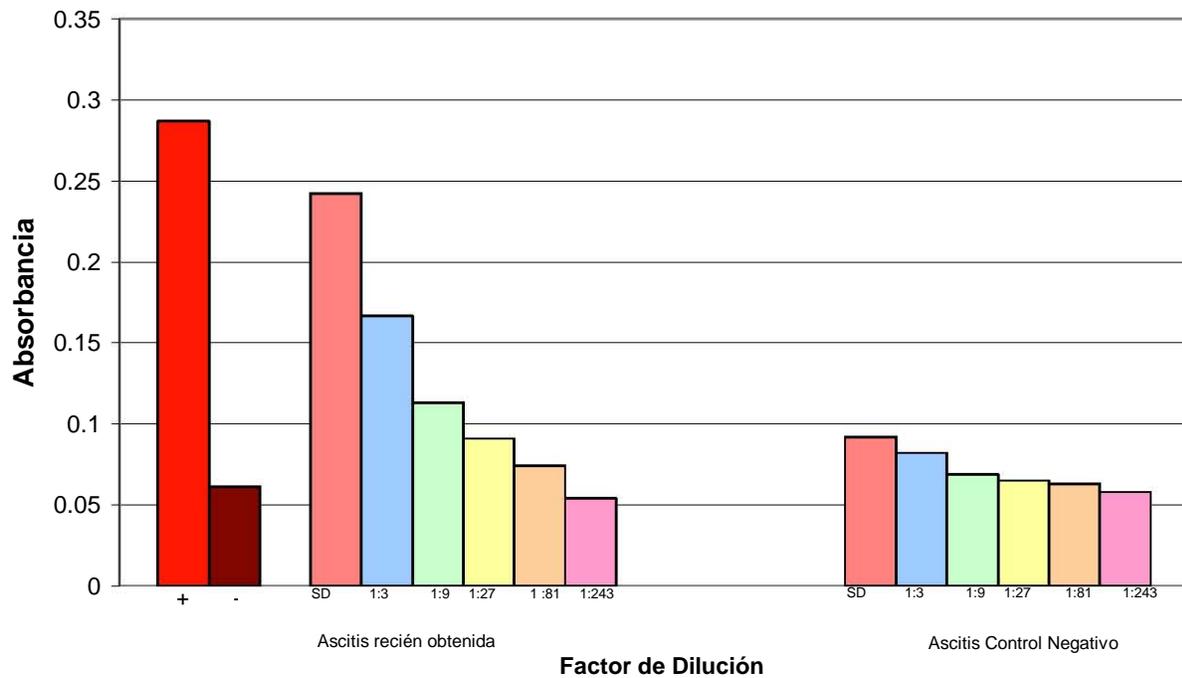


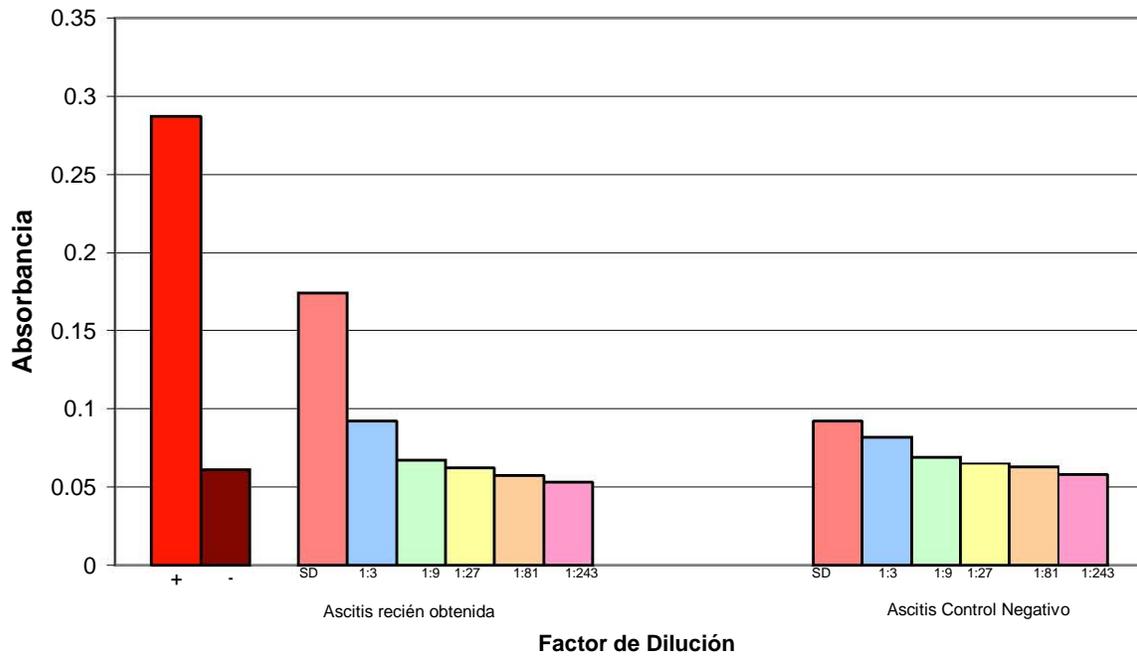
Figura 14. **ELISA de ascitis del hibridoma G comparada con control negativo**

Junto con los controles positivo y negativo que ya se venían trabajando, éste ensayo incluye un nuevo control negativo: una ascitis generada contra una proteína que no es hrBGs. Ambas ascitis se usaron sin diluir (SD) y se diluyeron serialmente de 1:3 hasta 1:243



**Figura 15. ELISA de ascitis del hibridoma I comparada con control negativo**

Junto con los controles positivo y negativo que ya se venían trabajando, éste ensayo incluye un nuevo control negativo: una ascitis generada contra una proteína que no es hrBGs. Ambas ascitis se usaron sin diluir (SD) y se diluyeron serialmente de 1:3 hasta 1:243



**Figura 16. ELISA de ascitis del hibridoma K comparada con control negativo**

Junto con los controles positivo y negativo que ya se venían trabajando, éste ensayo incluye un nuevo control negativo: una ascitis generada contra una proteína que no es hrBGs. Ambas ascitis se usaron sin diluir (SD) y se diluyeron serialmente de 1:3 hasta 1:243

## Las ascitis reconocen hrBGs en WB

Para verificar que los anticuerpos monoclonales son capaces de reconocer al BG se realizaron ensayos de western blot probando 5 concentraciones distintas de hrBGs (ver figura 17) y las ascitis F, G, I, K. Los ensayos de ELISA, donde las ascitis G e I dieron una señal semejante entre sí y menor respecto a la ascitis F, nos sugirieron que éste último estaba más concentrado; por lo que esperábamos que F diera mejor señal en WB respecto al resto de las ascitis. Como no fue así, es posible que en WB el epítipo reconocido por los anticuerpos de las ascitis G, I y K esté más accesible que el reconocido por los anticuerpos de la ascitis F. Además se muestra en la misma figura que el antisuero detecta hasta 50ng de betaglicano, mientras las ascitis no menos de 100ng. El hecho de que la ascitis G de mejor señal en western blot que en ELISA puede deberse a que en cada ensayo el antígeno se encuentra en un estado diferente: en la ELISA la proteína se adhiere a la placa y en cambio, en el western blot se encuentra desnaturalizada. Quizá sea que de ésta forma queda mejor expuesto el epítipo reconocido por este hibridoma y por eso haya más señal.

Para ver si los anticuerpos monoclonales de las ascitis son lo suficientemente específicos como para identificar al betaglicano a partir de extractos celulares, se realizó otro WB (ver Figura 18). Se utilizaron cuatro líneas celulares: Las células humanas HepG-2 expresan el betaglicano humano; y las LM13, BG22 y dm10 son tranfectantes estables obtenidas a partir de los mioblastos L6E9, incapaces de producir betaglicano endógeno. Las LM13 fueron tranfectadas con un vector vacío y por tanto representan el control negativo. En tanto las dm10 y BG22 sobreexpresan dos variedades de BG de rata: la primera sin GAGs y la segunda con GAGs. Parece haber cierto reconocimiento, pero es completamente inespecífico porque ni siquiera corresponde a proteínas del peso molecular esperado: 120KDa para la proteína sin GAGs y un barrido de entre 200-300 KDa para el BG completo. Esto podríamos explicarlo por el hecho de que a pesar de ser 30  $\mu$ g de proteína, esto es en total, siendo mucho más pequeña la concentración de betaglicano presente. También influye que cuando hay un exceso de proteína los anticuerpos se pegan inespecíficamente. Parece que en el carril 1 (Figura 18), de dm10 donde se usó antisuero como anticuerpo primario, la banda corresponde al betaglicano. Teóricamente debería ser igualmente visible para los carriles 2 y 4, de BG22 y HepG-2 respectivamente, pero no es así. Una posible explicación es que la transferencia de proteoglicanos sea menos eficiente que la de proteínas sin GAGs. La banda que se ve en los extractos de dm10 revelados con antisuero (carril 1) no tiene su contraparte en la membrana revelada con ascitis y ésta última además tiene más ruido de fondo sobre todo en la parte inferior. El hecho de que la banda de peso molecular cercano a 120KDa observable en los carriles 5 y 6 pudiera tratarse de BG se descarta porque la misma banda aparece en el control negativo (carril 7). Por lo que se puede decir que se desconoce la identidad de las bandas que se aprecian en esta figura.

