

*Obtención de Anticuerpos Monoclonales
Anti-gamaGlutamil Transferasa y
Anti-Fosfatasa Alcalina"*

Por:

ALMA ISABEL RAMOS CANO

Tesis Presentada a la

Facultad de Medicina

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEÓN
de la

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS
UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON

*Como Requisito Parcial para la Obtención
del Grado de*

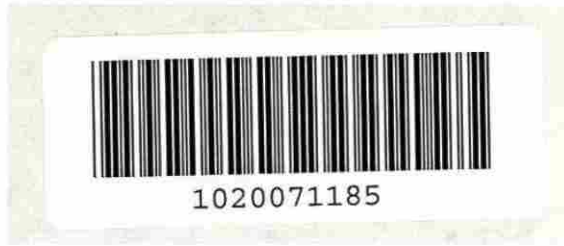
MAESTRO EN CIENCIAS

Con Especialidad en Inmunología

Monterrey, N. L.

Diciembre de 1990

PM
2665
PM
990
23

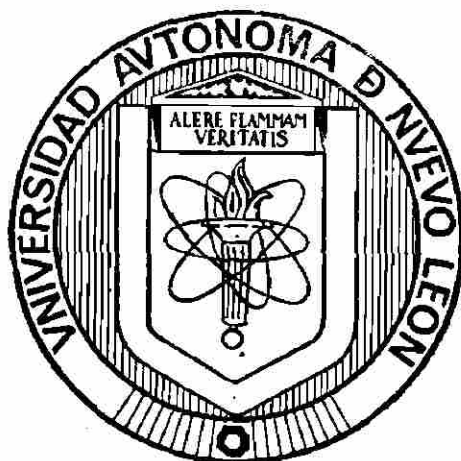


UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



**"Obtención de Anticuerpos Monoclonales
Anti-gama Glutamil Transferasa y
Anti-Fosfatasa Alcalina"**

Por:

ALMA ISABEL RAMOS CANO

Tesis Presentada a la

Facultad de Medicina

de la

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON

*Como Requisito Parcial para la Obtención
del Grado de*

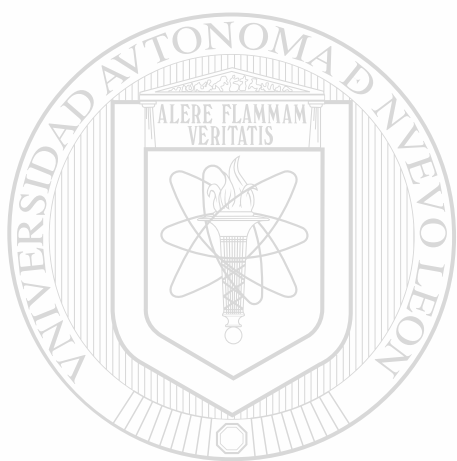
MAESTRO EN CIENCIAS

Con Especialidad en Inmunología

Monterrey, N. L.

Diciembre de 1990

TM
Z 658
FM
11
R3



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



FONDO. TESIS

163353

"OBTENCION DE ANTICUERPOS MONOCLONALES
ANTI-gamaGLUTAMIL TRANSFERASA Y
ANTI-FOSFATASA ALCALINA"

TESIS PRESENTADA POR

ALMA ISABEL RAMOS CANO

COMO REQUISITO PARCIAL PARA
LA OBTENCION DEL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS
CON ESPECIALIDAD EN INMUNOLOGIA

COMISION DE TESIS



UANL

Presidente

Dr. Mario C. Salinas Carmona

Secretario

Dra. Alma Y. Arce Mendoza.

Primer Vocal

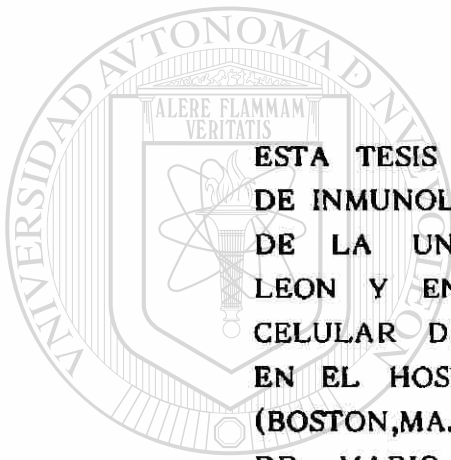
Dra. Ma. del Socorro Flores de C.

Segundo Vocal

Dr. Mario A. Garza Elizondo.

Tercer Vocal

Dra. Herminia G. Martínez Rodríguez.



**ESTA TESIS SE REALIZO EN EL DEPARTAMENTO
DE INMUNOLOGIA DE LA FACULTAD DE MEDICINA
DE LA UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO
LEON Y EN EL LABORATORIO DE FISIOLOGIA
CELULAR DEL DEPARTAMENTO DE RADIOLOGIA
EN EL HOSPITAL GENERAL DE MASSACHUSETTS
(BOSTON,MA. U.S.A), BAJO LA ASESORIA DEL - -
DR. MARIO C. SALINAS CARMONA Y DEL DR.
CARLOS A. RABITO.**

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

AGRADECIMIENTOS

Agradezco cumplidamente:

Al Dr. Mario César Salinas Carmona la oportunidad para ingresar al Departamento de Inmunología a su digno cargo. Asimismo, su apoyo para que pudiera yo aspirar a la beca que me permitió ir al Hospital General de Massachusetts y su comprensión y orientación durante los momentos difíciles. Sus correcciones, sugerencias y paciencia durante la elaboración de este reporte escrito.

Al Dr. Mario Alberto Garza Elizondo su guía introductoria a la metodología para producción de Anticuerpos Monoclonales.

Al Dr. Carlos A. Rabito en cuyo laboratorio se desarrolló el trabajo experimental que aquí se describe.

A la Dra. Alma Yolanda Arce Mendoza la amistad que me ha dispensado, así como sus orientaciones y sugerencias durante mi desempeño en el Departamento de Inmunología.

A la Dra. María del Socorro Flores la confianza que ha tenido en mi como - profesionalista y sus palabras de aliento para que continúe yo por el camino de la ciencia.

A la Dra. Herminia Martínez Rodríguez su amable revisión y corrección de este trabajo de tesis.

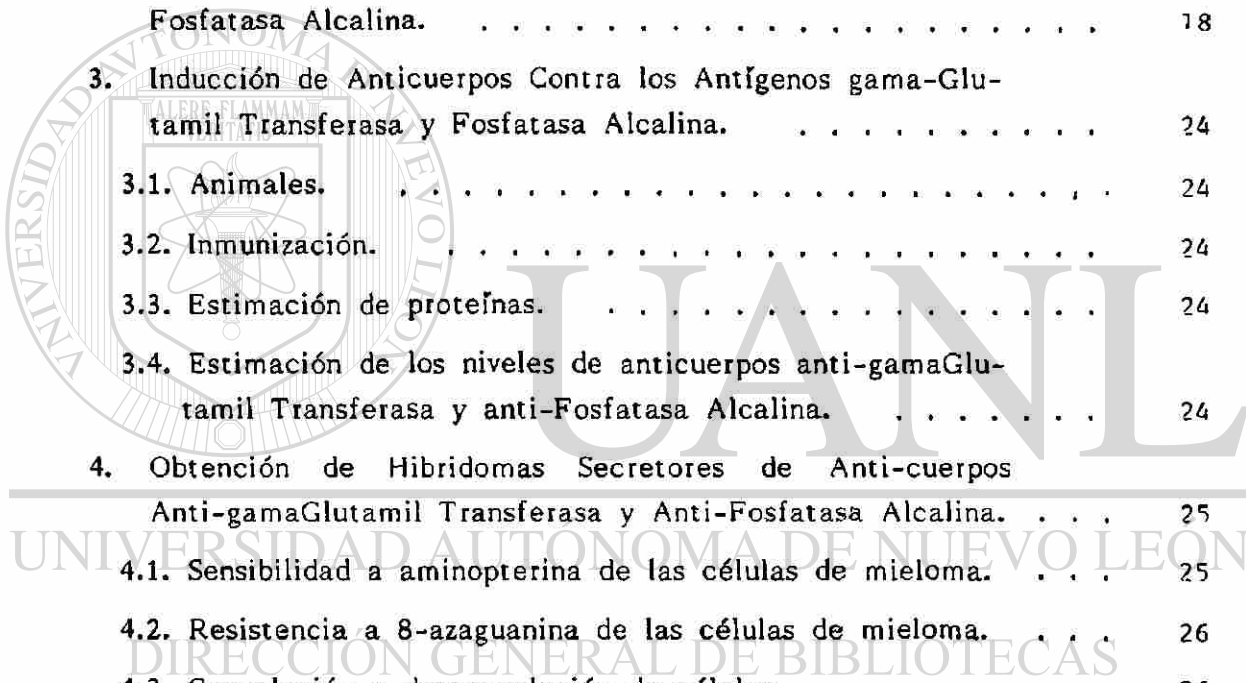
A cada uno de los integrantes del Departamento de Inmunología de la Facultad de Medicina de la U.A.N.L. la amistad sincera y el compañerismo verdadero que me brindaron y que hacen que todos aquellos que no laboramos en este lugar vivamos un agradable y tranquilo ambiente de trabajo y estudio.

A la Sra. Socorríto Valles su siempre amable disposición para atender nuestros múltiples asuntos de carácter escolar y administrativo.

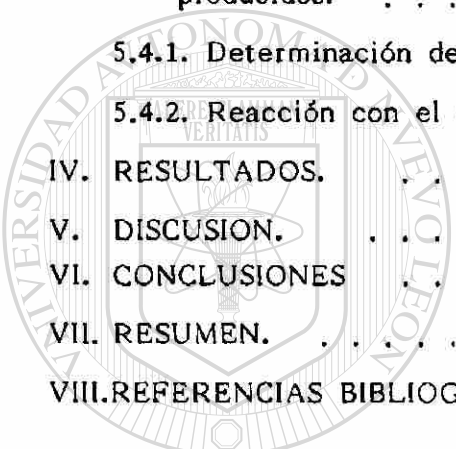
INDICE

Página

LISTA DE ABREVIATURAS	7
INDICE DE FIGURAS	8
INDICE DE TABLAS	9
I. INTRODUCCION	10
II. OBJETIVOS	16
III. MATERIALES Y METODOS	
1. Medios de Cultivo y Reactivos Especiales.	17
2. Preparación de los Antígenos gama-Glutamil Transferasa y Fosfatasa Alcalina.	18
3. Inducción de Anticuerpos Contra los Antígenos gama-Glutamil Transferasa y Fosfatasa Alcalina.	24
3.1. Animales.	24
3.2. Inmunización.	24
3.3. Estimación de proteínas.	24
3.4. Estimación de los niveles de anticuerpos anti-gamaGlutamyl Transferasa y anti-Fosfatasa Alcalina.	24
4. Obtención de Hibridomas Secretores de Anti-cuerpos Anti-gamaGlutamyl Transferasa y Anti-Fosfatasa Alcalina.	25
4.1. Sensibilidad a aminopterina de las células de mieloma.	25
4.2. Resistencia a 8-azaguanina de las células de mieloma.	26
4.3. Congelación y descongelación de células.	26
4.4. Preparación de células de mieloma en fase exponencial.	27
4.5. Preparación de la placa nodriza de macrófagos.	27
4.6. Preparación de las células de mieloma para el proceso de fusión.	28
4.7. Preparación de la suspensión de células de bazo inmune.	28
4.8 Fusión celular.	29
4.9. Identificación de hibridomas productores de anticuerpos anti-gamaGlutamyl Transferasa y anti-Fosfatasa - - Alcalina.	30



5. Obtención de Anticuerpos Monoclonales Anti-gamaGlutamil Transferasa y Anti-Fosfatasa Alcalina.	31
5.1. Clonación de los hibridomas productores de anticuerpos anti-gamaGlutamil Transferasa y anti-Fosfatasa Alcalina.	31
5.2. Producción en mayor escala de los anticuerpos monoclonales.	32
5.3. Purificación de los anticuerpos monoclonales producidos.	32
5.4. Caracterización parcial de los anticuerpos monoclonales producidos.	33
5.4.1. Determinación del isotipo.	33
5.4.2. Reacción con el antígeno gama-Glutamil Transferasa.	34
IV. RESULTADOS.	35
V. DISCUSION.	56
VI. CONCLUSIONES	62
VII. RESUMEN.	63
VIII.REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.	64



U A N L

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

LISTA DE ABREVIATURAS

PBS, buffer de fosfatos 0.01M, pH 7.2, NaCl 0.15M.

DMEM, minimum essential medium, Eagle's Dulbecco's modification.

SBF, suero de bovino fetal.

HT, hipoxantina-timidina.

HAT, hipoxantina-aminopterin-timidina.

ATCC, American Type Culture Collection.

8-AG, 8-azaguanina.

PEG, polietilenglicol.

gGT, gama-Glutamil transferasa.

gama-g-AMC, gama-L-glutamil-7-amido-4-metil cumarina.

Amediol, 2-amino-2-metil-1,3-propanediol.

AMC, 7-amino-4-metil cumarina.

SN, sobrenadante.

Vo, volumen vacío.

Ve, volumen de elución.

ASB, albúmina sérica de bovino.

FA, fosfatasa alcalina.

MUP, 4-metil-umbeliferil fosfato.

MU, 4-metil umbeliferona, 7-hidroxi-4-metil cumarina.

i.p., intraperitoneal.

ACF, adyuvante completo de Freund.

Igs, inmunoglobulinas.

pp, precipitado.

HGPRT, hipoxantina-guanina fosforribosil transferasa.

Ag, antígeno.

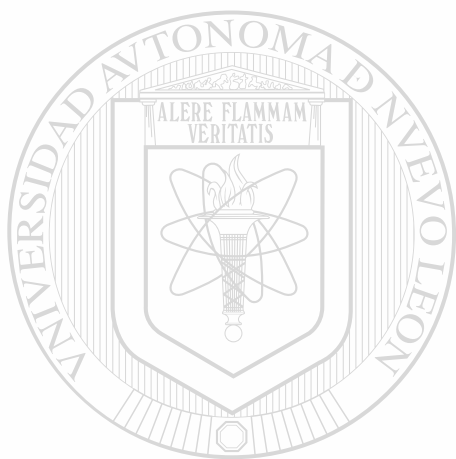
Ac, anticuerpo.