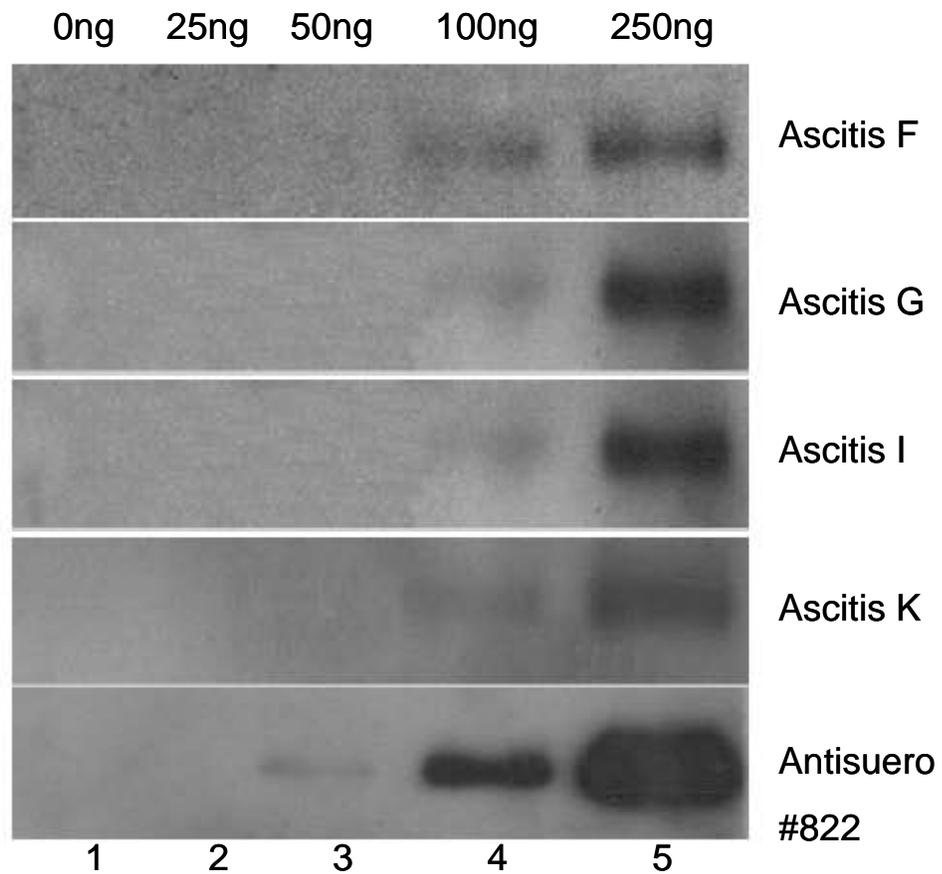


Figura 17 **Western Blot contra diferentes concentraciones de hrBGs para probar ascitis.**  
 En la parte superior se indican las concentraciones usadas de antígeno. Las ascitis se usaron diluyendo 1:2000, el antisuero 1:5000 así como los anticuerpos secundarios (2, uno anti IgG de ratón para la ascitis y otro anti IgG de conejo para el antisuero #822).

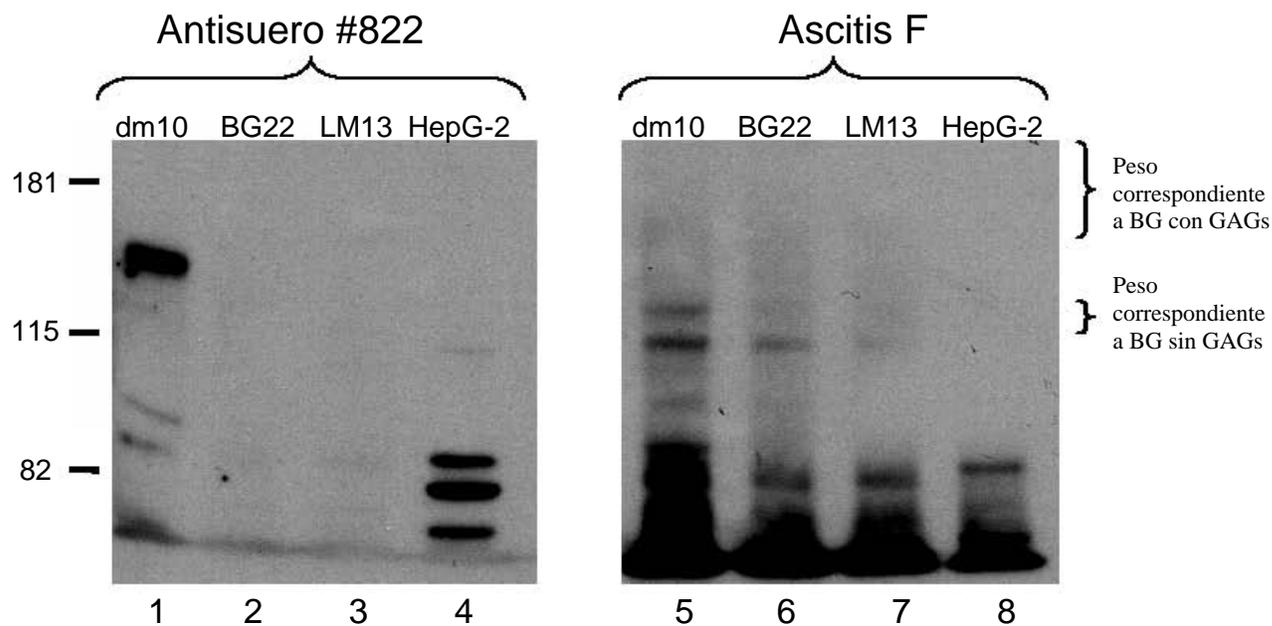


Figura 18 **Western Blot para determinar si la ascitis identifica BG a partir de extractos celulares.**

En la parte superior se muestra qué lisado celular fue cargado en los distintos carriles, de cada uno se pusieron 30 $\mu$ g de proteína total del extracto. Las HepG-2 expresan el BG humano completo, los otros 3 carriles son transfectantes estables originadas a partir de los mioblastos L6E9, incapaces de producir betaglicano endógeno. Las LM13 fueron transfectadas con un vector vacío y son el control negativo. Las dm10 y las BG22 fueron transfectadas con un vector que contiene el gen de betaglicano de rata, pero las dm10 lo producen sin GAGs (core) mientras las BG22 sí lo producen con GAGs (completo). Se emplearon antisuero#822 y ascitis F como anticuerpos primarios. Se indican las regiones donde se esperaba encontrar las bandas correspondientes a BG con y sin GAGs, en el carril

1 se ve una banda muy clara pero su peso es muy elevado para tratarse de BG sin GAGs. En los carriles 5 y 6 aparecen bandas con peso molecular cercano a los 120KDa esperados para el BG sin GAGs, pero el hecho de aparecer tenuemente en el control negativo (carril 7) obliga a descartar que se trate de BG. Se desconoce la identidad de las bandas reconocidas en ambos geles, pues no parecen corresponder a BG.

## **Ninguna ascitis inmunoprecipita BG a partir de extractos celulares**

El WB de la figura 18 sugiere que los anticuerpos monoclonales trabajados no pueden reconocer el betaglicano a partir de extractos celulares, por lo cual se probó si serían capaces de inmunoprecipitarlo. Los líquidos de ascitis son ricos en anticuerpo, no obstante no es la única proteína que contienen. Por lo cual antes de hacer las IP se comparó cuánto anticuerpo hay en la ascitis respecto al antisuero. La clase no se determinó en ese momento, pues como los anticuerpos secundarios son anti IgG o IgM, sólo podría tratarse de alguno de esos dos.

Para determinar la cantidad de anticuerpo en los líquidos de ascitis y en el antisuero se inmunoprecipitaron 1 y 5µl de cada uno y se corrieron en un SDS-PAGE (ver figura 19 panel a). Aunque el producto de la inmunoprecipitación corresponde al peso molecular esperado para las cadenas ligeras y pesadas de las inmunoglobulinas, para comprobar que se trata de anticuerpo y no de otras proteínas con peso similar se hizo un western blot (ver figura 19, panel b), en el cual se corrieron 5µg de ascitis y sólo se reveló con el anticuerpo secundario. Aproximadamente hay 10 veces más anticuerpo en el antisuero que en el líquido de ascitis.

Esta información es de suma importancia para las IP: para estar seguros de que se ponen cantidades equivalentes de anticuerpo tanto de ascitis como de antisuero, descartando así una posible ausencia de respuesta debida al uso desproporcionado de algún anticuerpo. Para los WB no se usan cantidades equivalentes porque, en el caso del antisuero #822 su concentración óptima ya estaba estandarizada [30] y en el caso de las ascitis cada una fue titulada previamente. Las concentraciones usadas son las mínimas necesarias para ver una señal lo más clara con el menor fondo posible, 1:5000 para el antisuero y 1:2000 para las cuatro ascitis.

Se utilizaron las mismas líneas celulares que en el experimento de la figura 18 para hacer marcado por afinidad con <sup>125</sup>I TGF-β2. En este tipo de marcado, una vez que las células han sido incubadas con el <sup>125</sup>I TGF-β2, entonces se lavan y se incuban con disuccimidil suberato (DSS), cuya función es entrecruzar el ligando marcado con el complejo de receptores. No obstante, la eficiencia del DSS es del 10% en el mejor de los casos. Después de lavar nuevamente las células, éstas son lisadas y la proteína total es determinada. Para llevar a cabo inmunoprecipitaciones se tomaron 100µg de proteína total por condición. Se usaron 10 µl de ascitis y uno de antisuero y proteína A-sefarosa. (figura 20). Para demostrar que el BG se marcó adecuadamente se cargaron extractos celulares sin inmunoprecipitar: en ningún caso hay señal de parte de las LM13 (control negativo, mioblastos transfectados con un vector vacío), en el extracto de dm10 se aprecia la proteína medular o “core” de rata (ya que estas células producen el BG sin GAGs). En el carril de BG22 (carril 4) se aprecia el BG completo de rata (con GAGs) y un poco de core, finalmente, en el carril correspondiente a HepG-2 se ve el BG humano completo y menos intenso porque estas células (a diferencia de las anteriores) no

sobre expresan BG. Como se esperaba, el antisuero#822 inmunoprecipitó proteínas de bandas equivalentes a las mostradas en el extracto total (comparar los carriles 11-14 con los 2-5) Desafortunadamente, ninguna de las ascitis logró inmunoprecipitar por sí misma el betaglicano. En la figura 20 se observa que sólo cuando se usaron todas las ascitis juntas (F+G+I+K) el frente de corrida dá un poco más de señal que cuando se usaron por separado. Esto podría ser indicio de una inmunoprecipitación muy leve, ya que ese frente de corrida corresponde a TGF- $\beta$ 2 marcado que fue unido por BG pero, como el entrecruzamiento tiene una eficiencia máxima de 10%, durante la electroforesis se desprendió del complejo que formaba con el betaglicano y los receptores tipo I y II.

Como los anticuerpos monoclonales reconocen sólo un epítope de la proteína, se puede suponer que interactúan en una proporción 1:1; insuficiente para que al unirse a la proteína A-sefarosa, ésta precipite el complejo integrado por Ab-BG-Receptores I y II. Sin embargo este experimento se repitió ahora añadiendo 50  $\mu$ l de ascitis a 100 $\mu$ g de lisado celular con la intención de descartar que la falta de señal se debe a la falta de anticuerpo. En la figura 21 se muestra este ensayo, con extractos de dm10 (carriles 2-8) como control positivo porque sobreexpresan el BG medular o “core” y otro con extractos de LM13 (carriles 10-16) como control negativo pues no expresan BG. En los carriles 2 y 10 se muestran 20 $\mu$ g de lisados totales de dm10 y LM13 respectivamente marcados con  $^{125}$ I TGF- $\beta$ 2. Las IP con antisuero #822 (carriles 3 y 11) confirman la presencia o ausencia del BG. No obstante, tampoco hay respuesta positiva por parte de las ascitis con ninguno de los extractos celulares.

Para descartar que la falta de inmunoprecipitación con las ascitis no se debe a la pobre unión de los anticuerpos hacia la proteína A-sefarosa, se procedió a repetir la inmunoprecipitación (ver figura 22), esta vez sólo con extractos marcados de dm10 y usando proteína G-sefarosa en lugar de la A-sefarosa. Está reportado que la proteína A tiene de media a baja afinidad por los anticuerpos de ratón y alta por los de conejo [44]. La señal resultó muy similar a cuando se usó la proteína A-sefarosa, por lo que esto tampoco logró explicar la falta de señal con las ascitis.

Para las IP la desventaja de los monoclonales frente al antisuero es amplia, ya que en éste hay gran variedad de anticuerpos que reconocen varios epítopes del betaglicano, y aunque no todos sean accesibles, la diversidad lo compensa. En cambio, con los anticuerpos monoclonales contenidos en las ascitis pueden estar ocurriendo dos cosas: que no sea capaz de interactuar con el betaglicano o que sí lo haga, pero como todos los anticuerpos reconocen un solo epítope, no logran pegarse los suficientes como para que las proteínas A o G acopladas a sefarosa “bajen” el anticuerpo.

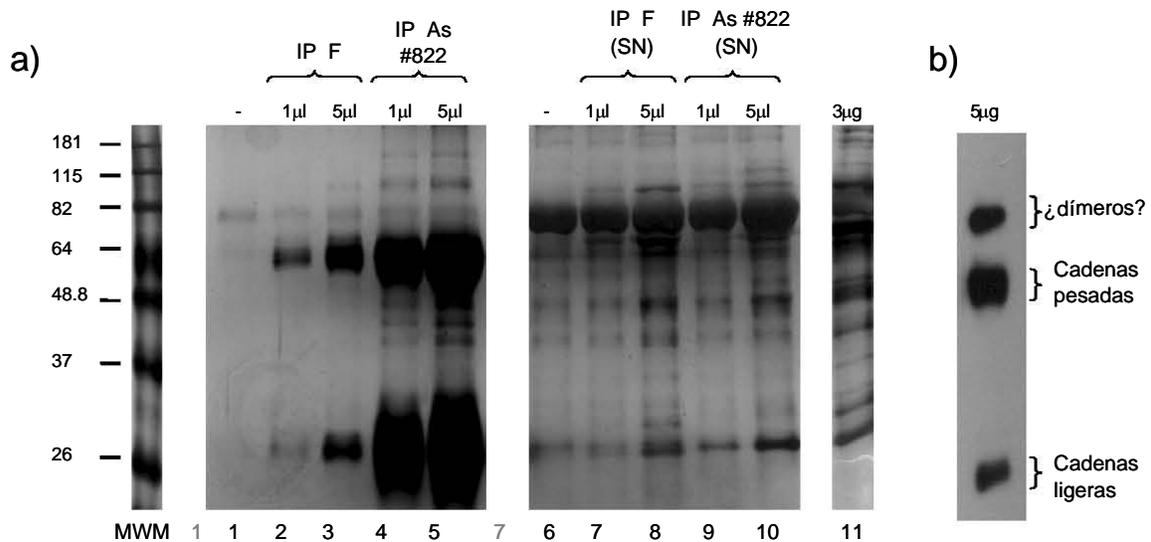
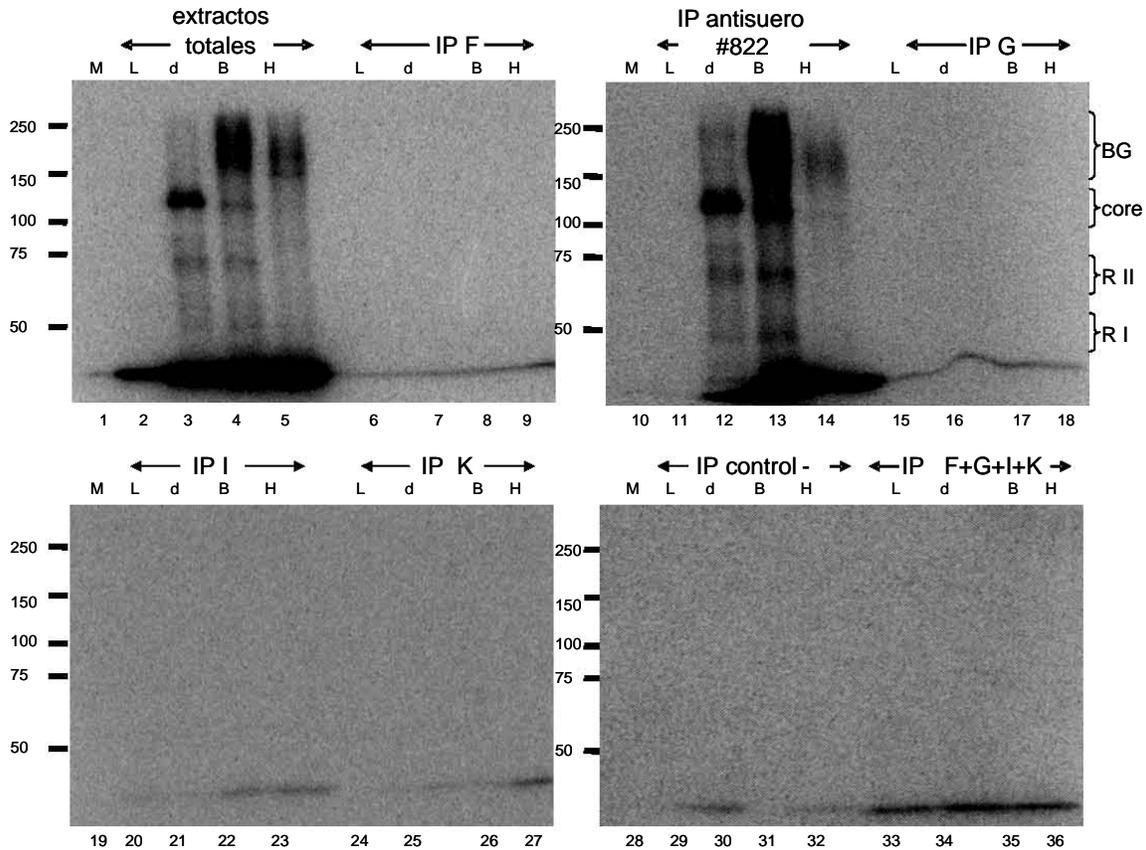