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Perfil de elución de gGT.

Figura 2. Actividad en anticuerpos anti-gGT de hibridomas primarios.

Figura 3. Actividad en anticuerpos anti-gGT de hibridomas en clonación.



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

INDICE DE TABLAS

- Tabla I. Preparación de la muestra de gGT para filtración en gel.
- Tabla II. Actividad de la enzima FA de riñón de cerdo durante su purificación.
- Tabla III. Anticuerpos anti-gGT en suero de ratón.
- Tabla IV. Anticuerpos anti-FA en suero de ratón.
- Tabla V. Relación de los hibridomas productores de anticuerpos anti-gGT seleccionados hasta la etapa previa a la clonación.
- Tabla VI. Características de cultivo de la clona D6.
- Tabla VII. Producción de anticuerpos anti-gGT en ascitis.
- Tabla VIII. Efecto de la reacción Ag/Ac sobre la actividad de la enzima gGT.



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



I. INTRODUCCION

El descubrimiento de los agentes infecciosos y el éxito de los trabajos de vacunación iniciados por Jenner (1796) y continuados por Pasteur (1878), despertaron el interés por la investigación de los mecanismos de defensa adquiridos contra dichos agentes. Tales trabajos aportaron resultados que condujeron a demostrar la presencia de factores específicos en el suero - capaces de neutralizar no solo a las partículas infecciosas, sino también una variedad de materiales extraños a un organismo tales como proteínas de suero heterólogo, extractos bacterianos, diversas sustancias de origen vegetal o animal o moléculas de estructura química simple.

Así Fodor (1886), observó durante el curso de sus estudios sobre los bacilos del ántrax, la acción directa de un suero inmune sobre los microbios. Richet y Héricourt, investigaron los mecanismos de los efectos protectores de la vacunación y concluyeron que la sangre de un animal inmunizado con estafilococos confería protección parcial contra la inoculación subsiguiente con estos mismos agentes. Al año siguiente (1889), Charrin y Roger observaron que el suero de un animal inmunizado con Pseudomonas aeruginosa aglutinaba una suspensión de este microorganismo.

En 1890 Behring y Kitasato demostraron la actividad antitóxica neutralizante de los sueros de los animales inmunizados con toxina diftérica o tetánica, hecho que se consideró como la primera prueba de inmunidad humoral. Casi de inmediato se inició la preparación para uso humano de grandes cantidades de antisuero de caballo para neutralizar la toxina diftérica, en el Instituto Behring de Marburgo (Alemania, 1893), en el Instituto Pasteur de París (1894), en el Instituto Lister de Londres (1895), y también en Estados Unidos de América, dándose así principio a la Seroterapia, tratamiento que se desarrolló en forma excepcional durante los siguientes 50 años.

En los últimos años del siglo XIX, el término antígeno fué introducido para designar cualquier sustancia (entonces principalmente microorganismos

o células de otro origen) capaz de inducir en el organismo receptor alguna reacción contra sí misma, y el término Anticuerpo para designar el factor presente en el suero que poseía la actividad contra el antígeno.

Al describirse las reacciones antígeno-anticuerpo de aglutinación - - (Charrin y Roger, 1889), de inmunotipificación (Pfeiffer, 1889), de neutralización de toxinas microbianas (Behring y Kitasato, 1890; Ehrlich, 1897) y de veneno de serpiente (Calmette, 1894); de precipitación (Kraus, 1897, Tchistovitch, 1899; Bordet y Wassermann y Uhlenhuth), de fijación de alexina o complemento (Bordet, 1900), se dió inicio a otra actividad dependiente de los anticuerpos producidos contra un antígeno, el Inmunodiagnóstico.

El siguiente paso en esta serie de acontecimientos, corresponde a los estudios efectuados para tratar de conocer los mecanismos de producción de los anticuerpos. En 1896 Paul Ehrlich elaboró su "Teoría de las Cadenas Laterales" para explicar la aparición de los anticuerpos en la circulación sanguínea: Ehrlich consideraba que los anticuerpos estaban presentes como resultado del "acrecentamiento" de algún mecanismo normal sugiriendo que algunas células capaces de formar anticuerpos poseían en la superficie de sus membranas "Cadenas laterales específicas" que eran receptoras para los antígenos, proponiendo que la fijación de éstos a sus respectivas cadenas laterales provocaba nueva síntesis de las cadenas receptoras, las cuales eran liberadas al suero como anticuerpos. No fué sino casi 50 años después (1948), que Astrid Fagraeus demostró que es a través del desarrollo de células plasmáticas, descritas desde 1890 por Cajal, como se lleva a cabo la síntesis de anticuerpos (1-6).

La extrema especificidad mostrada por los anticuerpos hacia el antígeno correspondiente, la sencillez de la reacción antígeno-anticuerpo, y la facilidad para detectar dicha reacción o los productos de la misma, han hecho de los anticuerpos herramientas ideales para el trabajo de rutina y de investigación en el área químico-biológica. Los anticuerpos tienen la propiedad de reconocer específicamente cada estructura molecular (dentro de ciertos límites dimensionales), que el hombre ha aislado de la naturaleza o ha sin-

tetizado, y de distinguir entre moléculas tan similares, como dos proteínas que difieren solo en un aminoácido. Así, los anticuerpos son los reactivos más comunes del mercado para efectuar una amplia variedad de tareas en el vasto campo de la Inmunoquímica, (por ejemplo, detectar, aislar, purificar y analizar materiales biológicos o químicos), y su demanda es cada vez mayor en virtud de su aplicación en una gran cantidad de disciplinas químico-clínico-biológicas tales como Botánica, Biología Celular, Biología Molecular, Embriología, Endocrinología, Enzimología, Estudios Forenses, Genética Clínica, Genética Molecular, Hematología, Microbiología, Neurología y Parasitología.

Hasta hace unos diez años, la producción de anticuerpos estaba limitada técnicamente a inmunizar animales y colectar el suero hiperinmune para ser utilizado como fuente de anticuerpos, directamente o después de un tratamiento de purificación parcial.

En la respuesta inmune humoral a un antígeno simple o complejo, muchas clonas con diferente especificidad, afinidad y avidéz son activadas para producir anticuerpos, los cuales aparecen en el suero inmune como una mezcla molecular heterogénea, conocida como anticuerpos convencionales o policlonales.

En la respuesta inmune natural a los antígenos, excepcionalmente ocurren respuestas monoclonales, de aquí que la inmunización de un animal resulte en anticuerpos producidos y secretados por todas las clonas B estimuladas por los diferentes epitopes presentes en el agente inmunizante, por lo cual, la actividad inmune de un suero realmente representa la suma de los distintos anticuerpos producidos en una respuesta policlonal. Los mielomas y los plasmacitomas representan ejemplos, patológicos, de la producción de anticuerpos por una clona (anticuerpos monoclonales), constituyendo una población molecular inmunoquímicamente homogénea. No obstante que estas clonas han sido valiosa fuente de anticuerpos monoclonales específicos para un antígeno particular, no es fácil preparar mielomas con especificidad antigénica predeterminada (1-8,11,16).

En 1975, G. Köhler y C. Milstein publicaron un método para la producción in vitro de anticuerpos monoclonales por líneas de células híbridas inmortales, "hibridomas", resultado de la fusión de células secretoras de anticuerpos de cierta especificidad con un mieloma de crecimiento continuo; las clonas de células híbridas que se obtienen de la fusión contienen los genes de las inmunoglobulinas de ambas células formadoras de anticuerpos y además el potencial para crecimiento ilimitado o "inmortalidad" heredado de la célula de mieloma; por lo tanto, se tiene así una fuente prácticamente inagotable de anticuerpo con especificidad antigénica predefinida y propiedades inmunoquímicas reproducibles (7-20).

Se conocen características básicas que establecen notable diferencia entre la obtención tradicional de los anticuerpos policlonales y la reciente tecnología de producción de anticuerpos monoclonales, mismas que han hecho que cada vez mayor número de investigadores y trabajadores del área químico-biológica tienda a abandonar la primera y a adoptar la segunda. Algunas de tales características son:

a. La obtención de los anticuerpos policlonales depende de la capacidad del individuo inmunizado para producir y liberar al suero los anticuerpos, capacidad que varía de animal a animal, aún dentro de la misma especie y en el mismo individuo de uno a otro reto con el mismo antígeno. La obtención de los anticuerpos monoclonales depende del adecuado establecimiento del cultivo celular para el desarrollo óptimo de los hibridomas seleccionados productores del anticuerpo de la especificidad predeterminada.

b. El rendimiento en anticuerpos policlonales es función del nivel en el cual el animal los produce y del volumen de suero recuperable, en tanto que el rendimiento en anticuerpos monoclonales está dado por el número de células productoras que se tienen en cultivo.

c. La magnitud del tiempo durante el cual se produce anticuerpos policlonales está limitada por las características biológicas del animal; en cambio para los anticuerpos monoclonales en condiciones adecuadas de cultivo celular se tiene la producción virtualmente ilimitada del anticuerpo.

d. Los anticuerpos policlonales son una mezcla heterogénea de inmunoglobulinas que varían en sus propiedades inmunoquímicas ya que son el producto de todas aquellas células B que fueron estimuladas por él o los epitopes presentes en el antígeno. Los anticuerpos monoclonales son poblaciones moleculares inmunoquímicamente homogéneas; puesto que todas las moléculas de inmunoglobulinas son producidas por células genéticamente iguales son idénticas en isotipo, en subtipo, en alotipo e idiotipo y por lo tanto en especificidad para unir antígeno.

e. En igualdad de concentración de anticuerpos, un suero policlonal tiene menor potencia en anticuerpos específicos hacia un determinante antigénico dado, que una preparación del anticuerpo monoclonal correspondiente; o bien, se requiere inmunizar con antígenos altamente purificados, de manera que sea mínimo el número estimulado de células B con diferente especificidad por antígeno (7,8,11).

Ahora bien, sería erróneo creer que los anticuerpos monoclonales reemplazarán completamente la serología convencional. Los anticuerpos policlonales pueden ser preferidos cuando el antígeno por reconocer esté desnaturalizado o alterado en alguna otra forma. No sería aconsejable utilizar anticuerpos monoclonales para la detección de moléculas en especies genéticamente diferentes, sin probar confiablemente para asegurar que algunas moléculas no escapan a la detección debido a polimorfismo genético.

Por otra parte, las propiedades y ventajas de los anticuerpos monoclonales murinos se limitan en cuanto se requiere ser administrados al hombre, ya que su naturaleza extraña al sistema inmune humano estimula una respuesta inmune que anula la efectividad del anticuerpo monoclonal heterólogo o causa reacciones adversas en el receptor. Así, el diagnóstico y marcaje de tumores, la inmunoterapia aplicada a tumores y trasplante de tejido y los estudios *in vivo* de las enfermedades autoinmunes y el cáncer, hicieron notable la necesidad de producir anticuerpos monoclonales de origen humano.

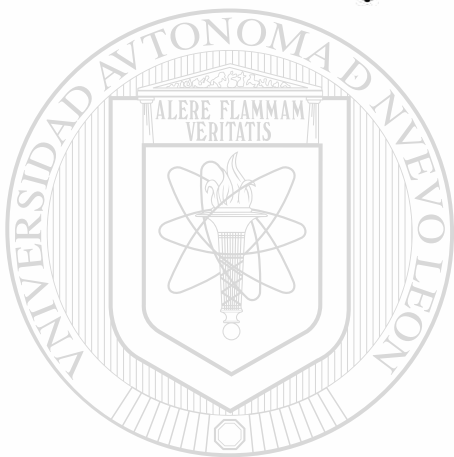
La inducción eficiente y reproducible de anticuerpos monoclonales humanos de especificidad predefinida, resultó ser una tarea difícil. La primera

línea celular inmortalizada productora de anticuerpos humanos de especificidad predeterminada se logró en 1977 (Steinitz y col.). En 1980 Carlo M. Croce y col. en el Wistar Institute of Anatomy and Biology en Filadelfia, tuvieron éxito en la generación de un hibridoma humano estable, productor de anticuerpos de especificidad conocida, fusionando linfocitos B de un paciente - que sufría de mieloma múltiple, con linfocitos periféricos de un paciente - con panencefalitis subaguda. Las células híbridas de esta fusión secretaban moléculas de IgM humana específica para componentes del virus del sarampión (8,11-15).

La obtención de anticuerpos con especificidad hacia las enzimas gama Glutamil Transferasa y Fosfatasa Alcalina se derivó de un proyecto de investigación sobre la "Expresión de la actividad de las enzimas gama Glutamil Transferasa y Fosfatasa Alcalina en células de epitelio renal". Puesto que tales anticuerpos serían usados como marcadores o rastreadores de la síntesis y expresión en membrana celular de las mencionadas enzimas y considerando las ventajas que ofrecen los anticuerpos monoclonales de ratón, se optó porque los anticuerpos anti-gama Glutamil Transferasa y anti-Fosfatasa Alcalina fuesen monoclonales en lugar de los séricos convencionales.

II. OBJETIVOS

1. Purificación parcial de las enzimas gamaGlutamil Transferasa y Fosfatasa Alcalina, que se utilizaron como antígenos para la obtención de anticuerpos monoclonales.
2. Obtención de anticuerpos monoclonales específicos para las enzimas gamaGlutamil Transferasa y Fosfatasa Alcalina.



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

®

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

III. MATERIALES Y METODOS

1. MEDIOS DE CULTIVO Y REACTIVOS ESPECIALES.

1.1. PBS (buffer de fosfatos) 0.01M, pH 7.2, NaCl 0.15M.

Se preparó buffer de fosfatos 0.1M, pH. 7.2, mezclando 28ml de solución A con 72ml de solución B y completando a 200ml con agua; se diluyó 1:10 para tener concentración 0.01M.

Preparación de la solución A: se disolvieron 27.6g (0.2 moles) de fosfato de sodio monobásico, monohidratado, en agua y se llevó a un volumen total de 1000ml.

Preparación de la solución B: se disolvieron 28.4g (0.2 moles) de fosfato de sodio dibásico, en agua, y se llevó a un volumen total de 1000ml.

Por cada 500ml de buffer de fosfatos 0.01M fueron agregados y disueltos 4.383g de NaCl (concentración 0.15M en NaCl); en caso necesario se ajustó pH con NaOH 1N (18,34).