Figura 19 **IP de ascitis y antisuero, WB de ascitis F.**

**a)** Tinción con plata de SDS-PAGE al 12% para mostrar ascitis F y antisuero inmunoprecipitados con proteína A-sefarosa. MWM equivale a marcador de peso molecular. En el carril 1 se muestra un control negativo donde no se puso ascitis ni antisuero. Los carriles 2 y 3 corresponden a la IP de 1 y 5 μl de ascitis, y los carriles 4 y 5 a la IP del antisuero #822. En los carriles 6-10 se cargaron los sobrenadantes correspondientes a las IP de los carriles 1 al 5. En el carril 11 se cargaron 3 μg de ascitis sin purificar. **b)** Western Blot de la IP de 5 μg de ascitis, para revelar sólo se usó un anticuerpo: el anti IgG de ratón acoplado a peroxidasa, que es el usado como secundario en todos los demás experimentos. Se aprecian las cadenas ligeras y pesadas, la banda de hasta arriba podría corresponder a heterodímeros de cadenas pesadas y ligeras que por alguna razón no se separaron durante la electroforesis, ya que su peso es demasiado alto como para corresponder a albúmina.

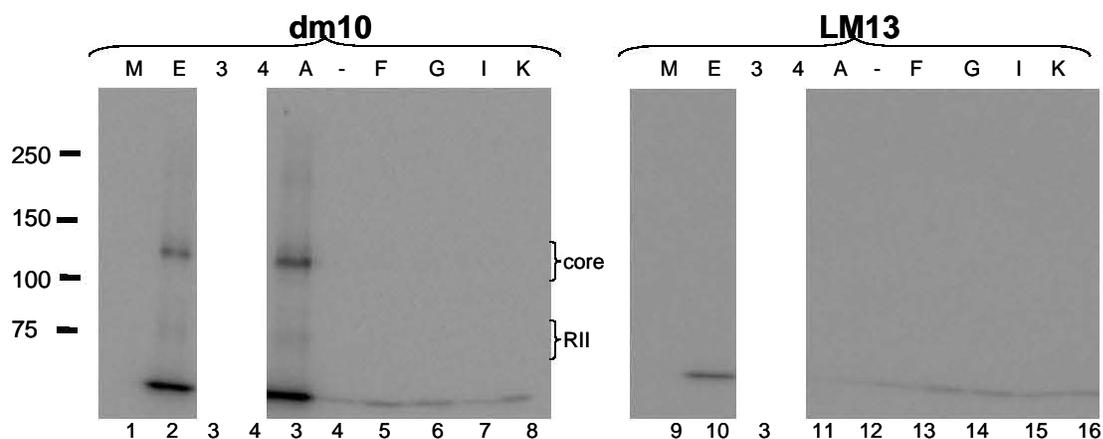


**Figura 20 IP de BG a partir de extractos de células marcadas con  $^{125}\text{I}$  TGF- $\beta$ 2 usando 10  $\mu\text{l}$  de ascitis**

Todos los carriles marcados con la M corresponden al marcador de peso molecular; L, d, B y H a los extractos de células marcadas: LM13, dm10, BG22 y HepG-2 respectivamente, de los cuales se usaron 100microgramos por ensayo. Se usó 1 $\mu\text{l}$  de antisuero y 10  $\mu\text{l}$  de cada ascitis

En los carriles 2-5 se muestra la señal que dan los extractos totales previos a la IP, son 20  $\mu\text{g}$  por carril, se ve cómo en los extractos de LM13 no hay señal, y las bandas más difusas del betaglicano de BG22 y HepG-2 debidas a la presencia de GAGs; mientras en los extractos de dm10 la banda correspondiente al betaglicano es discreta por carecer de GAGs.

Se muestran las inmunoprecipitaciones con antisuero, con las 4 ascitis con que se ha venido trabajando, con una ascitis como control negativo y finalmente la IP combinando los 4 monoclonales. Es precisamente en esta última condición donde parece haber un poco de señal, sin embargo, dada la baja eficiencia del entrecruzador, ésta no logra verse distribuida en bandas como en el caso del la IP con antisuero, donde se ve claramente como bajan además del BG los receptores tipo II y I (de 75 y 55 KDa respectivamente



**Figura 21 IP de extractos marcados, usando 50µl de ascitis**

Se optó por usar 50 µl de ascitis en lugar de 10 con la finalidad de descartar que la falta de señal se debe a la falta de anticuerpo en las ascitis; pero como se observa en esta figura, eso no altera los resultados mostrados esencialmente en la figura 21. En los carriles 3 al 8 se muestran las IP con 100 µg por ensayo de extracto de dm10 marcado con  $^{125}\text{I}$  TGF- $\beta$ 2 como control positivo y en los carriles 11-16 se muestran las IP con 100 microgramos de extracto marcado de LM13 como control negativo. El marcador de peso molecular se muestra en los carriles 1 y 9. En los carriles 2 y 10 se muestran 20µg de extracto celular total previo a las IPs correspondientes a lisados de dm10 y LM13. Las IP se hicieron con antisuero (A), ascitis de control negativo (-), ascitis F, G, I y K respectivamente.

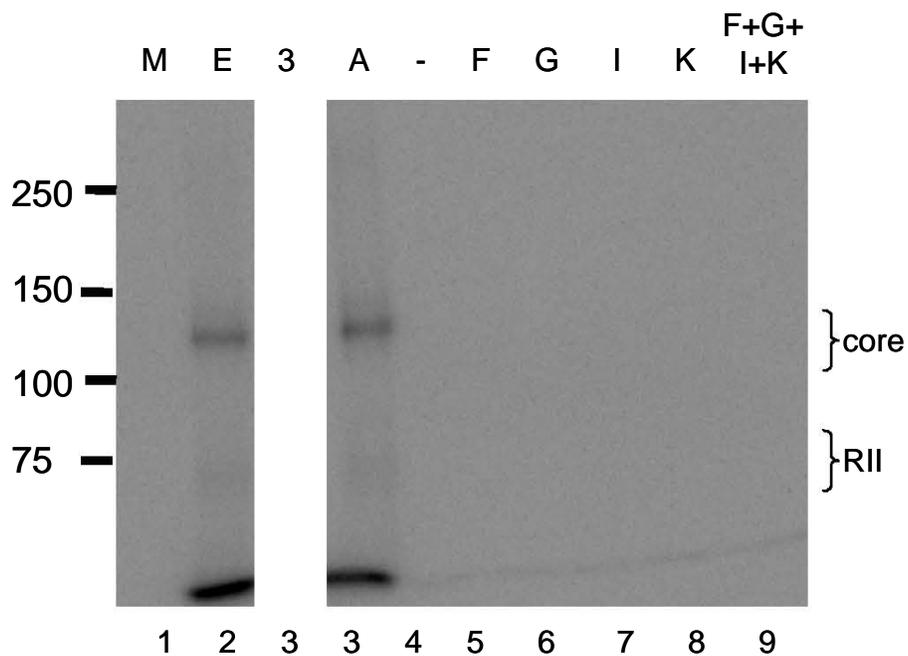


Figura 22 **IP de extractos marcados, usando proteína G-Sefarosa**

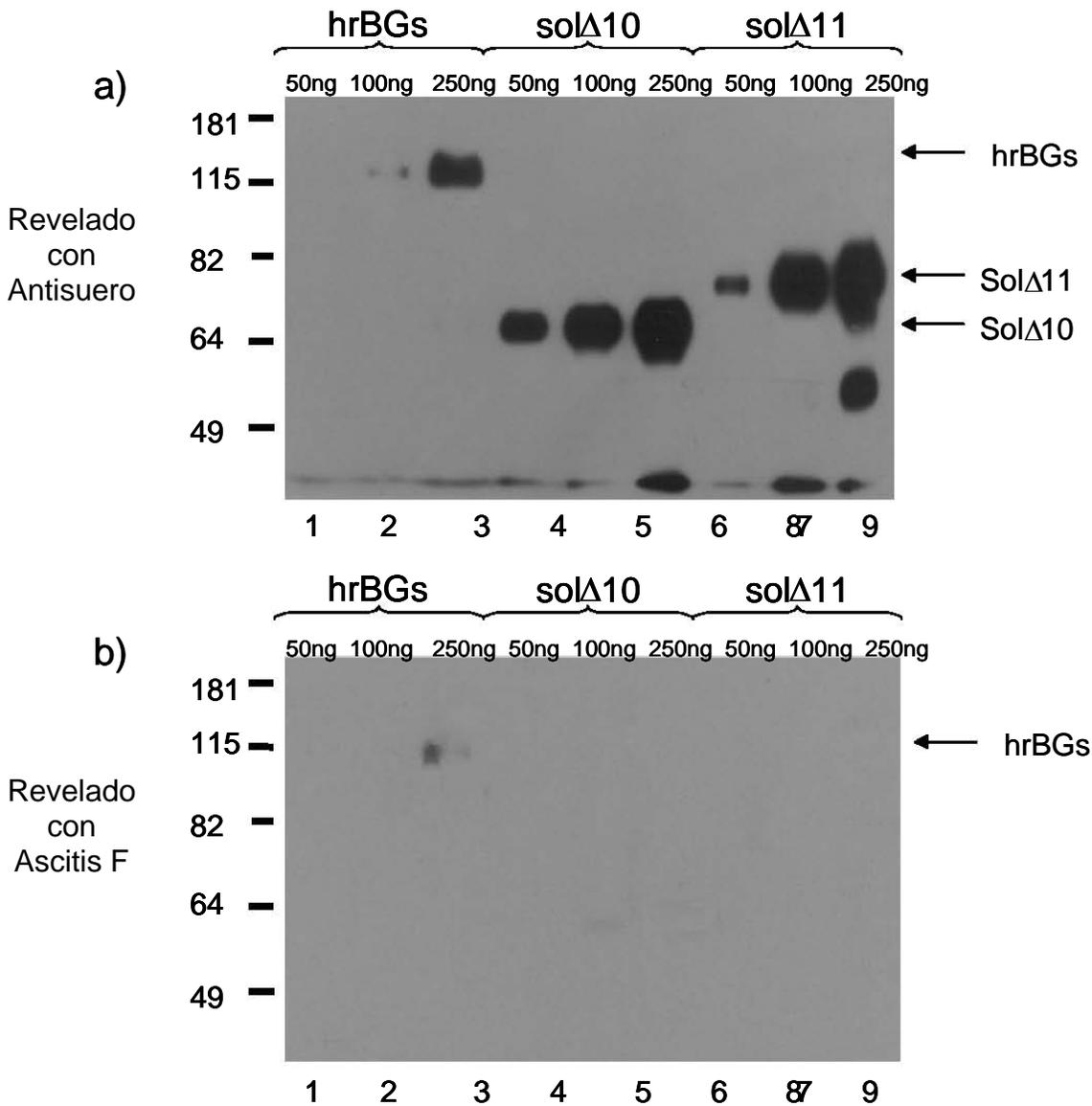
En el carril 1 se muestra el marcador de peso molecular (M), en el 2 los 20  $\mu\text{g}$  del extracto total marcado con  $^{125}\text{I}$  TGF- $\beta$ 2 (E) de células dm10. En el carril 3 se muestra la inmunoprecipitación con antisuero (A), en el carril 4 con ascitis usada como control negativo (-), en los carriles 5 al 8 se muestra la IP con ascitis F, G I , K respectivamente. El último, carril 9, corresponde a la IP del extracto con las 4 ascitis juntas (F+G+I+K). Con este ensayo se muestra que usar proteína G-sefarosa en lugar de la A-sefarosa no hace gran diferencia. Nótese que por usar células dm10, las bandas apreciadas corresponden con el peso molecular de BG sin GAGs y al receptor tipo II.

## **Determinación del dominio de BG reconocido por las ascitis**

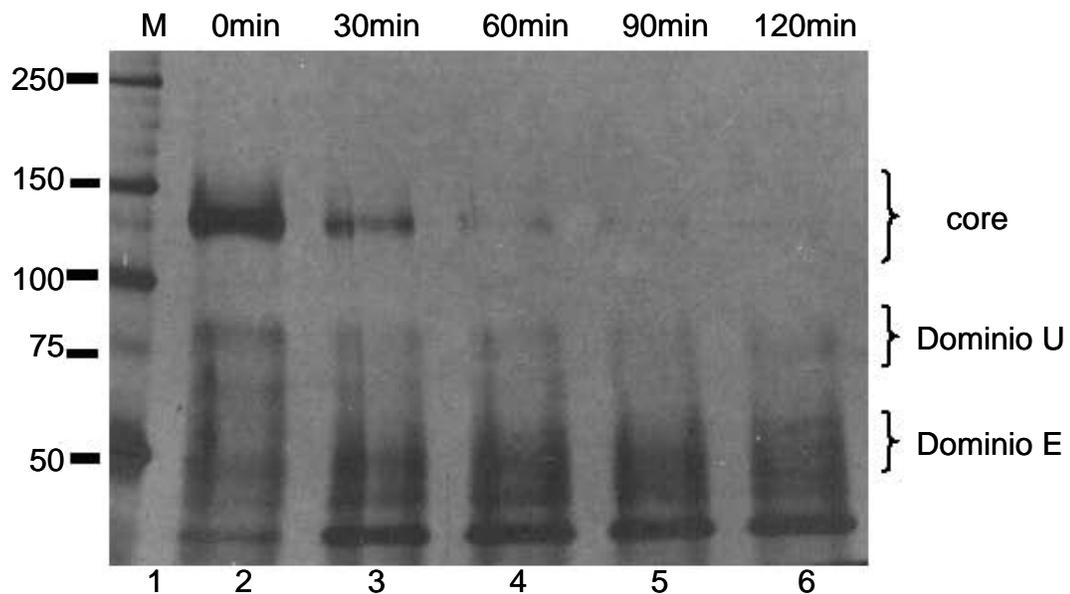
Los datos presentados indican que los 4 anticuerpos monoclonales caracterizados reconocen al betaglicano pero que necesitan mucha proteína para poder reconocerlo (500ng para ELISA y mínimo 100 ng para WB), no la identifican a partir de extractos celulares y que ni combinados pueden inmunoprecipitar al BG a partir de extractos celulares. Una última prueba fue demostrar si reconocen dominios específicos del BG. Para lo cual se hizo un western blot de prueba donde se corrieron 3 concentraciones distintas de hrBGs, sol $\Delta$ 10 y sol $\Delta$ 11 [23] (mutantes expresadas en células de insecto y que corresponden a los dominios E ( $\Delta$ 410-853) y U ( $\Delta$ 45-409 &  $\Delta$ 783-853) del gen de betaglicano de rata respectivamente). Para tener bandas similares se escogió usar concentraciones equimolares de proteína: 200ng de betaglicano y 100 ng de sol $\Delta$ 10 y sol $\Delta$ 11. La figura 23 demuestra que el antisuero #822 detecta a estas proteínas en WB. Se probaron también ascitis, y aunque detectaron el hrBGs no se vio una señal clara en ninguno de los dominios.

Como las mutantes están hechas a partir del gen de rata y el BG usado para inmunizar ratones es humano, cabía la posibilidad de que esta fuera la causa de la falta de señal; así que lo más conveniente era obtener los dominios a partir de hrBGs. Datos del laboratorio (Montiel et al, manuscrito en preparación) revelan que con la digestión parcial de BG con plasmina humana se logran separar los dominios E y U. Para determinar el tiempo óptimo de la digestión se llevó a cabo una cinética (Figura 24). Claramente vemos cómo va desapareciendo la banda de betaglicano correspondiente a 120KDa. Cuando se digiere BG de rata, se observa cómo conforme desaparece la banda de alto peso molecular van apareciendo las bandas correspondientes a los 2 dominios. Sin embargo, cuando se hizo con BG humano, estos dominios no son tan evidentes; pues a pesar nuestras precauciones de almacenamiento, el BG estaba degradado antes de la digestión.