1.2. DMEM alta o baja glucosa (Minimum Essential Medium, Eagle's Dulbecco's modification, sin glutamina; Biofluids Inc., Rockville, MD) suplementado con L-glutamina (0.6g/l, estable por una semana; Sigma), Gentamicina (sulfato de gentamicina 50mg/l; Elkins-Sinn, Inc., Cherry Hill, N.J.) y suero de bovino fetal (probado para hibridomas) en concentración variable.

1.3. SBF (suero de bovino fetal). Se utilizó SBF probado para hibridomas y libre de virus de bovino y de micoplasmas (Whittaker M.A. Bioproducts Inc., Walkersville, MD).

1.4. HT (hipoxantina, timidina). En 500ml de DMEM alta glucosa (4g/l) se disolvieron: 1 ml de HT 500x (probado para hibridomas, American Type Culture Collection, Rockville, MD), 0.3g de L-glutamina (sólo se agregó la cantidad correspondiente al volumen de medio que se consumía en no más de una semana) y 25mg de gentamicina, finalmente se mezcló

la cantidad de SBF requerido en las diferentes situaciones de cultivo.

1.5. HAT (hipoxantina, aminopterina, timidina). En 500ml de DMEM alta glucosa (4g/l) se disolvieron: 1 ml de HAT 500x (probado para hibridomas, ATCC), 0.3g de L-glutamina (estable por una semana) y 25mg de gentamicina y finalmente se mezcló la cantidad de SBF requerida. El reactivo fue almacenado en obscuridad.

1.6. 8-AG (8-azaguanina). Solución 10x: se disolvieron 15mg de 8-AG (Sigma) en 100ml de DMEM alta glucosa, agitando toda la noche a temperatura ambiente.

Medio 1x: se mezclaron 50ml de la solución de 8-AG 10x con 450ml de DMEM alta glucosa con 20% de SBF.

1.7. PEG (polietilenglicol). Se preparó una solución al 50% con 2.5ml de DMEM baja glucosa y 2.5g de PEG (4,000 de peso molecular, probado para hibridomas, ATCC); el PEG fue fundido sometiéndolo a baño de agua a ebullición. El pH de la solución fue llevado a 7.2-7.6 con NaHCO_3 0.1M (adquirió color rosa pálido estable). Se filtró la solución por milípor de 0.22 μm .

Notas:

a. Aunque todos los medios fueron preparados en condiciones estériles, se filtraron por 0.22 μm al momento de consumirse. ®

b. Todos los medios fueron conservados en refrigeración (2-4°C), a menos que se especificara otra temperatura.

c. Todos los medios fueron utilizados a 37°C a menos que se especificara otra temperatura.

2. PREPARACION DE LOS ANTIGENOS γ GLUTAMIL TRANSFERASA Y FOSFATASA ALCALINA.

2.1. γ Glutamyl Transferasa (gGT).

2.1.1. Actividad de gGT (EC2.3.2.2)

Reactivos.

Substrato, solución base.- Se suspendió gama-g-AMC (gama-L-glutamil-7-amido-4-metil cumarina; BACHEM, Inc.) en metoxietanol (Mallinckrodt) para dar una concentración de 10mM; la mezcla se homogeneizó mediante sonicación por 30 seg. Para el ensayo se diluyó la solución base a 10 μ M con buffer 1.

Buffer 1.- Amortiguador de Amediol/HCl 0.1M, pH 8.5 (amediol, 2-amino-2-metil-1,3-propanediol) con 20mM de glicilglicina (aceptora del grupo glutamilo) y 0.1% p/v de tritón X-100.

Buffer 2.- Buffer de glicina 0.05M, pH 10.5.

Estándar de 7-amino-4-metil cumarina (AMC).

En alcohol metílico (J.T.Baker) se preparó una solución 0.20 μ M del estándar AMC.

Nota: aquellos reactivos para los cuales no se especificó su procedencia, fueron adquiridos de Sigma Chemical Co.

Gráfica patrón de AMC.

En tubos de vidrio de 13x100mm se agregaron los siguientes volúmenes del estándar de AMC 0.20 μ M: 10, 20, 30, 40, 50, 75, 100, 150 y 200 μ l; se añadió a cada tubo 5ml de buffer 1 y después de mezclar se midió fluorescencia (en fluorómetro Sequoia-Turner, modelo 112) empleando los filtros 7-60 (para excitación, 340-370nm) y 47B (para emisión, 410-440nm). El blanco de reactivos se preparó con un ml de metanol y 5ml del buffer 1.

Determinación de la actividad enzimática.

En tubos de vidrio de 13x100mm conservados en baño de hielo, se depositó la preparación enzimática (alrededor de 7 μ g de proteína enzimática), se transfirieron los tubos a baño de agua a 37 $^{\circ}$ C y después de un minuto se agregó 0.25ml de la solución de substrato (gama-g-AMC 10 μ M), a temperatura ambiente y se incubó a 37 $^{\circ}$ C por 30 min; se puso fin a la reacción con 4.8ml de buffer 2 conservado en hielo. Se midió fluorescencia

empleando los filtros 7-60 y 47B.

Este ensayo para determinar la actividad de gGT fue estandarizado utilizando las líneas celulares LLC PK₁ (clonas A y B) y MDCK. El límite inferior de detección de AMC por este procedimiento analítico es del orden de 5×10^{-2} nmolas/ml (21-23).

2.1.2. Filtración en gel.

Preparación de la muestra.

Para preservar la actividad enzimática, la proteína fue conservada en frío durante su manipulación.

Se suspendieron 38.4mg de gGT (extracto crudo de riñón porcino, Sigma) en el buffer de elución (60ml) de Tris/HCl 2mM, pH 7.5, MgCl₂ 2mM, ZnCl₂ 0.025mM, NaCl 0.1M). El residuo sólido obtenido después de centrifugar por 30 min a 3000rpm (centrífuga refrigerada International) se solubilizó parcialmente en el mismo buffer adicionado de tritón X-100 (en concentración final desde 0.1 hasta 1%) y llevado a un pH final de 8.0; el sobrenadante (SN) con actividad enzimática que se recuperó después de centrifugar a 3000rpm por 30 min, se unió al SN anterior quedando así constituida la muestra de gGT.

Filtración en gel de Sefacril S-200.

Se utilizó una columna de vidrio de 150cm de longitud y 5.0cm de diámetro ocupada en un 75% de su volumen por el lecho cromatográfico (Sefacril S-200, rango de fraccionamiento para proteínas globulares 5,000 a 250,000; Pharmacia Fine Chemicals). El volumen vacío (V₀) fue 600ml medido con Dextrán Azul 2000 (5ml, 2mg/ml; Pharmacia Fine Chemicals) eluido a una velocidad de 50 ml/h.

Para reducir la adsorción inespecífica de proteína al gel, se pasó a través de la columna albúmina sérica de bovino, (ASB, fracción V; Sigma) al 0.1% en el buffer que sería utilizado para eluir la proteína problema. Finalmente se logró un 78.5% de recuperación de una carga de ASB (50mg en 10ml del buffer), con un volumen de elución (V_e) de 980ml.

La muestra (66ml, 32.92mg de proteína) fue eluída con el buffer Tris/HCl 2mM, pH 7.5 (descrito anteriormente), colectándose fracciones de 12ml (230 gotas, colector LKB) a una velocidad de flujo de 50 ml/h. En cada fracción se determinó proteína (Lowry) y actividad de gGT. Las fracciones positivas para gGT se mezclaron (200ml en total) y se sometieron a concentración mediante un sistema de filtración por centrifugación (CentriCell, Polysciences Inc., North Hampton, U.K.), (24,25).

2.1.3. Electroforesis.

Alícuotas de la fracción concentrada de gGT fueron sometidas a electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturizantes (SDS-PAGE) y no desnaturizantes (PAGE).

SDS-PAGE.- Se efectuó en geles de poliacrilamida en concentraciones al 10 y 12.5% y espesor de 0.75mm. El buffer para el gel de concentración fue Tris/HCl 0.5M, pH 6.8; el buffer para el gel de separación fue Tris/HCl 3.0M, pH 8.8; el buffer de corrida fue Tris 0.025M, glicina 0.192M, SDS 0.1%, pH 8.3. La mezcla acrilamida-bis acrilamida contenía 30% y 0.8% respectivamente. La muestra (30 a 50µg de proteína) se sometió a disociación (en baño de agua a ebullición durante 3 min) en mezcla con 40µl de Tris/HCl 0.0625M, pH 6.8, SDS 2%, 2-mercaptoetanol 5%, glicerol 10% y azul de bromofenol 0.001%.

Los marcadores de peso molecular fueron Ovalbúmina (45,000), ASB (66,200), Fosforilasa B (92,500), beta-Galactosidasa (116,250) y Miosina (200,000).

La electroforesis se efectuó aplicando corriente constante de 60mA.

Las bandas proteicas fueron detectadas mediante tinción con azul de Coomassie y con tinción de plata (28,29).

Nota: Tris y Glicina fueron adquiridos de Sigma; los reactivos para tinción con plata fueron de NEN-DuPont, los restantes reactivos y el equipo para electroforesis procedían de BioRad.

Demostración de la actividad enzimática.

Para verificar la actividad de la enzima gGT en la preparación enzimática sometida al tratamiento de purificación se hicieron geles de poliacrilamida en concentración al 5% y espesor de 1.5mm. Los buffers de corrimiento y del gel de separación fueron los mismos que se utilizaron en SDS-PAGE. La electroforesis se desarrolló aplicando corriente constante de 60mA. Terminada la electroforesis y recuperado el gel de su molde, fue dividido en 2 secciones, una conteniendo el carril en el cual se había aplicado gGT "purificada", y la otra con los carriles que contenían gGT "purificada" y sin "purificar". La primera sección fue sometida a tratamiento para tinción específica de la enzima gGT (30) y la segunda sección se tiñó con plata.

2.2. Fosfatasa Alcalina (FA)

2.2.1. Actividad de FA (EC3.1.3.1).

Reactivos.

Substrato.- Se preparó 4-metil-umbeliferil-fosfato (MUP) 10^{-3} M en buffer 1 inmediatamente antes de usarse, conservándolo en recipiente oscuro, en frío; el buffer de carbonato/bicarbonato 0.1M, pH 9.8 favorece la estabilidad del substrato.

Buffer 1.- Amortiguador de carbonatos 0.1M, pH 9.8; se preparó una solución 57mM en NaHCO_3 y 43mM en Na_2CO_3 con pH 9.8- Fue conservada en frío hasta el momento de usarse.

Buffer 2.- Amortiguador de carbonatos 0.1M, pH 9.2 adicionado de sulfato de magnesio y tritón X-100; se preparó una solución 90mM en NaHCO_3 , 10mM en Na_2CO_3 , 1mM en $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ y 0.1% de tritón X-100, con pH 9.2. Se conservó en frío hasta el momento de emplearse.

Solución base del estándar 4-metil umbeliferona (MU, 7-hidroxi-4-metil cumarina o beta-metil umbeliferona).- En alcohol metílico se preparó una solución 10^{-3} M del estándar MU (solución estable por aproximadamente 3 meses si se conserva en refrigeración y oscuridad). Se preparó

solución de trabajo $0.50\mu\text{M}$, también en metanol.

Gráfica patrón de MU.

En tubos de vidrio de $13\times 100\text{mm}$ se depositaron los siguientes volúmenes de estándar de MU $0.5\mu\text{M}$: 10, 20, 40, 60, y $80\mu\text{l}$; se añadió a cada tubo 5ml de buffer 2 y después de mezclar se midió fluorescencia empleando filtros 7-60 (para excitación, 360nm) y 48 (para emisión, 465nm). El blanco de reactivos fue preparado con un ml de metanol y 5ml de buffer 2.

Determinación de la actividad enzimática.

En tubos de vidrio de $13\times 100\text{mm}$ conservados en baño de hielo, se mezcló un ml de buffer 2 con la preparación enzimática (alrededor de $7\mu\text{g}$ de proteína enzimática), se transfirieron los tubos a baño de agua a 37°C y después de un min se agregaron $20\mu\text{l}$ de la solución de sustrato (MUP 10^{-3}M) y se incubó a 37°C por 8 min; la reacción fue detenida con 0.5ml de NaOH 1N, se mezclaron 4ml de buffer 2 y se midió la fluorescencia empleando los filtros 7-60 y 48.

Este sistema de ensayo para determinar la actividad de FA fue estandarizado utilizando las líneas celulares LLC PK₁ (clonas A y B) y MDCK. El límite inferior de detección de MU por este procedimiento analítico es $50\mu\text{M}$ (26).

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

2.2.2. Purificación de la proteína con actividad de FA.

Fracciones de 10ml de un extracto liofilizado de riñón de cerdo (preparado en el propio laboratorio) fueron sometidas a una serie de tratamientos fisicoquímicos incluyendo solubilización en buffer Tris/HCl, diálisis, filtración en gel, digestión con neuraminidasa y cromatografía de afinidad (26,27).

2.2.3. Electroforesis.

Alícuotas de la fracción concentrada de FA fueron sometidas a SDS-PAGE y a PAGE siguiendo el protocolo descrito para gGT. Terminada

la electroforesis y recuperando el gel de su molde, fue dividido el gel en 2 secciones, una conteniendo el carril en el cual se había aplicado FA "purificada" y la otra con los carriles que contenían FA "purificada" y sin "purificar". La primera sección fue sometida a tratamiento para tinción específica de la enzima FA (27) y la segunda sección se tiñó con plata.

3. INDUCCION DE ANTICUERPOS CONTRA LOS ANTIGENOS γ GLUTAMIL TRANSFERASA Y FOSFATASA ALCALINA.

3.1. Animales.- Se utilizaron ratones BALB/c, hembras, de 12 meses de edad aproximadamente.

3.2. Inmunización.- Una vez a la semana durante 3 ó 4 semanas, se administraron intraperitonealmente (i.p.) 10 μ g de la proteína disuelta en 100 μ l de la mezcla 1:5 ó 1:10 de la solución de antígeno y adyuvante completo de Freund (ACF; GIBCO) homogeneizada por sonicación.

3.3. Estimación de proteínas.- La cantidad de proteínas fue estimada de acuerdo al procedimiento de Lowry y col. (32).

3.4. Estimación de los niveles de anticuerpos anti-gGT y anti-FA, en suero de ratón.- Los anticuerpos fueron cuantificados en suero (obtenido de la sangre recuperada de una incisión practicada en la cola del ratón), siguiendo el procedimiento de RIA descrito en el manual del Instituto Basel (18):

3.4.1. Preparación de la placa para desarrollar el RIA.

Recubrimiento del plástico con antígeno.- En cada pozo de una placa de microtitulación de 96 pozos (placas flexibles de cloruro de polivinilo con pozos en U; Cooke Laboratory Products, Dynatech), se colocaron 50 μ l de la solución de antígeno (2 μ g de proteína antigénica por ml), en este caso las soluciones de gGT y de FA en PBS. Se cubrieron las placas con parafilm dejándose en reposo toda la noche en cámara húmeda a temperatura ambiente. Se eliminó el SN y se lavó 2 veces con PBS para continuar al siguiente paso.

Bloqueo de los sitios que quedaron libres (sin antígeno) en el pozo.- Se llenó cada pozo con una solución de ASB (fracción V) al 3% en PBS conteniendo 0.15% de azida de sodio (Sigma). Después de conservar las placas con esta solución por una a dos horas a temperatura ambiente, se eliminó el SN y se lavó 3 veces con PBS.

3.4.2. Detección de los anticuerpos de la especificidad deseada.

Reacción con los anticuerpos de interés.- Se agregaron 50µl de cada uno de los diferentes sueros, posibles fuentes del anticuerpo deseado y se dejó en reposo a temperatura ambiente toda la noche; se eliminó el SN y se lavó 3 veces con PBS.

Para cada ensayo se corrió un duplicado (testigo negativo) en pozo cubierto solamente con ASB al 3%, esto es, sin antígeno.

Detección de la reacción antígeno-anticuerpo.- Se agregó a cada pozo de reacción 50µl de anticuerpos anti-Igs de ratón (equivalentes a 10-30ng de proteína, por lo menos 20,000cpm); se utilizó gama-globulina de chivo anti-Igs de ratón marcada con I-125 con actividad específica de 7.5 µCi/µg, 0.20 µCi/pozo o ensayo (NEN-DuPont, Boston, MA). Se cubrió la placa con parafilm para dejar en reposo por 4 horas a temperatura ambiente y en cámara húmeda. Después de ello se extrajo el exceso de anticuerpo marcado y se lavó 5 veces con PBS. La radiactividad en cada pozo de reacción fue medida en contador Gamma (LKB Wallac 1282 Compugamma, Universal Gamma Counter).

Para cada conjunto de ensayos se prepararon de 3 a 5 pozos (cpm de fondo) tratados con el antígeno y ASB, con PBS en lugar del suero y con el anticuerpo marcado; las cpm de fondo deben ser menores al 1% de las cuentas iniciales.

4. OBTENCIÓN DE HIBRIDOMAS SECRETORAS DE ANTICUERPOS ANTI-gamaGLUTAMIL TRANSFERASA Y ANTI-FOSFATASA ALCALINA.

4.1. Sensibilidad a aminopterina de las células de mieloma.

1) Se cosecharon las células de mieloma Sp2/0 mantenidas en cultivo -

exponencial en medio DMEM-10% SBF.

2) Se resuspendieron en medio HAT-10% SBF en una dilución 1:5 y se colocaron en caja Petri (o pozo de una placa de cultivo celular) igual a aquella de la cual fueron cosechadas.

3) Se dejó en incubación en atmósfera húmeda con 5.5-7% de CO₂, a 37°C (incubadora Forma Scientific modelo 3326).

4.2. Resistencia a 8-AG de las células de mieloma.

1) Después de cosechar las células de mieloma conservadas en cultivo exponencial en medio DMEM-10%SBF, fueron resuspendidas 1:5 en medio 8-AG y colocadas en caja Petri (o pozo de una placa de cultivo celular) igual a aquella de la cual fueron cosechadas.

2) Se procedió a incubar y una vez que se tuvieron cultivos confluentes se cosecharon las células.

3) Después de repetir el proceso anterior 2 veces más, se cosecharon las células de la tercera resiembra en 8-AG y se cultivaron varias veces en medio HT-20% SBF.

4.3. Congelación y descongelación de células.

4.3.1. Para congelar se cosecharon las células de un cultivo en fase exponencial y se suspendieron en medio de criopreservación-20% SBF, frío, 1×10^6 células/0.5ml de medio (Cell freezing medium-glycerol, Sigma); se distribuyó la suspensión celular en alícuotas de 0.5ml en viales de un ml para criopreservación. Se colocaron los viales en un soporte para precongelar (en el cuello del tanque de nitrógeno líquido) y después de una hora fueron transferidos los viales a su posición definitiva de almacenamiento en el tanque de nitrógeno líquido.

4.3.2. Para descongelar, inmediatamente después de sacar el vial del tanque de nitrógeno líquido fue sumergido en baño de agua a 35-40°C hasta lograr su rápida descongelación total. El contenido del vial fue

transferido a un tubo conteniendo el medio de cultivo con SBF al 20% , en cantidad suficiente (10ml) para lavar las células. Las células lavadas fueron resuspendidas en un volumen de 1 ml del mismo medio y sometidas a incubación en diluciones 1:5, 1:10 y 1:100.

4.4. Preparación de células de mieloma en fase exponencial.

Se prepararon cultivos en cajas Petri de 100x20mm con células cosechadas de un cultivo que recién había alcanzado confluencia, las cuales fueron sembradas en dilución 1:5 ó 1:10 (en DMEM-10 ó 20% SBF) e incubadas en las condiciones ambientales señaladas, durante 24 ó 48 horas respectivamente; se procedió a resembrar los cultivos confluentes nuevamente en diluciones 1:5 ó 1:10.

4.5. Preparación de la placa "nodriza" de macrófagos.

1) Se preparó una solución de sacarosa al 11.6%, disolviendo 5.8g de sacarosa en 50ml de agua; se esterilizó con una unidad de filtración de 0.22µm (Millipore).

2) Se cargó cada una de 4 jeringas de 12ml (aguja calibre 19 ó 20) con 6ml de la solución de sacarosa y 6ml de aire; se conservaron en hielo hasta su uso.

3) Después de sacrificar el animal donador de las células peritoneales (ratones BALB/c hembras, de 8 a 12 semanas de edad), se cortó asépticamente la piel de la cara ventral (sin pasar el peritoneo) y se inyectó en la cavidad peritoneal el contenido de la jeringa.

4) Durante 60 seg se presionaron suavemente las regiones laterales del abdomen del ratón y después de ello se extrajo tanto líquido como fue posible (entre 5 y 5.5ml) que fue conservado en hielo hasta su procesamiento.

5) Se repitió el procedimiento con otro ratón.

6) Reunidos los líquidos peritoneales extraídos en un tubo de 50ml,

fueron centrifugados por 7 min a 1200rpm. Se aspiró y desechó el SN dejando intacto el paquete celular. Se agregaron 10ml de medio HAT, para resuspender.

7) Se contó el número de células en una alícuota de 10 μ l de la suspensión celular y se efectuó la dilución pertinente en medio HAT para tener 4000 células en 100 μ l para cada pozo de una placa de 96 pozos.

8) Se distribuyeron 100 μ l de la suspensión celular en cada pozo de la placa (placas de 96 pozos de fondo plano MICROTTEST III plate, Falcon 3072, Becton Dickinson and Co.) y se incubó a 37°C en atmósfera húmeda con 5.5-7% de CO₂.

9) Se comprobó ausencia de contaminación microbiana al día siguiente así como el día de la fusión celular.

4.6. Preparación de las células de mieloma para el proceso de fusión.

1) Las células de mieloma Sp2/0 (resistentes a 8-AG y sensibles a HAT) de un cultivo en fase exponencial se crecieron en DMEM-alta glucosa-HT-20% SBF hasta confluencia en caja Petri de 100x20mm; de aquí se subcultivaron en dilución 1:5 ó 1:10, 24 ó 48 horas respectivamente, antes de la fusión, las placas necesarias para tener 5x10⁷ células de mieloma para el momento de la fusión, (se prepararon de 10 a 15 placas por fusión). Se utilizaron las placas en las cuales las células aparecían más refringentes a la luz y homogéneas en tamaño, sólo confluentes.

2) Se cosecharon las células de las cajas y después de desechar el SN se resuspendieron en 20 ml de medio DMEM-baja glucosa, sin más aditivos.

3) Se contó el número de células en 10 μ l de la suspensión celular y se transfirió a un tubo de 50ml de volumen correspondiente a 5x10⁷ células.

4.7. Preparación de la suspensión de células de bazo inmune.

1) Se sangró el ratón inmune seleccionado para la fusión, con el fin

de estimar el nivel sanguíneo de los anticuerpos de interés (siguiendo el protocolo de RIA ya descrito).

2) Después de sacrificar el animal (por dislocación cerebral) asépticamente se extrajo el bazo y se depositó en una caja Petri pequeña conteniendo unos 2ml de DMEM-baja glucosa.

3) Se eliminó el tejido extraño de bazo y se transfirió éste a una caja Petri grande conteniendo un pequeño cedazo sumergido en unos 10ml de medio DMEM-baja glucosa. Se dispersaron las células de bazo a través del cedazo, el cual fue lavado con 5ml del mismo medio DMEM-baja glucosa.

4) Se aspiró la suspensión celular y se depositó en un tubo de centrifuga de 15ml. Se agregó DMEM-baja glucosa hasta un volumen de 10ml; se dejó en reposo otros 10 min y se transfirió el SN a otro tubo de 15ml.

5) Se contó el número de células en 10 μ l diluidos 1:100, se estimó el volumen correspondiente a 100×10^6 células y se transfirió tal volumen al tubo de 50ml conteniendo la suspensión de células de mieloma.

6) Se procedió a la fusión celular.

4.8. Fusión celular.

1) Después de centrifugar la suspensión de células de mieloma y de bazo, y de desechar el SN, se despegaron las células adheridas a las paredes del tubo golpeando éstas suavemente.

2) Se agregaron 0.5ml de PEG al 50%, a 37°C, en una sola adición; se mezcló rápidamente golpeando con suavidad las paredes del tubo e inmediatamente se centrifugó y se desechó el SN. El tiempo de contacto de las células con PEG nunca fue mayor de 8 min.

3) Se agregaron 15ml de medio HAT-20% SBF al paquete celular para resuspender las células.

4) Se depositaron las células recién fusionadas en dos cajas Petri

que contenían cada una 50ml de medio HAT-20% SBF; cada placa recibió el volumen de células fusionadas necesario para 5 placas de 96 pozos cada una, así que se preparó un total de 10 placas para la fusión celular efectuada.

5) Después de dispersar las células en el medio, fueron distribuidas en las placas nodrizas de macrófagos (preparadas el día anterior). Se colocaron 100µl de la suspensión de células fusionadas en cada pozo que ya contenía 100µl de la suspensión nodriza de macrófagos.

6) Las placas sembradas fueron colocadas en incubadora con atmósfera húmeda y CO₂ (5.5-7%) a 37°C. Al día siguiente se revisaron las placas para contaminación microbiana.

7) Al 4o. día fueron reemplazados 100µl del medio de cultivo con nuevo HAT-20% SBF; a los diez días se sustituyó el medio HAT con HT-20% SBF, y después cada 3 ó 4 días se cambiaban 100µl del SN de cultivo por medio fresco HT-20% SBF.

4.9. Identificación de hibridomas productores de anticuerpos anti-gGT y anti-FA.

1) Al tercer día de incubación de los cultivos derivados de la fusión celular se procedió a buscar, mediante observación al microscopio, indicio de la presencia de hibridomas: pequeños acúmulos de células esféricas notablemente refringentes a la luz, fácilmente distinguibles de las células muertas y de los restos celulares. Con un plumón se marcaron los pozos que contenían hibridomas en desarrollo.

2) A partir de tal día las cajas se revisaron diariamente para localizar nuevos pozos con hibridomas en crecimiento y a la vez aquellos pozos en que la expansión de los hibridomas cubría ya el 50% de la superficie del fondo del pozo.

3) De los pozos con confluencia celular mayor al 50% se extrajeron -- 100µl de SN (los cuales fueron restituidos con medio fresco HT-20% SBF) para determinar la presencia de anticuerpos específicos del antígeno

de interés siguiendo la metodología ya descrita, con la excepción de que en este caso se utilizaron para cada ensayo 50µl de SN de cultivo de hibridomas en lugar de suero de ratón como fuente de anticuerpos, los restantes 50µl de SN fueron el testigo de cada ensayo en ausencia de antígeno.

4) Las poblaciones celulares productoras del anticuerpo de interés fueron expandidas por transferencia a pozos más grandes, creciendo en HT-20% SBF; después de demostrar en estos cultivos la producción del anticuerpo de interés, se tomaron alícuotas para clonar y para congelar.

5. OBTENCION DE ANTICUERPOS MONOCLONALES ANTI-gGT Y ANTI-FA.

5.1. Clonación de los hibridomas productores de anticuerpos anti-gGT y anti-FA.

1) Se preparó una suspensión celular conteniendo 10 células del cultivo del hibridoma seleccionado para clonación, en 10ml de la mezcla 1:1 de HT-20% SBF/SN de cultivo de células de hibridoma.

2) Se distribuyeron 100µl de la suspensión celular en cada pozo de una placa de 96 pozos y se procedió a incubar en las condiciones ya señaladas.

3) El mismo día y al siguiente se observó al microscopio para localizar (y marcar) los pozos que contenían solo una célula.

4) A las 48 horas de cultivo se agregó a cada pozo 100µl de SN de cultivo de células de bazo de ratón.

5) En las clonas con 2-3mm de diámetro se estimaron anticuerpos específicos del antígeno de interés en SN de 3 días de cultivo.

6) Se seleccionaron las clonas mejor productoras del anticuerpo, se congelaron unas alícuotas y otras fueron reclonadas (2 veces) para llegar a establecer la Clona Productora del Anticuerpo Monoclonal de Especificidad Predeterminada.

7) De la clona definitiva se tomaron alícuotas para congelación y para expansión celular.

5.2. Producción en mayor escala de los anticuerpos monoclonales.

1) Diez ratones (BALB/c, hembras, de 8-12 semanas de edad) fueron inyectados i.p. con 0.5ml de pristane cada uno; el pristane es el aceite mineral 2,6,10,14-tetrametilpentadecano, Sigma.

2) Al décimo día se inyectó i.p. a cada animal 5×10^6 a 1×10^7 células productoras del anticuerpo monoclonal (creciendo en fase log en medio HT con 10% de SBF), contenidas en un volumen de 0.5ml.