Se consideró el último tiempo de la cinética (120 minutos) para hacer otro WB (figura 25) para probar todas las ascitis con sus controles tanto positivos (antisuero #822) como negativos (ascitis producida contra una proteína distinta al hrBGs), usando 200ng de hrBGs en el primer carril, 100ng de sol $\Delta$ 10 y sol $\Delta$ 11, y 200ng de hrBGs digerido con plasmina en los carriles 2, 3 y 4 respectivamente. El antisuero, reconoce los dominios de BG humano y de rata. Sin embargo, cuando se usan las ascitis como anticuerpos primarios no es posible ver ninguna señal para los dominios del BG de rata ni de humano, sino que sólo se reconoce la proteína entera, lo cual sugiere 2 posibilidades: una es que al quedar dividida la molécula se pierde el epítipo reconocido por cada anticuerpo monoclonal de las ascitis y la otra es que la plasmina degrade la región reconocida por los anticuerpos. Lo que es evidente, es que los 120 minutos de digestión no logran degradar el hrBG al grado de hacerlo irreconocible para los anticuerpos, ya que el antisuero distingue sin problema las dos bandas correspondientes a los dominios E y U (de aproximadamente 55 y 65 KDa).

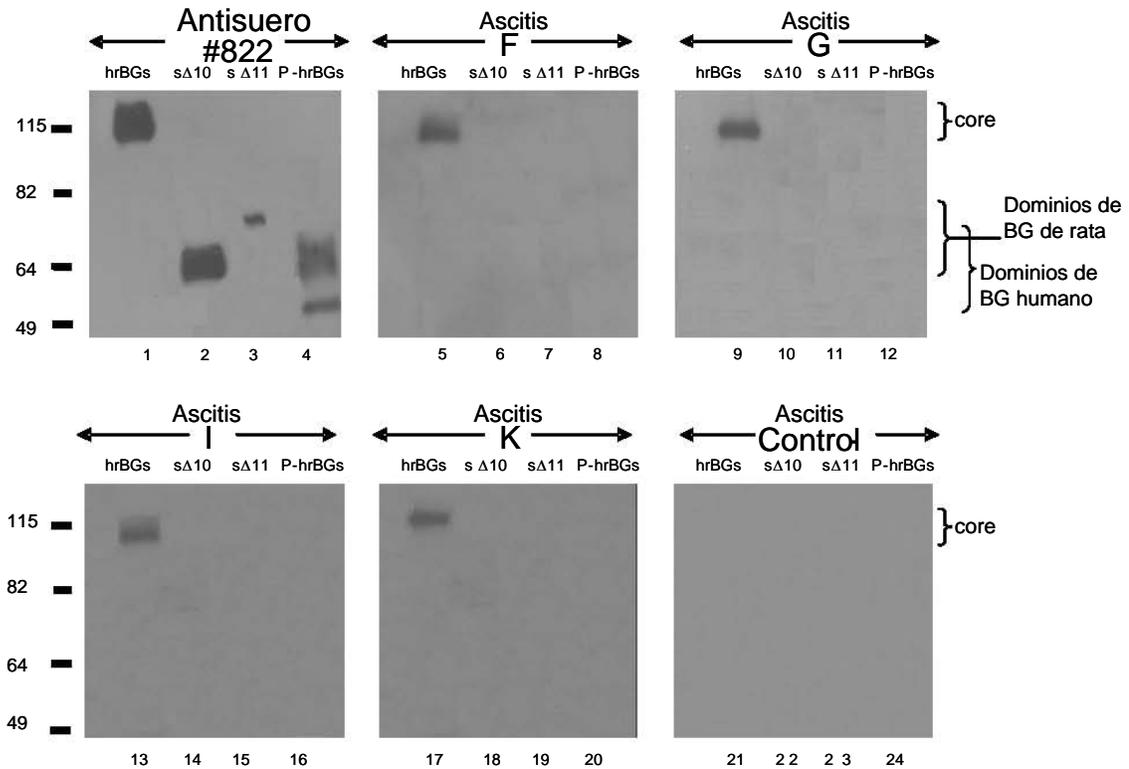


**Figura 23. WB contra hrBGs, solΔ10 y solΔ11; usando antisero#822 y ascitis F**  
 En un gel al 8.5% se cargaron 50, 100 y 250 ng de hrBGs (carriles 1-3), las mismas cantidades de solΔ10 (carriles 4-6) y de solΔ11 (carriles 7-9). El WB del panel **a)** fue revelado con antisero#822, diluido 1:5000, igual que el anticuerpo secundario. Como se observa, detecta tanto al BG completo como a sus dominios. En el panel **b)** se utilizó como anticuerpo primario la ascitis F, la cual sí detecta hrBGs pero no a los dominios recombinantes solubles. Se escogió para experimentos posteriores usar 200ng de hrBGs y 100ng de solΔ10 y de solΔ11



**Figura 24 Tinción con plata de la cinética de digestión de hrBGs**

En total se digirieron con 5 U/ml de plasmina humana 2 microgramos de hrBGs, pero sólo 400 ng se corrieron en el gel al 8.5% mostrado. En el 2 carril se aprecia el tiempo cero, donde hay plasmina pero inmediatamente se paró la reacción con 1mM de PMSF. En los carriles siguientes se muestran diferentes tiempos: 30, 60, 90 y 120 minutos respectivamente. Se puede observar como va desapareciendo la banda correspondiente al hrBGs y se va enriqueciendo la región que oscila entre los 25 y 75 KDa, aunque una parte importante la constituyen los dominios E y U, con el hrBGs no es muy claro el efecto porque se opaca con la abundancia de productos de degradación del BG. El último tiempo (120 min) fue escogido para los experimentos posteriores.



**Figura 25 Western Blot para ver qué dominio del BG es reconocido**

Las bandas pertenecientes a sol $\Delta$ 10 y sol $\Delta$ 11 tienen un peso de alrededor de 60 y 70 KDa, que equivaldrían a los dominios semejantes a Endoglina (E) y Uromodulina (U) respectivamente. En cambio, para el hrBGs digerido con plasmina (P-hrBGs) el dominio E pesa aproximadamente 55 KDa mientras el dominio U pesa unos 65 KDa. Las ascitis sólo identificaron claramente al hrBGs completo, no al tratado con plasmina ni a los dominios recombinantes solubles de rata. El control positivo, el WB en que se usó antisuero #822 como anticuerpo primario, indica primordialmente dos cosas: que la digestión no degradó los dominios E ni U pues las bandas aparecen nítidas y, que si las ascitis no detectan los dominios recombinantes, no es porque la proteína sea de rata sino porque probablemente reconocen epitopes conformacionales y requieren que el antígeno esté completo.

En la presente tesis se trabajaron cinco de los 13 hibridomas disponibles, sólo cuatro de ellos fueron caracterizados. En la siguiente sección el proceso de selección de los hibridomas utilizados es descrito en detalle. El resumen de los datos obtenidos se muestra en la Tabla 3.

<u>Hibridoma</u>	<u>Expandido</u>	<u>Ascitis</u>	<u>ELISA</u>	<u>Western Blot</u>	<u>Inmunoprecipitación</u>
C	√	X	-	-	-
F	√	√	√	±	X
G	√	√	√	±	X
I	√	√	√	±	X
K	√	√	√	±	X

**Tabla 3 Resumen de resultados.**

Se muestran los 5 hibridomas con los que se trabajó. No todos resultaron positivos para las pruebas que se realizaron. √, ±, X y - significan que el resultado fue *bueno*, *regular*, *malo* y *ausente* respectivamente.

## Conclusiones

En el presente trabajo se ha expuesto la participación del receptor tipo III del TGF- $\beta$  o betaglicano en la respuesta mediada por TGF- $\beta$ , en cuyo estudio el uso de anticuerpos monoclonales representaría una útil herramienta -por las características y ventajas de los monoclonales descritas previamente- para estudiar sus funciones biológicas en diversas áreas. Esperábamos que alguno de los hibridomas proporcionara un anticuerpo capaz de detectar al betaglicano a partir de extractos celulares o de inmunoprecipitarlo para poder después saber cuál dominio era el que se estaba reconociendo. Desafortunadamente, a pesar de reconocer a la proteína contra la cual fueron generados, no cumplieron con el resto de las expectativas.

Dados los resultados prácticamente negativos en las ELISAs e Inmunoprecipitaciones hay dos posibles explicaciones:

-Podría haber ocurrido que los hibridomas con los cuales se trabajó perdieron la capacidad de producir el anticuerpo por el cual fueron originalmente seleccionados.

-También es posible que no hubieran sido exhaustivamente clonados y subclonados, y que de las células expandidas sólo una pequeña fracción produjera el anticuerpo monoclonal contra el hrBGs, por lo que éste se encontraría muy diluido. Lo cual correspondería con el hecho de que si se diluye mucho el líquido de ascitis, la señal se pierde.

Entonces lo más apropiado a hacer con las ascitis generadas es correr una muestra en un gel de acrilamida en condiciones no desnaturalizantes, lo cual permitiría rectificar que efectivamente en cada ascitis hay sólo un anticuerpo monoclonal, el cual deberá aparecer como una banda por demás sobresaliente respecto al resto de las proteínas presentes en la ascitis.

También se podrían correr varias concentraciones conocidas de alguna proteína (por ejemplo albúmina) para así estimar la concentración del anticuerpo en cada ascitis. Además, esto podría hacerse para todos los medios condicionados con los que se cuenta y que no dieron señal por ELISA.

Dependiendo de esta serie de análisis, se podría descartar alguno(s) de los hibridomas trabajados o se evaluaría la posibilidad de subclonarlos nuevamente. Si se encontrara que uno o más hibridomas producen adecuadamente anticuerpos específicos contra el hrBGs, valdría la pena su purificación y la determinación de su afinidad. Además de los ensayos aquí presentados, sugeriría que se probaran en inmunohistoquímica y en marcado por afinidad con una variante: antes de poner el  $^{125}\text{TGF-}\beta 2$  añadir el anticuerpo monoclonal para ver si su unión al BG impide la unión del ligando y por consiguiente evita la formación del complejo de señalización, viéndolo por autorradiografía, sin necesidad de hacer IP.

## Apéndice:

### Buffer de TRIS:

Pesar 60.5 g de TRIZMA BASE, disolver en 450 ml de agua destilada, se divide en dos partes iguales: en una se ajusta el pH a 8.8 y en la otra a 6.8. Se afora cada una a 500 ml y guardan a 4 °C en frascos ámbar

### Stock de Acrilamida:

30% p/p de acrilamida	60g
0.8% p/p de bisacrilamida	1.6g
Agua Milli-Q	138.4ml

Se filtra con papel filtro y se guarda en frasco ámbar a 4°C

### Gel Separador:

Solución Stock	Concentración final de Acrilamida						
	20%	15%	12%	10%	8.5%	7.5%	5%
Acrilamida (b)	20	15	12	10	8.5	7.5	5
Tris HCL pH 8.8 (a)	9.9	11.2	11.5	11.2	11.2	11.2	11.2
SDS 20% (c)	0.15	0.15	0.15	0.15	0.15	0.15	0.15
Agua Milli-Q	---	3.7	6.7	8.7	10.2	11.2	13.7

Se mezcla y degasifica 5 minutos. Agregar 200 µl de persulfato amónico al 10% y 30 µl de TEMED. Se vierte y se cubre con agua o con n-butanol.

### Gel Concentrador:

Solución Stock	Concentración final de Acrilamida	
	5%	3%
Acrilamida (b)	1.67	1.0
Tris HCL pH 6.8 (a)	1.25	1.25
SDS 20% (c)	0.05	0.025
Agua Milli-Q	7.03	7.70

Se mezcla y degasifica 5 minutos. Se agregan 100 µl de persulfato amónico al 10% y 10µl de TEMED.

**Buffer de Muestra con SDS y DTT:**

Concentración final	Solución Stock	$\mu\text{l}/ 50\mu\text{l}$	3x/5,000 $\mu\text{l}$
SDS 2%	20%	5	1,500
Glicerol 10%	100%	5	1,500
Tris- HCl 0.08 M, pH 6.8	1N	4	1,200
Azul de bromofenol		trazas	trazas
DTT 1M	100x		

Se mezcla todo sin el DTT, el cual se agrega al momento de uso, y se lleva al volumen establecido

**Buffer de electrodos con SDS 10x , pH 8.3:**

Concentración Final 1x	10x	g/lit 10x
Tris 0.025 N	0.25 N	30.3
Glicina 0.192 N	1.92 N	144.2
SDS 0.1%	1%	10

**Buffer de Transferencia:**

25 mM de Tris	3.03g
192 mM de Glicina	14.4g
En 20% de Metanol	200 ml de metanol y se lleva a un litro.
pH 8.3, no se ajusta con ácido ni base!!!	

Se guarda en un frasco ámbar a 4°C

**TBS (Tris Buffered Saline) 20X:**

	1lt 20X
Tris 500 mM	60.55g
NaCl 3M	175.32g

Se disuelve en 600ml de agua y se ajusta el pH a 7.5 con 32.5ml de HCl concentrado y se afora a 1 litro.

### **Desnudado de membranas:**

Una vez seca la membrana se sumerge 15 segundos en metanol, luego se lava en TBS-Tween y luego se pone el siguiente buffer: Glicina 0.1M, SDS 0.5% se ajusta el pH a 2.5 Se incuba 30 minutos a 65°C agitando en el horno de hibridación. Lavar con TBS-Tween 4 veces de 10 minutos cada una a temperatura ambiente. Se procede a bloquear la membrana

### **Tinción con azul de Coomassie (0.05%):**

Azul de Coomassie	500mg
Metanol	425ml
Agua destilada	520ml

Antes de usarse se mezclan 93 ml de esta solución con 7 ml de ácido acético y se deja el gel en agitación lenta por al menos 1 hr.

Y para desteñir se lava varias veces con la siguiente solución:

Metanol	341.5 ml
Agua destilada	866.5 ml
Ácido acético	90.5 ml

### **Tinción de Plata:**

Fijación. 50% metanol + 12% ac. Acético + 0.5 ml/l de formaldehído. Se deja al menos una hora o de preferencia toda la noche.

Lavado. Con solución 50% de metanol, 3 lavados de 20 minutos cada uno.

Pre tratamiento. 0.2g/l de  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ , durante un minuto

Enjuague. Con agua Milli-Q, tres lavados de 20 segundos.

Impregnado. Se pesan 2g/l de  $\text{AgNO}_3$  + 0.75ml/l de formaldehído  
Se deja 15 minutos.

Enjuague. Con agua Milli-Q 2 veces por veinte segundos.

Revelado. Para 25ml pesar: 1.5g de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , 12.5  $\mu\text{l}$  de formaldehído y 500 $\mu\text{l}$  de la solución de  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ , del paso 5. Se deja 10 min o hasta que se vean las bandas.

Lavado. Dos veces de 2 minutos con agua Milli –Q

Paro. Se pone la solución de paro 10 minutos a 4°C. La cual es 50% de metanol y 12% de ácido acético.

Lavado. Lavar con metanol al 50% por 20 minutos y con ésta se puede almacenar el gel a 4°C

**KRH (Krebs- Ringers- HEPES buffer):**

	1lt 10X
NaCl 128mM	74.8 g
KCl 5mM	3.73 g
MgSO <sub>4</sub> 5mM	6.02 g
CaCl <sub>2</sub> 1.3mM	1.9 g
HEPES 50mM	110.2 g

El pH se ajusta a 7.6, pero al quedar 1X queda en 7.4 y es al que se utiliza. Cuando lleva BSA, es al 0.5%

**STE (Sacarosa- Tris – EDTA):**

Sacarosa 0.25 M  
Tris-HCl 10 mM  
EDTA 1 mM

Se ajusta el pH a 7.4 y se le pone PMSF a una concentración final de 1mM

**DSS (Disuccimidil Suberato) para solución entrecruzadota:**

Se pesan 10 mg por cada mililitro en que se vaya a disolver. El solvente es DMSO, pero se agrega en el momento en que se vaya a usar.

Se usan 10µl de DSS ya disuelto en DMSO por cada mililitro que se usa de KRH.

**TTE (Tris-Tritón- EDTA), pH 7.4:**

Tris- HCl	10mM
Tritón X-100	1%
EDTA	1mM

**Coctel de inhibidores de proteasas 100X:**

Leupeptina	1mg/ml
Antipaína	1mg/ml
Hidrocloruro de Benzamidina	10mg/ml
Aprotinina	5mg/ml
Inhibidor de tripsina (de frijol de soya)	10mg/ml

Se disuelven en Tris 10mM, 1mM de EDTA con pH de 7.4 y se guardan a -20°C

La pepstatina se disuelve aparte quedando a 1mg/ml, 100X

El PMSF se prepara a 200mM (200X) pesando 0.871g en 25 ml de etanol)