3) Cuando el tumor fue claramente visible en la forma de una gran inflamación peritoneal (entre 5 y 10 días), el líquido de ascitis fue extraído a una jeringa heparinizada usando aguja calibre 21.

4) Se desecharon las células por centrifugación y se congeló el líquido de ascitis hasta su procesamiento.

5) Se practicaron las punciones peritoneales cada 24 ó 48 horas por 2 ocasiones, tiempo en el cual fueron sacrificados los animales.

6) Se determinaron proteínas y título de anticuerpos en alícuotas de los líquidos de ascitis (17,18,31).

5.3. Purificación de los anticuerpos monoclonales producidos.

La purificación de los anticuerpos contenidos en el líquido de ascitis se efectuó haciendo uso del principio de afinidad entre anticuerpos y Proteína A del estafilococo; para ello se empleó el equipo comercial Affinica:

1) Se lavó el cartucho de Proteína A primero con 5ml de buffer de regeneración y luego con 4ml de buffer de unión, a una velocidad de flujo de 1 ml/min, en cada caso.

2) Antes de aplicar la muestra al cartucho, se eliminó el material particulado de la muestra usando la unidad de filtración S & S Uniflo, 0.2 μ m.

3) Se diluyó la muestra con 2 volúmenes de buffer de unión y se aplicó directamente al cartucho, a una velocidad de flujo de 0.5 ml/min.

4) Al terminar de aplicar la muestra se continuó lavando la columna con 10ml de buffer de unión, a una velocidad de flujo de 1 ml/min; la absorbancia a 280nm del eluido debía regresar a los niveles de la línea basal.

5) La muestra fue eluida del ligante (Proteína A) con 6ml del buffer de elución, a una velocidad de flujo de 0.5 ml/min. El eluido fue inmediatamente neutralizado con Tris/HCl 1.0M, pH 9.0 y luego sometido a desalación y concentración empleando una unidad para filtración por centrifugación (CentriCell-60, con límite de exclusión en 10,000 de peso molecular). Las soluciones finales del anticuerpo monoclonal fueron almacenadas en volúmenes de 0.5ml y conservadas a -20°C; en una alícuota se determinó proteína y título de anticuerpos.

6) El ligante Proteína A fue regenerado con 5ml de buffer de regeneración, a una velocidad de flujo de 1 ml/min.

7) Se lavó el cartucho con 4ml de buffer de unión, a una velocidad de flujo de 1 ml/min, quedando listo para nueva aplicación de muestra.

8) Para preparar el cartucho para su almacenamiento, fue lavado con PBS (fosfatos 0.01M, NaCl 0.15M, pH 7.2) conteniendo 0.05% de azida de sodio. Se conservó a 4°C, (40).

5.4. Caracterización parcial de los anticuerpos monoclonales producidos.

5.4.1. Determinación del isotipo.

Solo se tipificó para IgG e IgM siguiendo el procedimiento de RIA ya descrito, utilizando en lugar de SN de cultivo de hibridomas,

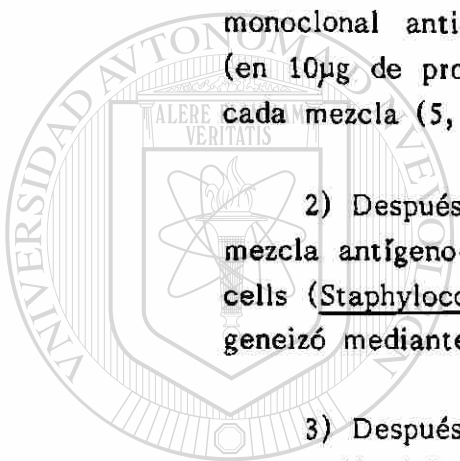
alícuotas sin diluir y diluidas 1:100, 1:500 y 1:1000 de las preparaciones del anticuerpo monoclonal purificado por afinidad. Como segundo anticuerpo se utilizó Igs de conejo anti-IgG de ratón marcadas con I-125 (120 $\mu\text{Ci/ml}$, actividad específica 10 $\mu\text{Ci}/\mu\text{g}$, se aplicaron - 0.2 $\mu\text{Ci/ensayo}$) e Igs de chivo anti-IgM de ratón marcadas con I-125 (114 $\mu\text{Ci/ml}$, actividad específica 5 $\mu\text{Ci}/\mu\text{g}$, se aplicaron 0.4 $\mu\text{Ci/ensayo}$), ambos reactivos de NEN Research Products (DuPont, Boston, MA).

5.4.2. Reacción con el antígeno gGT.

1) Se hicieron 4 mezclas de gGT purificada y el anticuerpo monoclonal anti-gGT, conservando constante la cantidad de gGT (en 10 μg de proteína enzimática) y variando la del anticuerpo para cada mezcla (5, 10, 15 y 20 μg de proteína de anticuerpo anti-gGT).

2) Después de incubar a 37 $^{\circ}\text{C}$ por una hora, se agregó a la mezcla antígeno-anticuerpo 0.2ml de una dilución 1:10 de Pansorbin cells (Staphylococcus aureus cells 10% p/v; Calbiochem) y se homogeneizó mediante suave movimiento circular.

3) Después de incubar a temperatura ambiente por una hora, se centrifugó la mezcla a baja velocidad durante 5 min y en el SN se determinó proteína y actividad de gGT.



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

IV. RESULTADOS

1. PURIFICACION PARCIAL DE LA ENZIMA gGT DE RIÑON DE CERDO.

La tabla I muestra los rendimientos en proteína y actividad de gGT obtenidos en las diferentes etapas del tratamiento a que fue sometido el extracto enzimático previo a la filtración en gel. La figura 1 corresponde al perfil de elución de la fracción enzimática gGT, de una columna de Sefacril S-200.

Tabla I.
PREPARACION DE LA MUESTRA DE
gGT PARA FILTRACION EN GEL.

Proteína enzimática	Proteína mg	Actividad gGT pmolas AMC.min ⁻¹ .µg prot. ⁻¹
Antes de centrifugar	38.4 ^a	350.0
SN1 ^b	25.518	529.0
pp1 ^c	12.0	262.0
SN2	8.273	1,921.0 ^d
pp2	3.17	55.0 ^d

- a. 38.4mg de proteína en 60ml; la proteína se estimó en 40µl y la actividad enzimática en 20µl 1:500.
- b. 25.518mg de proteína en 58ml, de éstos se sometieron a filtración en gel 57ml (25.08mg de proteína). La proteína se estimó en 60µl y la actividad enzimática en 20µl 1:100.
- c. 12.0mg de proteína en 2ml; la proteína se estimó en 60µl y la actividad enzimática en 20µl 1:100. Este residuo sólido se llevó a 10ml con el buffer Tris/HCl adicionado de Tritón X-100; después de centrifugar se obtuvieron 9.5ml de SN2 (con 8.273mg de proteína, estimada en 80µl) y 0.5ml de pp2 (con 3.170mg de proteína, estimada en 80µl). Del SN2 se filtraron en gel 9ml (7.84mg de proteína).
- d. Ambas actividades enzimáticas fueron estimadas en 20µl de la correspondiente muestra (SN2 y pp2) diluidos 1:100.

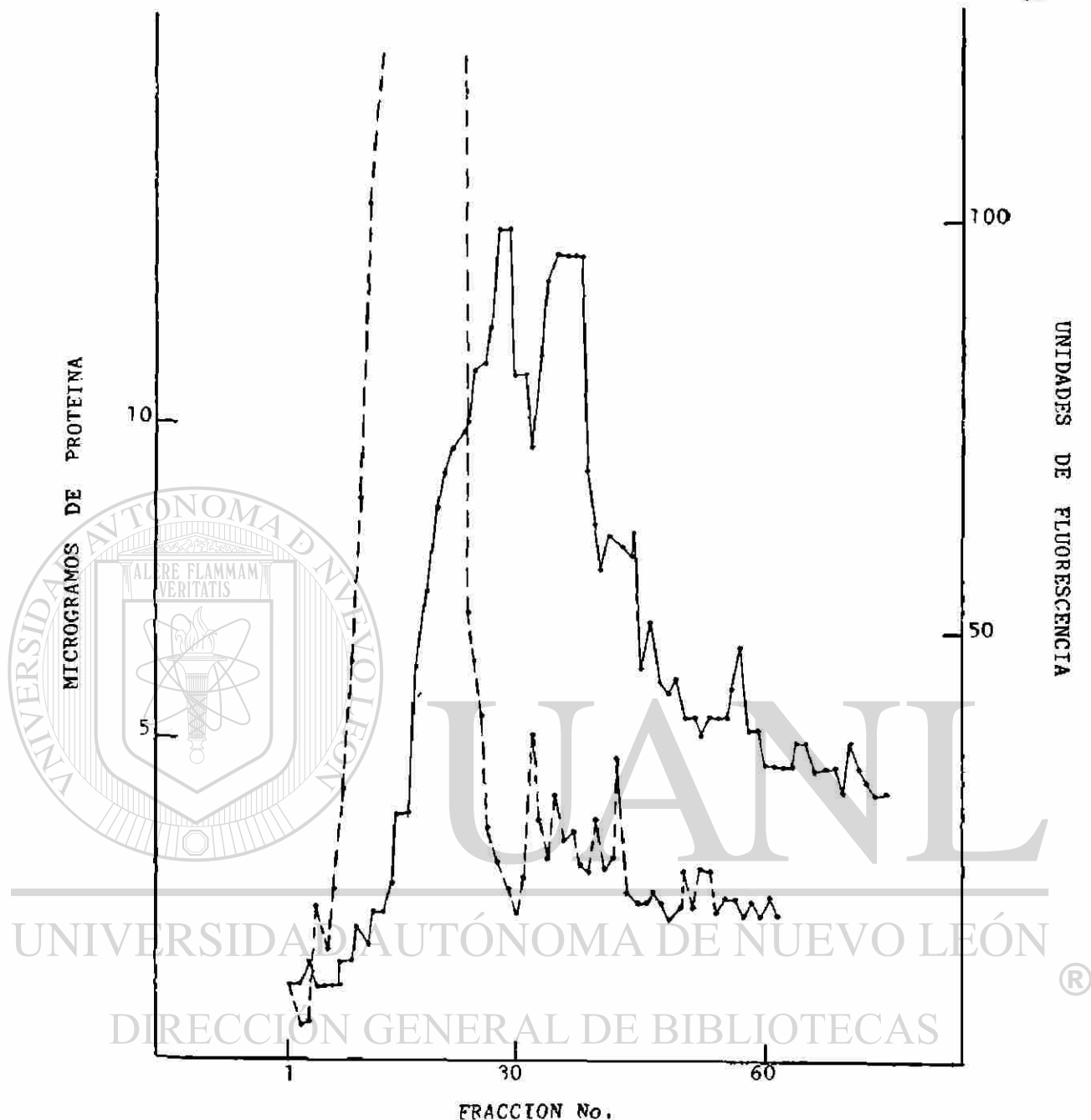


Figura 1. PERFIL DE ELUCION DE gGT.- El extracto de riñón porcino con actividad de gGT solubilizado en Tris/HCl-Tritón X-100 fue sometido a filtración en gel en una columna de 5.0x150.0cm de Sefacril S-200. La velocidad de flujo fue de 50ml/h y las fracciones (de 12ml cada una) comenzaron a colectarse a los 400ml de iniciarse la elución. Para cada fracción se determinó proteína (de acuerdo al procedimiento de Lowry, - línea continua) y actividad de gGT (fluorescencia, línea discontinua).

Es obvio que el Tritón X-100 favorece significativamente la solubilización de la enzima gGT en el buffer, así como la expresión de la actividad enzimática, pues de la preparación inicial de la enzima al SN2 la actividad específica aumentó 5.49 veces.

Por lo que respecta a la figura 1., en 73 tubos (870ml) se recuperó el 62.8% de la proteína total aplicada a la columna de Sefacril S-200 (20.67mg de 32.92mg); el contenido de los tubos 8 a 22 (180ml) se mezcló y después de concentrar el volumen final fue de 6.5ml con 2.383mg de proteína (7.24% de la proteína inicial) y actividad de gGT de $0.638 \text{nmolas de AMC.min}^{-1} \cdot \mu\text{g proteína}^{-1}$.

El volumen de elución de la fracción proteica con mayor actividad de gGT fue estimado en 980ml.

En SDS-PAGE se detectó una sola banda (contra 6 bandas que aparecían en la fracción original), localizada entre los marcadores de 66,000 y 45,000 de peso molecular.

En PAGE se detectaron 3 bandas en la fracción original (una de ellas muy amplia) y una banda en la muestra sometida a filtración en gel, única banda que resultó positiva a la tinción específica para la enzima gGT.

2. PURIFICACION DE LA ENZIMA FOSFATASA ALCALINA DE RIÑON DE CERDO.

Según la información de la Tabla II el proceso de filtración a través de Sefacril S-200 permitió reducir la cantidad de moléculas contaminantes y la actividad específica de la enzima se aumentó por un factor de 6. El tratamiento con neuraminidasa aumentó en 1.5 veces la purificación- (en función de la actividad enzimática) de la enzima fosfatasa alcalina. Con el paso final del tratamiento (cromatografía de afinidad) se logró una preparación proteica con actividad enzimática específica 15.5 veces mayor a la actividad de la preparación inicial.

En SDS-PAGE se detectó una sola banda (contra 4 bandas que aparecían en la fracción original) con corrimiento ligeramente menor al del marcador de 66,000 de peso molecular.

En PAGE se detectaron 4 bandas en la fracción original y una banda en la proteína enzimática recuperada de la cromatografía de afinidad, única que resultó positiva a la tinción específica para la enzima fosfatasa alcalina. ®

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

Tabla II.
ACTIVIDAD DE LA ENZIMA FOSFATASA ALCALINA
DE RIÑÓN DE CERDO DURANTE SU PURIFICACION.

Proteína enzimática	Proteína	Actividad FA
Original	9.934mg ^a	pmolas MU.min ⁻¹ .µg prot. ⁻¹ 330.6
Concentrada después de filtración en gel	7.152mg/5ml ^b	1,978.7
Tratada con neuraminidasa	6.570mg	2,800.4
Concentrada después de cromatografía de afinidad	5.716mg/6ml ^c	5,130.3

- a. Proteína total (del extracto liofilizado) sometida a filtración en gel en un volumen de 10ml; la proteína se estimó en 50µl y la actividad enzimática en 10µl.
- b. La proteína se estimó en 25µl y la actividad enzimática en 20µl 1:10.
- c. La proteína se estimó en un ml y la actividad enzimática en 20µl 1:50; la proteína recuperada representa el 57.54% de la proteína inicial.

3. INDUCCION DE ANTICUERPOS ANTI-gGT Y ANTI-FA, EN RATON.

Los resultados que se muestran en las tablas III y IV nos guiaron para seleccionar el ratón de mejor respuesta en anticuerpos hacia el antígeno seleccionado. Así, tanto para la producción de anticuerpos anti-gGT como anti-FA se escogieron los ratones número 1.

Tabla III.
ANTICUERPOS ANTI-gGT EN SUERO DE RATON.

		R A T O N			
		1	2	3	4
Dosis					
1a.	cpm ¹ : Dilución ² del suero:	10,000 1:8000	0 sin diluir hasta 1:8000	0 sin diluir hasta 1:8000	0 sin diluir hasta 1:8000
2a.	cpm: Dilución del suero:	28,000 1:4000	12,000 1:500	16,000 1:250	12,000 1:250
3a.	cpm: Dilución del suero	28,000 1:8000	13,000 1:1000	18,000 1:4000	12,000 1:1000
Título el día de la fusión	cpm: Dilución del suero:	25,000 1:8000			

- 1 Los valores de cpm están corregidos restando a cada uno su correspondiente testigo de reacción en ausencia de antígeno (que debe ser cuando menos 3 veces menor que las cpm fijadas en presencia de antígeno) y tomando en cuenta la radiactividad de fondo (850 ± 150 cpm, valor menor al 1% de la actividad inicial).
- 2 Solo se reporta la dilución de suero que mostró mayor unión de marca radiactiva.

Tabla IV.
ANTICUERPO ANTI-FA EN SUERO DE RATON.

		R	A	T	O	N
		1	2	3		
Dosis						
1a.	cpm ¹ :	1740	900	1054		
	Dilución ² del suero:	1:2000	1:2000	1:2000		
2a.	cpm:	2900	2100	1437		
	Dilución del suero:	1:30,000	1:30,000	1:30,000		
3a.	cpm:	5870	4150	5670		
	Dilución del suero:	1:30,000	1:30,000	1:2000		
Título el día de la fusión	cpm:	4900				
	Dilución del suero:	1:20,000				

- DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS
- 1 Los valores de cpm están corregidos igual que para la tabla anterior; en este caso el valor del fondo fue de 600 ± 100 cpm.
 - 2 Solo se reporta la dilución de suero que mostró mayor unión de marca radiactiva.

4. SENSIBILIDAD A AMINOPTERINA.

Las células de mieloma creciendo en fase log en el medio común de mantenimiento (HT-glutamina-gentamicina-10% SBF), murieron en el curso de 48 a 72 horas al ser cultivadas en presencia de aminopterina, contenida en el medio selectivo HAT, ya que su acción bloqueadora de la síntesis de novo de los ácidos nucleicos en unión de la carencia de la enzima HGPRT (requerida para la síntesis del ácido nucleico por la otra vía existente, la vía de recuperación de nucleótidos) impide el desarrollo y reproducción celular.

5. CULTIVO CELULAR EN FASE EXPONENCIAL.

El cultivo de células de mieloma (Sp2/0) en caja Petri de 100x20mm produjo rendimientos de 2 a 3.5×10^6 células/ml.

6. RESISTENCIA A 8-AZAGUANINA.

Los cultivos celulares sembrados 1:5 en el medio 8-AG lograron confluencia celular en 28-36 horas; los subcultivos derivados de éste la alcanzaron en 25-27 horas y una vez transferidas las células al medio común de crecimiento presentaron confluencia en 24 horas.

7. PREPARACION DE LA PLACA NODRIZA DE MACROFAGOS.

Se recuperaron 10ml de líquido de lavado peritoneal de dos ratones, conteniendo un total de 18.6×10^6 células (promedio de 9.3×10^6 células por ratón). En general la cantidad recuperada de líquido peritoneal fue prácticamente constante, 5 a 5.5 ml/ratón; en cambio, el número de macrófagos colectados varió en el rango de 5×10^6 a 9×10^6 células por ratón.

El excedente de células peritoneales fué sometido a cultivo en medio DMEM con 10% de SBF, colectándose cada 3 días los SN de cultivo para ser utilizados (después de centrifugación y filtración con $0.22\mu\text{m}$) como medios enriquecidos para el desarrollo de cultivos primarios o de cultivos iniciales de clonación.

8. PREPARACION DE LAS CELULAS DE MIELOMA PARA EL PROCESO DE FUSION.

Un día antes de efectuarse la fusión celular se sembraron 10 cajas Petri (100x20mm) con 10ml cada una de dilución 1:5 de un cultivo en fase log, confluyente; esto mismo se hizo 48 horas antes del día de la fusión con 5 cajas Petri y dilución 1:10 del cultivo confluyente en fase log. Comúnmente el número de células presentes en estos cultivos es suficiente para proporcionar células en condiciones óptimas y en la cantidad requerida (50×10^6 células de mieloma/ 100×10^6 de bazo para ser sembradas en 10 placas de 96 pozos cada una). En este caso los cultivos celulares rindieron en promedio 1.8×10^6 a 3.5×10^6 células/ml.

El depósito de células en el fondo del recipiente de cultivo es frecuente en los cultivos de más de 24 horas; si estas células no son resuspendidas fácilmente es preferible recolectar solo aquellas que se encuentran suspendidas o libres en el medio de cultivo.

9. PREPARACION DE LA SUSPENSION DE CELULAS DE BAZO INMU=

NE.

De un total de 6 bazos utilizados en diferentes intentos de fusión celular se obtuvo una cantidad promedio de 96 a 127×10^6 células/bazo.

10. FUSION CELULAR.

A los tres días de iniciarse la incubación de los productos de la fusión celular pudimos apreciar en aproximadamente el 10% de los microcultivos, indicios de desarrollo de hibridomas en la forma de pequeños agregados de hasta 8-10 células esféricas, de bordes lisos y notablemente refringentes a la luz. Tal resultado nos permitió suponer que sí habíamos tenido éxito al inducir la fusión celular; pero a la vez, este desarrollo celular pudiera haber correspondido a células de mieloma que no se fusionaron y que debido al corto tiempo de crecimiento en el medio selectivo HAT, aún eran capaces de reproducirse. Así pues, se procedió a demostrar la presencia de anticuerpos para los antígenos gGT (de una fusión) y FA (de una segunda fusión), en los SN de los cultivos.

11. IDENTIFICACION DE HIBRIDOMAS PRODUCTORES DE ANTICUERPOS ANTI-gGT Y ANTI-FA.

La identificación de hibridomas productores de anticuerpos contra el antígeno de interés se llevó a cabo investigando la presencia (mediante RIA) de los anticuerpos particulares en los SN de 3 días de cultivo de todos aquellos microcultivos derivados de la fusión celular en los cuales se tenía un mínimo de 50% de confluencia celular.

1) Anticuerpos anti-gGT.- A los 6 días de efectuarse la fusión celular para producción de anticuerpos anti-gGT se tenían 42 microcultivos confluentes y a los 9 días post-fusión se habían identificado 8 poblaciones celulares productoras de anticuerpos anti-gGT, 6 de ellas con cpm 2 veces arriba del testigo y las otras 2 con cpm 4 veces mayor al testigo (figura 2).

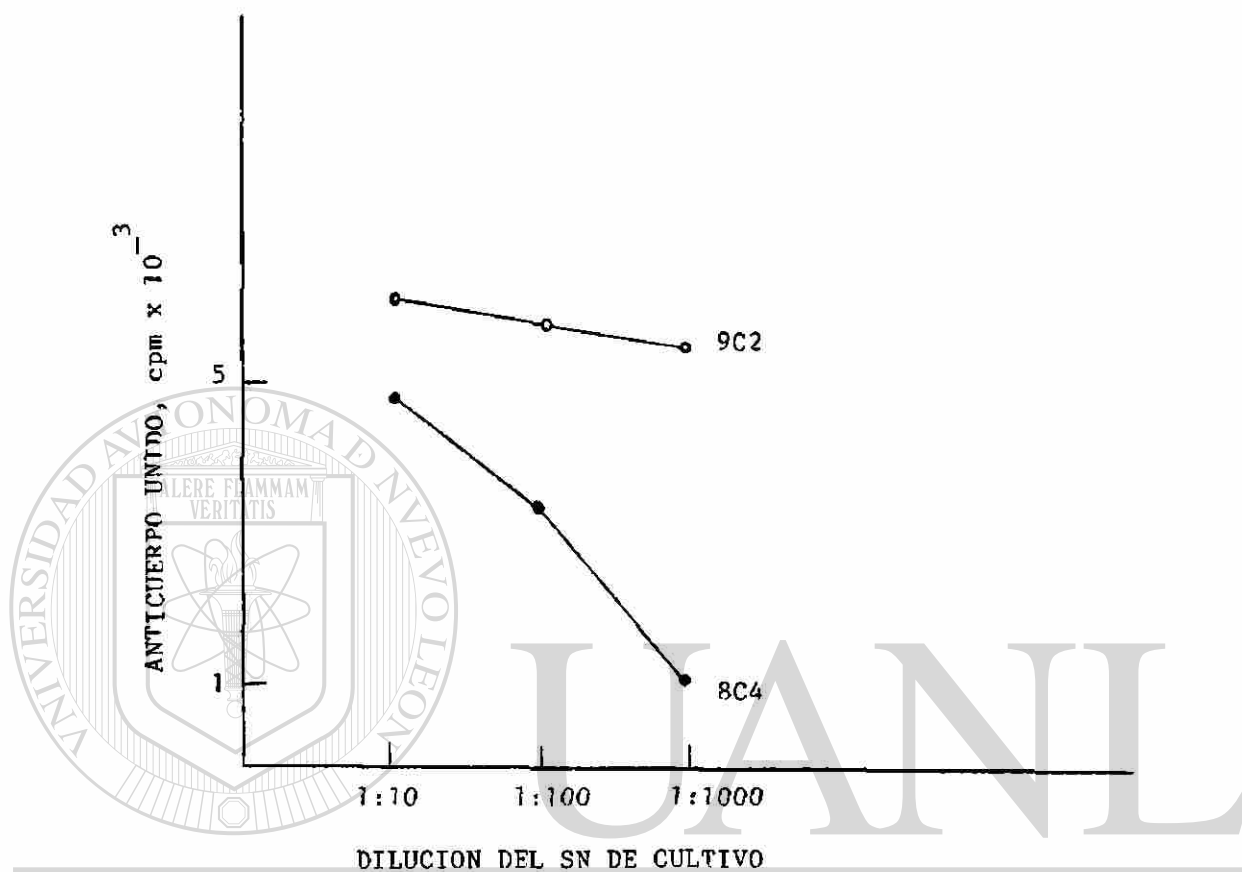


Figura 2. ACTIVIDAD EN ANTICUERPOS ANTI-gGT DE HIBRIDOMAS PRIMARIOS.- El microcultivo 8C4 mostró una actividad de 6,310/1,451 cpm (+Ag/-Ag = 4.3) y el microcultivo 9C2 una actividad de 8,259/2,116 (+Ag/-Ag = 3.9). La actividad fue estimada en 50 μ l de SN de 3 días de cultivo, en las diluciones señaladas, mediante RIA.

De los dos últimos microcultivos (denominados 8C4 y 9C2) se tomaron alícuotas para conservar por congelación unas y para expandir otras. De este proceso de expansión celular obtuvimos 4 nuevas poblaciones celulares, de las cuales a su vez, derivamos 5 y de éstas finalmente seleccionamos la población 8C4-la (denominada 8C4) para iniciar clonación (tabla V., figura 3.).

Tabla V.

RELACION DE LOS HIBRIDOMAS PRODUCTORES DE ANTICUERPOS ANTI-gGT SELECCIONADOS HASTA LA ETAPA PREVIA A LA CLONACION.

Micro-cultivo	D ¹	Micro-cultivo	D ¹
1. 9C2-5	2.8	1. 9C2-9a	4.2
2. -9	2.9	2. -9b	2.8
3. 8C4-1	3.9	3. 8C4-1a	22.9 ²
4. -7	3.2	4. -1b	11.6
		5. -1c	8.8