## Bibliografía

- [1] Growth factors and cytokines in health and disease. McPherron A, Lee S. Jai Press Inc. USA 1996 357-393
- [2] Transforming growth factor-beta family. Massague J. Ann Rev Cell Biol 1990. 6, 597-641
- [3] Peptide growth factors and their receptors. Roberts A B and Sporn M B. Springer. Heidelberg. 1990 419-472
- [4] Development of Müllerian inhibitory substance and expression of the human gene in animal cells. Cate RL, Ninga EG, Patt DJ, MacLaughlin DT, Donahoe PK. Cell 1986 45: 685-698
- [5] The DVR gene family in embryonic development. Lyons KM, Jones CM, Hogan BLM. Trends Genet. 1991 7 408-412
- [6] The BMP proteins in bone formation and repair. Rosen K, Thies RS. Trends Genet. 1992. 8 97-102
- [7] Control of cell pattern in neural tube: regulation of cell differentiation by dorsalin-1, a novel TGF family member. Basler K, Edlund T, Jessel TM, Yamada T. Cell 1993, 73. 687-702
- [8] Recombinant human bone morphogenetic protein-2 stimulates osteoblastic maturation and inhibits myogenic differentiation in vitro. Yamaguchi A, Katagiri T, Ikeda T, Wazney JM, Rosen V, Wang EA, Kalin AJ, Suda T, Yoshiki S. J. Cell Biol 1991 113, 681-687
- [9] TGF- $\beta$ . Wayne A. Border & Nancy A. Noble. Scientific American. Science and Medicine. Jan-Feb 1995 p68-77
- [10] Controlling TGF- $\beta$  signaling. Joan Massagué & Ye-Guang Chen. Genes and Development. 2000 14:627-644
- [11] Specificity, diversity and regulation in TGF- $\beta$  super family signaling. Ester Piek, Carl Hendrik Heldin and Peter Ten Dijke. The FASEB journal vol. 13 1999 p2105-2124
- [12] Transforming Growth Factor-beta (TGF- $\beta$ ) David A. Clark, Robina Coker. The International Journal of Biochemistry and Cell Biology. 1998 vol 30 p293-298
- [13] Mechanisms of TGF- $\beta$  signalling from cell membrana to nucleus. Yigong Shi, Joan Massagué. Cell. Vol 13, June 13 2003 p685-700
- [14] Role of transforming growth factor  $\beta$  in human disease. Gerard C. Biobe, William Schemann & Harvey F. Lodish. The New England Journal of Medicine. 2000 p1350-1357

- [15] El papel fisiopatológico del TGF- $\beta$  en las neuropatías de diversas etiologías: los inhibidores del TGF- $\beta$  como agentes terapéuticos potenciales. M Magdalena Vilchis- Landeros, Patricia Juárez, Fernando López Casillas. *Gac. Méd. Mex.* Vol.139 No 2, 2003
- [16] TGF- $\beta$  receptors and actions. Liliana Attisano, Jeffrey L Wrana, Fernando López-Casillas, Joan Massagué. *Biochimica et Biophysica Acta* 1222 (1994) p71-80
- [17] TGF- $\beta$ : receptores, señales y acciones. Fernando López Casillas, Joan Massagué. *Gac. Méd. Mex.* Vol. 139, No 2, 2003 p 139-144
- [18] Molecular characterization and in situ localization of murine endogline reveal that it is a Transforming Growth Factor-beta binding protein of endothelial and stromal cells. St. Jaques S, Cymerrman U, Lafarte M. *Endocrinology*, 154. 1994. Vol 6. p2645-2657.
- [19] Receptor-associated Mad homologues synergize as effectors of the TGF-beta response. Zhang Y, Feng X , We R, Derynck R. *Nature* 1996. 383: 168-172
- [20] Daughters against dpp modulates dpp organizing activity in Drosophila wing development. Tsuneizumi K, Nakayama T, Ramoshida Y, Komberg TB, Christian JL et al. *Nature* 1997. 389: 627-631
- [21] A human Mad protein acting as a BMP regulated transcriptional activator. Liu F, Hata A, Baker JC, Doody J, Cárcamo J, Harland RM, Massague J. *Nature*, 1996. 381: 620- 623
- [22] A novel mesoderm inducer, Madr2, functions in the activin signal transduction pathways. Baker JC, Harland RM. *Genes Dev.* 10: 1880-1889
- [23] Ligand binding and functional properties of Betaglycan, a co-receptor of the Transforming Growth Factor- $\beta$  superfamily. José Esparza-López, José Luis Montiel, M. Magdalena Vilchis-Landeros, Toshihide Okadome, Lohei Miyazono, and Fernando López-Casillas. *The Journal of Biological Chemistry.* Vol. 276. No. 18 2001 p14588-14596
- [24] Betaglycan can act as a dual modulator of TGF- $\beta$  access to signaling receptors: mapping of ligand binding and GAG attachment sites. Fernando López Casillas, Helen M. Payne, Janet L Andres and Joan Massagué. *The Journal of Cell Biology.* Vol 124, No 4 Feb 1994, p 557-568
- [25] Recombinant soluble betaglycan is a potent and isoform-selective transforming growth factor- $\beta$  neutralizing agent. M. Magdalena Vilchis-Landeros, José L. Montiel, Valentín Mendoza, Guillermo Mendoza Hernandez and Fernando López Casillas. *Biochem. J.* 355 2001 p215-222
- [26] A large domain common to sperm receptors (Zp2 and Zp3) ant TGF-b type III receptor. Bork D, Sander C. *FEBS, Letters*, 1992. 300: 237-240

- [27] Murine betaglycan primary structure, expression and glycosaminoglycan attachment sites. Ponce-Castañeda, M.V., Esparza-López, J., Vilchis Landeros, M.M., Mendoza R. V. and López-Casillas F. BBA 1998. 1384 : 189-196
- [28] Expression, cloning and characterization of the TGF- $\beta$  type III receptor. Owang XF, Lin HY, Ny-Eaton E, Downward J, Lodish J H and Weinberg R A. Cell. 1991 67: 785-805
- [29] Requirement of Type III TGF- $\beta$  receptor for endocardial cell transformation in the heart. Christopher B. Brown, Angelique S. Boyer, Raymond B. Runyan, Joey V. Barnett. Science, Vol 283. p 2080-2083
- [30] Betaglycan presents ligand to the TGF- $\beta$  signaling receptor. López-Casillas F., Wrana J.L., and Massague J. Cell 1993. 73: 1435-1444
- [31] The pathogenesis of tuberculosis. Rook GA, Hernández-Pando R. Annual Rev Microbiol 1996, 50 259-284
- [32] Analysis of the local kinetics and localization of interleukin 1, tumour necrosis factor alpha and transforming growth factor beta during the course of experimental pulmonary tuberculosis. Hernández-Pando R, Orozco EH, Amaga K, Sampien A, Larriva-Sahd J and Madrid M. Immunology 1997. 90 607.617
- [33] Betaglycan binds inhibin and can mediate functional antagonism of activin signalling. Lewis K A, Gray P C, Blount A L, MacConell L A, Water E B, Bilezikjian LM and Vale W. Nature. 2000. 404: 411-414
- [34] Antagonism of activin by inhibin and inhibin receptors: a functional role of betaglycan. Gray PC, Bilezikjian LM and Vale W. Molecular and Cellular Endocrinology. 2002, 188: 254-260
- [35] TGF- $\beta$ 2 knock-out mice have multiple developmental defects that are non-overlapping with other TGF- $\beta$  knock-out phenotypes. Sanford LP, Ormsby I, Gittenberger-de-Groot AC, Sariola H, Fredman R, Boivin GP, Cardell EZ and Doetschman I. Development. 1997, 124: 2659-2670
- [36] Heart and liver defects and reduced transforming growth factor  $\beta$ 2 sensitivity in Transforming Growth Factor  $\beta$  type III receptor-deficient embryos. Stenvers, K. L., Tursky, M. L., Harder, K.W., Kountouri, N., Amatayakul-Chantler, S., Grail, D., Small, C., Weinberg, R. A., Sizeland, A. M. and Zhu, H. Molecular and Cellular Biology 2003. 23 : 4371-4385
- [37] Smad dependent and Smad independent pathways in TGF- $\beta$  family signaling. Derynck R, Zhang Y. Nature 2003. 425 577-584

- [38] Immunobiology : The Immune System in Health and Disease. 6<sup>th</sup> edition. Janeway, C.A; Travers, P., Walport, M., Shlomchik, M. New York Garland Publishings 2005
- [39] Antibodies in cell biology ; Methods in cell biology vol 37. David J. Asai. Academic Press Inc. 1993 USA pp 452
- [40] Antibodies : A Laboratory Manual. Ed Harlow and David Lane. Cold Spring Harbor Lab. USA 1988.
- [41] Antibodies Vol. II: A practical approach. Edited by D. Catty. IRL Press. UK 1989, pp203
- [42] Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. Kôhler G and Milstein C. Nature, 1975. 256: p495
- [43] Fusion between immunoglobulin-secreting and non-secreting myeloma cells. Kôhler G and Milstein C. Eur. J. Immunol. 6: p511
- [44] Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology. Monoclonal Antibody Technology. Edited by RH Borden and Ph Van Knippenberg. Elsevier Science Publishers. Netherlands, 1987, pp 198
- [45] Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. Towbin H, Staehelin T and Gordon J. Proc. Natl. Acad. Sci. (USA). 1979. 76: 4350
- [46] Wei-Chen, Kirkbride C, How T, Nelson C, Mo J, Frederick J, Wang X-F, Lefkowitz J, and Blobel G.  $\beta$ -Arrestin 2 mediates endocytosis of type III TGF- $\beta$  receptor and down-regulation of its signaling. Science. 2003 Vol 301 1394-1397