1 Los valores D corresponden al cociente de la relación de cpm unidas en presencia y en ausencia de antígeno.

2 Población con la cual se procedió a clonar.

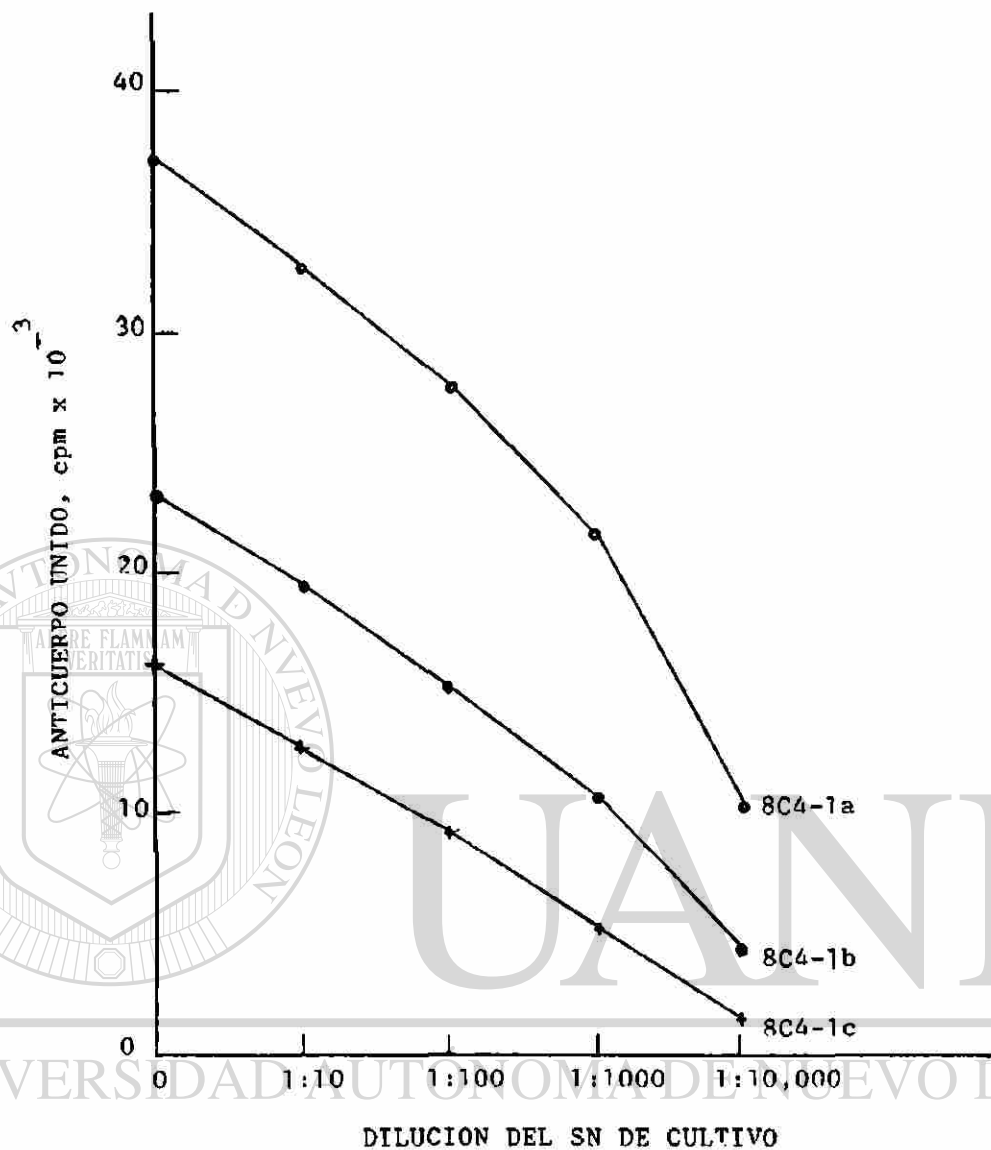


Figura 3. ACTIVIDAD EN ANTICUERPOS ANTI-gGT DE HIBRIDOMAS EN CLONACION.- El microcultivo 8C4-1a mostró una actividad de 39,030/1706cpm (+Ag/-Ag = 22.9), el microcultivo 8C4-1b una actividad de 25,407/2,193cpm (+Ag/-Ag = 11.6) y el microcultivo 8C4-1c de 18,551/2,119 (+Ag/-Ag = 8.8). La actividad fue estimada en 50µl de - SN de 3 días de cultivo, en las diluciones señaladas, mediante RIA.

células de poblaciones con los mejores rendimientos en los anticuerpos esperados.

12. CLONACION DE HIBRIDOS PRODUCTORES DE ANTICUERPOS ANTI-gGT Y ANTI-FA.

1) Anticuerpos anti-gGT.- El medio de cultivo para clonar la población 8C4 se enriqueció (en una proporción 1:1) con SN de cultivos previos de células 8C4. A los 3 días se tenía desarrollo celular en 3 de los pozos que habían recibido una sola célula. A los diez días de iniciarse el cultivo de clonación había crecimiento celular en los 15 pozos (de 3 placas) identificados inicialmente como contenedores de una sola célula. De aquí se seleccionaron 8 clonas con mayor producción de anticuerpos - anti-gGT y con mayor velocidad aparente de reproducción celular (estimada por el tiempo en el cual alcanzaron confluencia); los 8 SN dieron prácticamente la misma respuesta, alrededor de 38,000cpm, 25 veces mayor que la radiactividad basal. A los 13 días de iniciar clonación se seleccionaron 4 de los 8 microcultivos procediéndose a congelar y a reclonar una vez más:

Clona	D ¹
B11	25.00
C8	25.67
D4	28.22
D6	31.41

1 Los valores D corresponden al cociente de la relación de cpm unidas en presencia y ausencia de antígeno.

La producción de anticuerpos anti-gGT por las clonas B11, C8, D4 y D6, no fué afectada por la reclonación.

2) Anticuerpos Anti-FA.- Después del proceso de clonación logramos obtener 3 clonas productoras de anticuerpos anti-FA con un valor de 15.5 para la relación Ensayo en presencia de antígeno/Ensayo en ausencia de antígeno, y una fijación de cpm mayor de 15,000 en cada ensayo:

Clona	D ¹
FA-1	15.49
-2	15.63
-3	15.65

1 Los valores D corresponden al cociente de la relación cpm unidas en presencia de antígeno y en ausencia del mismo.

La producción de anticuerpos monoclonales anti-FA llegó hasta esta etapa del proceso.

13. PRODUCCION EN MAYOR ESCALA DE ANTICUERPOS MONOCLONALES CON ESPECIFICIDAD PARA gGT. ®

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

1) Producción in vitro.- Las poblaciones celulares de las clonas B11, C8, D4 y D6, fueron expandidas por transferencia, primero a placas de 24 pozos y luego a placas de 6 pozos, obteniéndose los siguientes valores de la producción de anticuerpos anti-gGT:

Clona	Cultivo en 24 pozos D	Placa de 6 pozos D
BII	1.7, 1.5, 2.0	3.8, 3.5
C8	1.5, 2.0, 1.8	1.7, 1.8
D4	2.5, 2.8, 3.0	18.0, 17.2
D6	32.0, 31.0, 33.0	29.0, 29.0

Los valores D representan el cociente de la relación de cpm unidas en presencia y ausencia del antígeno. Los 3 valores de la primera columna y los 2 de la segunda corresponden a diferentes microcultivos de la misma clona.

En virtud de que la clona D6 mostró mayor estabilidad en la producción de anticuerpos, seleccionamos dicha clona para continuar la expansión celular transfiriendo ahora el cultivo confluyente de un pozo de placa de 6 pozos a una caja Petri de 100x20mm; del cultivo confluyente se hicieron resiembras de diluciones 1:5 y 1:10 en caja Petri de 100x20mm, y

de dilución 1:5 en botella de cultivo conteniendo 50ml de medio HT-20% SBF (los resultados se muestran en la tabla VI.).

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

Tabla VI.

CARACTERISTICAS DE CULTIVO DE LA CLONA D6.

Cultivo en	Dilución	Tiempo de cultivo	cpm ¹	Observación
Caja 100x20mm	1:5	24 hs	12,813	Cultivo confluente a las 36hs de incubación.
		48	13,346	
		72	13,200	
Caja 100x20mm	1:10	24 hs	13,233	Confluencia a las 36hs de incubación.
		48	12,012	
		72	12,970	
Botella 50 ml	1:5	24 hs	13,494	Confluencia a las 24hs de incubación.
		36	13,642	
		48	13,573	
		72	13,597	

1 Los valores de cpm están dados por los anticuerpos contenidos en 50µl de SN de cultivo, teniéndose en estos ensayos una actividad basal de 1100 ± 100 cpm.

Un lote de 100ml de tales SN fué sometido a precipitación con sulfato de sodio (17) obteniéndose un rendimiento en proteína de 1.65mg/ml y una actividad en anticuerpos anti-gGT de:

cpm:	9,500	8,900	7,250	6,100	660
Dilución del anticuerpo:	sin diluir	1:10	1:100	1:1000	1:10,000

Los valores de cpm están corregidos con su testigo negativo y una radiactividad de fondo menor al 1% de la actividad inicial.

Por otra parte crecimos células de la clona D6 en el mismo medio HT pero variando el porcentaje de SBF en el medio (2.5, 5.0, - 7.5, 10.0, 12.5, 15.0, y 20.0%), logrando conservar la velocidad de replicación celular (medida por el tiempo en el cual se tiene confluencia celular) y la producción de anticuerpos anti-gGT, en el rango de 5 a 20% de SBF.

2) Producción de ascitis.- Además de intentar la producción de anticuerpos monoclonales anti-gGT por cultivo *in vitro* de hibridomas, lo intentamos por desarrollo *in vivo* (en cavidad peritoneal de ratón BALB/c) - de las células de la clona D6, con los resultados que se muestran en la tabla VII.

Tabla VII.

PRODUCCION DE ANTICUERPOS ANTI-gGT
EN ASCITIS.

Fuente de anticuerpos	Proteína mg/ml	Anticuerpos anti-gGT, cpm				
		Dilución				
		1:100	1:500	1:1000	1:5000	1:10,000
Líquido de ascitis	200.0	2,100	7,300	7,500	8,100	7,800
Líquido ascitis filtrado por 0.22µm	6.984	ND ¹	ND	ND	ND	ND
Líquido ascitis eluido de Affinica	0.0384	ND	ND	ND	ND	ND
Eluido concentrado	6.248	40,921	21,317	9,372	2,237	ND

1 No se determinaron.

14. DETERMINACION DEL ISOTIPO DE LOS ANTICUERPOS MONOCLONALES ANTI-gGT.

Se utilizó el anticuerpo monoclonal anti-gGT purificado por afinidad y concentrado a 6.248mg de proteína/ml; los resultados para la dilución 1:1000 de esta preparación del anticuerpo fueron:

1)	gGT	+	anti-gGT(1:1000)	+	(I-125)-anti-IgG ratón
	cpm	(+Ag/-Ag)	=	8,462/1754	(4.82)
				9,372/1975	(4.75)
2)	gGT	+	anti-gGT(1:1000)	+	(I-125)-anti-IgM ratón
	cpm	(+Ag/Ag)	=	9,748/5850	(1.66)
				11,398/6738	(1.69)

Estos resultados preliminares, pues solo se realizó una determinación por duplicado, señalan que el anticuerpo monoclonal anti-gGT es del isotipo G.

15. REACCION gGT/ANTI-gGT.

Los ensayos cuyos resultados se reportan en la tabla VIII fueron practicados con el propósito de investigar si la interacción entre el anticuerpo monoclonal anti-gGT y su antígeno tiene efecto inhibitor de la actividad de la enzima. Según los datos obtenidos, 5µg del anticuerpo monoclonal anti-gGT son suficientes para inhibir la actividad enzimática de 10µg de gGT (se detecta solo un 3.21% de la actividad de la enzima testigo); la mezcla de reacción entre 10µg de gGT y 20µg del anticuerpo monoclonal expresa 0.091% de la actividad del testigo.

Tabla VIII.
EFEECTO DE REACCION Ag/Ac SOBRE
LA ACTIVIDAD DE LA ENZIMA gGT.

Sistema de reacción ^a	Proteína µg (Lowry)	Actividad gGT pmolas ₁ AMC.min ⁻¹
1. SN 10µg gGT + 5µg Ac + P.c.	ND ^b	187.0, 165.0 ^c
2. SN 10µg gGT + 10µg Ac + P.c.	ND	65.0, 55.0
3. SN 10µg gGT +15µg Ac + P.c.	ND	4.0 4.0
4. SN 10µg gGT + 20µg Ac + P.c.	ND	6.0 4.0
5. SN 10µg gGT + P.c.	11.27, 11.60 ^c	5,915.0, 5,795.0
6. SN 100µg P.c.	ND	47.0, 35.0
7. 10ug gGT	10.0, 10.0	5,500.0, 5,415.0

- a. El sistema de reacción corresponde al SN obtenido al centrifugar a baja velocidad cada una de las diferentes mezclas del antígeno gGT, del anticuerpo monoclonal anti-gGT (Ac) y de las P.c. ("Pansorbin Cells" - 0.2ml de una suspensión al 1% p/v de células de Staphylococcus aureus).
- b. No detectable.
- c. Los dos valores de actividad de gGT y de proteína corresponden a duplicados.

V. DISCUSION

Los protocolos empleados para tratar de purificar los antígenos gGT y FA permitieron poner de manifiesto la utilidad del Tritón X-100 y de la enzima Neuraminidasa. Por una parte, es obvio que el detergente no iónico no solo facilita la solubilización de la enzima gGT en el buffer Tris, sino que además, favorece la actividad de la enzima, pues de la preparación inicial de la misma al SN2 la actividad específica aumentó 5.49 veces (tabla I); el detergente debió haber movilizó pequeños grupos, o quizá moléculas mayores, que de alguna forma limitaban la expresión de la actividad de la enzima gGT, por ejemplo, restringiendo el acceso del substrato al sitio activo de la enzima. Por lo que se refiere a la acción de la neuraminidasa (tabla II), pudiéramos sugerir que la eliminación de grupos de ácido siálico permite un mejor acceso del substrato al sitio catalítico, y/o la exposición de centros catalíticos ocultos por tales residuos de carbohidrato.

Cuando se llevó a cabo la determinación de anticuerpos anti-gGT y anti-FA en suero de ratón, observamos que a bajas diluciones séricas (menores a las reportadas, Tablas III y IV), ocurría elevada unión inespecífica (en ausencia del antígeno) en tanto que diluciones mayores a las reportadas no fueron utilizadas debido a la baja fijación de marca radiactiva, dato que tomamos como indicador de una pequeña cantidad de anticuerpo, capaz de reaccionar con el antígeno (gGT o FA). La gran diferencia en las diluciones utilizadas de los sueros anti-gGT y anti FA, se debe a que los últimos mostraron muy elevada unión inespecífica (testigos en ausencia de antígeno).

El mantenimiento de células en la etapa log de la curva de expansión de un cultivo celular se ha seleccionado como parámetro indicador de que en una población celular virtualmente el 100% de las células se encuentra en condiciones metabólicas óptimas. Esta práctica, por su fidelidad con respecto a las características celulares, su sencillez y rapidez, ha ido substituyendo a los ensayos de viabilidad y metabolismo celulares. Para conservar las células en fase log es requisito indispensable, además del medio de cultivo adecuado, suficiente superficie para la expansión celular. Dos de nuestras observaciones concuerdan con este requisito: Una vez que las células llegan a confluencia en el medio de cultivo se sobreponen unas en otras y se depositan en el fondo del recipiente de cultivo, lo cual aparentemente disminuye el contacto celular con los nutrientes disueltos en el medio y las células caen en fase estacionaria y finalmente en muerte celular. Por otra parte, la cantidad de inmunoglobulinas (anti-gGT) permanece constante después de que el cultivo ha alcanzado confluencia (los valores para 24, 48 y 72 horas de cultivo se reportan en la tabla VI).

La resistencia a 8-AG, y por lo tanto el desarrollo celular en un medio que contiene 8-AG (15-20 $\mu\text{g}/\text{ml}$), es el marcador aparente de la ausencia de la enzima HGPRT. El cultivo en este medio de las células de mieloma que van a ser utilizadas en la fusión con esplenocitos, es crucial en el momento de eliminar las células de mieloma que no fueron fusionadas, pues la persistencia de células HGPRT positivas contamina gravemente los cultivos post-fusión, en los cuales es muy difícil distinguir el desarrollo de hibridomas del de mielomas; además, las células de mieloma se desarrollan más rápido que los hibridomas, enmascarando primero los escasos hibri-

domas productores del anticuerpo esperado y conduciendo luego a la desaparición de los mismos, simplemente por competencia de nutrientes y de espacio.

Al momento de preparar las suspensiones de células de bazo inmune fue notable la diferencia en volumen que presenta un bazo extraído de un ratón inmunizado i.p. con el antígeno en ACF y un bazo procedente de un ratón inmunizado, también i.p., pero con el antígeno en salina: El primero fue aproximadamente 2 veces mayor que el segundo; sin embargo, no se realizó ningún trabajo para investigar diferencias en cuanto a cantidad de células linfoides, a nivel de la respuesta en anticuerpos específicos del antígeno de interés, o en cuanto a la eficiencia de la fusión en términos de hibridomas productores de anticuerpos en general y específicos del antígeno en particular.

La representación gráfica de la relación Anticuerpo Unido versus - - Dilución del Anticuerpo (figuras 2 y 3), permite apreciar más fácilmente el comportamiento de la actividad de los anticuerpos en función de su concentración. Así, la gráfica facilita una rápida comparación de la información obtenida para varios microcultivos: el nivel de anticuerpos en el cultivo, el título del mismo en anticuerpos específicos del antígeno de interés y la cantidad de marca radiactiva con la cual aparecen en el ensayo, la probable presencia de proteínas (incluyendo anticuerpos no específicos) que enmascaran la reacción de los anticuerpos de la especificidad deseada (sugerida - por una pendiente que tiende a cero y porque la unión del anticuerpo esperado debe aumentar a mayor dilución del mismo), y la predicción de la coexis-

tencia de una o más líneas celulares en el cultivo (también por el valor de la pendiente, un valor que tiende a cero sugiere mayor heterogeneidad en la población celular).

Aplicando estos criterios a las gráficas de los microcultivos 9C2 y 8C4 (fig.2), nos pareció este último más prometedor ya que aunque la cantidad inicial de anticuerpo no era muy diferente para ambos cultivos, sí lo era el comportamiento en actividad de anticuerpos anti-gGT al diluir el SN; de tal comportamiento esperábamos tener baja cantidad de proteínas inespecíficas (que se puede comprobar también con la menor unión inespecífica del testigo sin antígeno) y mayor riqueza en células productoras del anticuerpo específico. Estas deducciones fueron confirmadas con los resultados que se muestran en la tabla V, obtenidos durante el proceso de expansión celular de los cultivos 9C2 y 8C4. Por lo que se refiere a los subcultivos de 9C2, solo podemos sugerir que no había células altamente productoras de anticuerpos anti-gGT en el cultivo primario, que si las había las perdimos durante el proceso de expansión celular, o bien, que durante este proceso las células perdieron cromosomas codificantes de los anticuerpos anti-gGT.

Al comparar la producción de anticuerpos anti-gGT y anti-FA por las clonas D6 y FA respectivamente, no puede explicarse fácilmente la gran diferencia en los valores registrados; si asumimos que las clonas productoras de ambos tipos de anticuerpos son poblaciones celulares puras en desarrollo óptimo, y que la diferencia en densidad celular es tan pequeña que no afecta esta comparación, podemos sugerir que la diferencia se debe a algún factor genético: ¿cantidad de genes que codifican para el anticuerpo específico?, -

¿regulación de la expresión de tales genes?; por otra parte, revisando el sistema de detección de los anticuerpos, ¿podríamos asignar la menor fijación de anticuerpos anti-FA, a una baja densidad de epitopos específicos en el antígeno FA en comparación con el antígeno gGT?

En función de la producción de anticuerpos anti-gGT (tabla VI), tal parece que no hay diferencia en sembrar células en densidad correspondiente a las diluciones 1:5 y 1:10 (siempre y cuando la resiembra sea de células en fase log), pero consideramos que sí hay diferencia al sembrar en caja y en botella la misma densidad celular, ya que en el segundo caso la confluencia se logra 12 horas antes que en el primero. Además, es claro que una incubación mayor a las 36 horas (para una población celular confluyente), no conduce a niveles más altos de producción de anticuerpos. Si ahora comparamos los valores de proteína y actividad en anticuerpos anti-gGT del eluido concentrado de la columna de afinidad y de la fracción globulínica precipitada de los SN de cultivo de hibridomas, es obvia la diferencia en ambos parámetros y en consecuencia la mayor eficiencia de la producción de anticuerpos monoclonales en líquido de ascitis: 3.8 veces más proteína de anticuerpos con 5.65 veces mayor actividad anti-gGT, para la dilución 1:100 (tabla VII).

Tratando de identificar alguna característica del complejo gGT/anti-gGT se desarrollaron los ensayos de la tabla VIII. Los resultados nos llevaron a proponer que el anticuerpo monoclonal anti-gGT interacciona directamente con el centro catalítico de la enzima gGT o bien, con algún sitio vecino al mismo, resultando en este caso la inhibición enzimática de una modificación conformacional (en el sitio catalítico mismo o en el sitio de reacción con el

anticuerpo, la cual afectaría también al centro catalítico), o pudiera también ser resultado de un efecto alostérico que impide o limita el acceso de sustrato al sitio activo de la enzima.



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

®

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

VI. CONCLUSIONES

1. Se obtuvieron los extractos purificados de gGT y FA de riñón porcino, con un grado aceptable de pureza, para la producción de los anticuerpos monoclonales, sin cambiar sus características antigénicas

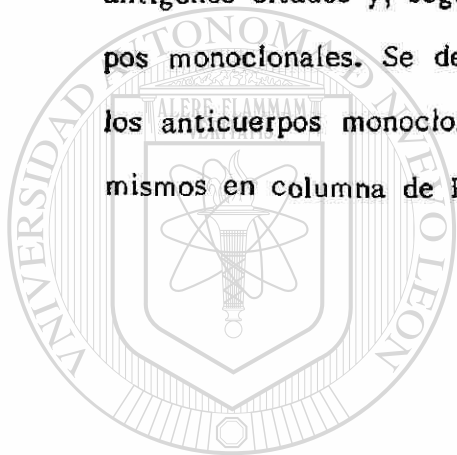
2. Los ratones BALB/c (hembras), respondieron a los antígenos solubles gGT y FA de epitelio renal de porcino, mediante la síntesis y liberación a la corriente sanguínea de los anticuerpos en niveles detectables por el procedimiento de RIA utilizado.

3. La administración i.p. de los antígenos gGT y FA en ACF, estimuló en bazo la formación de células plasmáticas específicas de los antígenos gGT y FA en cantidad tal que pudo desarrollarse una adecuada población de células híbridas productoras de los anticuerpos deseados, de las cuales se partió para hacer crecer los correspondientes hibridomas.

4. Como resultado de 2 procesos de fusión se logró el aislamiento de clonas productoras de anticuerpos con especificidad hacia las enzimas gGT y FA. Tanto por reproducción in vitro como in vivo de las clonas anti-gGT se obtuvieron los respectivos anticuerpos monoclonales que fueron purificados por cromatografía de afinidad en columna de Proteína A de S. aureus; el proceso de producción de anticuerpos monoclonales anti-FA se condujo hasta la etapa de desarrollo in vitro. Las eficiencias de fusión fueron de 88.45% y 80.40% para gGT y FA respectivamente y el rendimiento en anticuerpos monoclonales anti-gGT fue de 1.65 mg/ml por cultivo in vitro y de 6.248 mg/ml por cultivo in vivo.

VII. RESUMEN

Se reportan los protocolos que se siguieron para preparar los antígenos solubles gama-glutamil transferasa y fosfatasa alcalina (de riñón porcino), para estimular respuesta inmune humoral, hacia tales antígenos en ratones BALB/c, y para inducir fusión celular que condujera primero, a la formación de híbridos inmortales productores de anticuerpos con especificidad hacia los antígenos citados y, segundo, a la producción de los correspondientes anticuerpos monoclonales. Se describe también la metodología para la producción de los anticuerpos monoclonales en líquido de ascitis, y para la purificación de los mismos en columna de Proteína A.



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

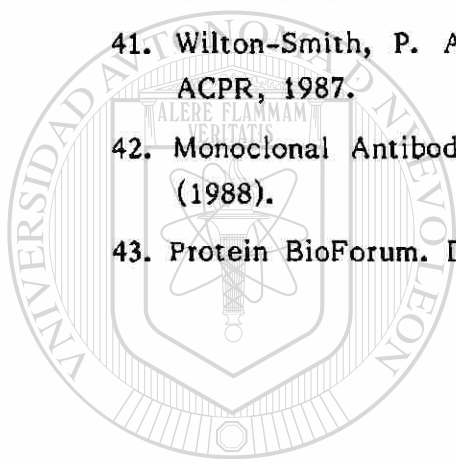
VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.

1. Clausen, J. Técnicas Inmunoquímicas para la Identificación y Estimación de Macromoléculas. El Manual Moderno, 1975.
2. Turk, J.L. Inmunología en Medicina Clínica. El Manual Moderno, 1977.
3. Fudenberg, H.H. y col. Inmunología Clínica. El Manual Moderno, 1978.
4. Stites, D.P. et al. Basic and Clinical Immunology. Appleton and Lange, 1987.
5. Roitt, I. et al. Immunology. C.V. Mosby Company, 1985.
6. Roitt, I. Essential Immunology. Blackwell Scientific Publications, 1988.
7. Johnstone, A. and Thorpe, R. Immunochemistry in Practice. Blackwell Scientific Publications, 1982.
8. Hämmerling, G.J. and Kearney, F.J., eds. Monoclonal Antibodies and T - Cell Hybridomas. Elsevier/North-Holland, 1981.
9. Köhler, G. and Milstein, C. Continuous culture of fused cells secreting antibody of predefined specificity. Nature 255;495(1975).
10. Milstein, C. Monoclonal antibodies. Sci. Am. 243;66-74(1980).
11. Bander, N.H. Monoclonal antibodies: state of the art. J.Urology 137;603-612(1987).

12. Thompson, K.M. Human monoclonal antibodies. Immunol. Today 9,4;113-117(1988).
13. Phaff, H.J. Industrial microorganisms. Sci. Am. 245,3;77-89(1981).
14. Irvin, A.D. Techniques and applications of cell fusion and hybridisation: an introduction. The Veterinary Record 98;351-356(1976).
15. Howard, Ph. L. and Trainer, Th. D. Radionuclides in Clinical Chemistry. Little, Brown and Company, 1980.
16. Goding, J.W. Monoclonal Antibodies: Principles and Practice. Academic Press, 1986.
17. Walker, J.M., ed. Methods in Molecular Biology, 1. Proteins. Humana Press, 1984.
18. EMBO, SKMB, eds. Hybridoma Techniques. Basel Institute Course, 1980.

19. Cooton, R.G.H. and Milstein, C. Fusion of two immunoglobulin producing myeloma cells. *Nature* 244;42(1973).
 20. de St.Groth, S.F. and Scheidegger, D. *Production of Monoclonal Antibodies: Strategy and Tactics*. Elsevier/North-Holland Biomedical Press, 1980.
 21. Smith, G.D., Ding, J.L. and Peters, T.J. A sensitive fluorimetric assay for gamma-glutamyl transferase. *Anal. Biochem.* 100;136-139(1979).
 22. Dubach, U.C., ed. *Enzymes in Urines and Kidney*. Williams and Wilkins Co., 1968.
 23. gamma-Glutamyl Transpeptidase. *Sigma Bulletin No. 545(3-76)*.
 24. Fischer, L. *Introducción a la Cromatografía en Gel. El Manual Moderno*, 1975.
 25. *Gel Filtration Theory and Practice*. Pharmacia.
 26. Cornish, C.J., Neale, F.C. and Posen, S. An automated fluorometric alkaline phosphatase microassay with 4-methyl-umbelliferyl phosphate as a substrate. *Am. J. Clin. Path.* 53;68-76(1970)
 27. Mossuer, E., Boll, M. and Pfeleiderer, G. Alkaline phosphatase purification. *Hoppe-Seyler's, Z. Physiol. Chem.* 361;543-549(1980).
 28. Hames, B.D. and Rickwood, D., eds. *Gel Electrophoresis of Proteins*. IRL Press Limited, 1984.
-
29. Silver Stain Detection System. NEN-DuPont.
 30. Artur, Y. et al. Complexes of serum gamma-glutamyltransferase with apolipoproteins and immunoglobulin A. *Clin. Chem.* 30/5, 631-633(1984).
 31. Bankert, R.B. et al. Screening and replica plating of anti-hapten - - hybridomas with a transfer template hemolytic spot assay. *J. Immunol. Meth.* 35;23-32(1980).
 32. Lowry, O.H. et al. *J. Biol. Chem.* 193;265(1951).
 33. *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals*. DHEW Publication No. (NIH)78-23, Revised 1978.
 34. Gueffroy, D.E., ed. *Buffers, a Guide for the Preparation and Use of Buffers in Biological Systems*. Calbiochem, 1981.
 35. Cobbold, and Waldmann, Therapeutic potential of monovalent monoclonal antibodies. *Nature* 308;460-462(1984).

36. Ey, P.L. et al. Isolation of pure IgG₁, IgG_{2a} and IgG_{2b} immunoglobulins from mouse serum using protein A-Sepharose column chromatography. *Immunochemistry* 15;429-436(1978).
37. Langone, J.J. Applications of immobilized protein A in immunochemical techniques. *J. Immunol. Meth.* 55;277-296(1982).
38. Manil, L. et al. Evaluation of protocols for purification of mouse monoclonal antibodies. *J. Immunol. Meth.* 90;25-37(1986).
39. Menefee, B. and Protzman, W. Monoclonal antibody purification systems. *Am. Biotech. Lab.* 6,2;34-38(1988).
40. Affinica; Scheicher & Schvell, Inc.
41. Wilton-Smith, P. Automating the production of monoclonal antibodies. ACPR, 1987.
42. Monoclonal Antibody Purification. *Pharmacia Separation News*, vol. 13.4 (1988).
43. *Protein BioForum*. DuPont 1,2;1-7(1980).



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

®

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS