

Generación de hidromas secretores de anticuerpos monoclonales anti-fibronectina humana plasmática Generation of hidromas secretory of antibodies monoclonal plastic human antifibrous

Dr. Roberto Bolaños Escofet ¹, Lic. Ubaldo Torres Romo ², Dra. María Lina Jiménez Pardo ³, Dra. Nilda Sánchez Treto ⁴, Téc. Nury Benítez Rosales ⁵, Téc. Yudith Hernández González ⁶.

RESUMEN

Se obtuvieron cuatro anticuerpos monoclonales secretados por hibridomas generados mediante la fusión del mieloma P3/x63.Ag8.653 con linfocitos esplónicos de ratones inmunizados con fibronectina purificada a partir del plasma humano.

Se seleccionó el anticuerpo monoclonal F1Fn-R/1-B2/A1 para realizar los estudios de especificidad de este tanto por la molécula utilizada como antígeno como por la que se encuentra en el plasma.

Se demostró que el anticuerpo monoclonal reconoce la molécula de fibronectina plasmática humana.

PALABRAS CLAVE: FIBRONECTINA, HIBRIDOMA, ANTICUERPO MONOCLONAL.

1. Doctor en Medicina Veterinaria
2. Profesor de Bioquímica
3. Profesora de Agentes Biológicos
4. Profesora de Anatomía Humana
5. Técnica en Procesos Biológicos
6. Técnica en Higiene

INTRODUCCION

La glicoproteína fibronectina (FN) se conoció en 1948 como un contaminante del fibrinógeno del plasma. Se pudo aislar mediante el método de fraccionamiento frío de Cohn's, y como se precipitaba a 4 grados Celsius, el nombre original fue globulina fría insoluble (1). Más tarde fue caracterizada y se encontró que era el mayor componente del plasma humano (2). Su nombre en latín significa fibras de enlazamiento ya que es capaz de unirse a fibras colágenas de tejido conectivo (3).

Se encuentra en dos formas: una soluble presente en el plasma a una concentración de 0.3 mg/ml y otra altamente insoluble, llamada fibronectina celular o de tejido asociada, la cual timolecular compuesto por dos subunidades unidas por puente disulfuro con pesos moleculares aproximadamente de 230.000 y 250.000 Daltons (5).

Se ha reportado que la FN está directamente envuelta en ciertos mecanismos de defensa del hospedero funcionando como una opsonina no inmune que ayuda al sistema retículo endotelial a eliminar los restos de células, bacterias y agregados de hongos. Se sugiere que estimula la producción de interleuquina 1 por los monocitos (6).

En tejidos humanos normales la inmunoreactividad de la FN se presenta como pequeños filamentos de tejido conectivo extracelulares y de membranas basales (7).

El papel de la FN en los procesos malignos de la mama ha sido ampliamente estudiado. Ensayos in vitro han demostrado que se produce FN en células, malignas y benignas, de epitelio mamarios de ratón, rata y humanos en cultivos y, además, estos mismos tejidos, mostraron inmunoreactividad para esta glicoproteína por métodos de tinción inmunocitoquímicos (8).

La inmunoreactividad de la FN demostrada en células epiteliales de mama in vivo ha sido un gran hallazgo, la reacción más intensa se ha observado en células tumorales con crecimiento individual y en poblaciones celulares de carcinomas indiferenciados, así como, en células metastásicas de nódulos linfáticos (9).

En nuestro país no existen reportes de anticuerpos monoclonales (AcM) contra la FN. En los últimos años, se comercializan, en varias casas, productos que pueden emplearse en técnicas de

inmunohistoquímica para la detección de FN en células en cultivo, secciones de tejido congelado y como un marcador discriminante entre carcinomas invasivos pequeños y lesiones proliferativas benignas de mama. También para la cuantificación de esta molécula por inmunodifusión radial, la inmunofijación y determinación por electroforesis de esta proteína en el suero. Se oferta, además, como una fracción de inmunoglobulina G (IgG) antifibronectina conjugada con peroxidasa.

El objetivo del trabajo consiste en obtener hibridomas secretores de AcM que reconozcan a la fibronectina humana plasmática.

MATERIALES Y METODOS

Antígeno:

El extracto antigénico de FN humana plasmática con una concentración de proteínas de 1500 ug/ml fue suministrado por el Instituto Nacional de Hematología e Inmunología.

Inmunización:

Se realizaron dos esquemas de inmunización con 4 grupos de seis ratones Balb/c hembras de seis a ocho semanas de edad y peso corporal entre 22 y 24 g. En los grupos I y II se empleó el método escrito por Williams y colaboradores (10) y en los grupos III y IV un esquema de inmunización tópico (11, 12). (Tablas 1 y 2).

Fusión, cultivo y clonaje de hibridomas:

Se realizaron dos fusiones independientes, siguiendo los principios básicos descritos por Kohler y Milstein (13) con algunas modificaciones (14). Las células esplónicas se hibridaron en proporción 10:1 con el mieloma P3/x63.Ag8.653, empleando polietilenglicol y se sembraron en placas de 96 pozos (Nunc), a una concentración de cien mil células por ml de medio, y 150 ul por pozo. El medio de cultivo selectivo empleado fue DMEM-F12 (1:1) (Sigma Chemical Company), suplementado con 10% de suero fetal de ternera (Tecnomara), 26 mM de bicarbonato de sodio, 18 mM de HEPES, 2 mM de L-glutamina, 1 mM de piruvato de sodio, 0.05 mM de 2-mercaptoetanol y antibiótico, al cual se le añadió hipoxantina hasta 0,03 mM, timidina hasta 3 uM y aminopterina hasta 0.4 uM.

A los 14 días se eliminó la aminopterina del medio, y se comenzó el ensayo de anticuerpos en los sobrenadantes de los cultivos de hibridomas que exhibían buen crecimiento. Los cultivos de hibridomas secretores de anticuerpos específicos se clonaron y reclonaron por dilución limitante, y se expandieron progresivamente para su criopreservación e inoculación a ratones.

Ensayo inmunoenzimático tipo ELISA para la detección de anticuerpos en los animales inmunizados y cultivos de hibridomas:

Se desarrolló un método de captura de anticuerpos en placa de 96 pozos, la determinación se llevó a cabo por un sistema ultramicroanalítico. Se recubrieron las placas durante 12 horas, a 4 grados Celsius con 10 ul por pozo, de una solución cuyo contenido era 5 ug de FN por ml de tampón de recubrimiento. Las placas se lavaron y se añadió 10 ul de suero de ratón o sobrenadante de cultivos de hibridomas a cada pozo. Después de una hora a 37 grados Celsius, las placas se lavaron y se incubaron una hora con el conjugado anti-inmunoglobulina de ratón en conejo con fosfatasa alcalina. Después de tres lavados, se adicionó el sustrato y se dejó reaccionar 30 minutos a temperatura ambiente.

Purificación del AcM:

La purificación del AcM a partir de líquido ascético se realizó por cromatografía de afinidad con Proteína A Sepharosa (Pharmacia).

Ensayo de especificidad de los AcM por immunoblotting.

Electroforesis:

Se utilizó SDS-PAGE en PhastGel, gradiente 10-15 con tampones discontinuos, donde se corrieron muestras de FN pura y plasma humano preparados sin inclusión de 2-mercaptoetanol en el tampón de muestra.

Immunoblotting:

Las proteínas separadas por electroforesis fueron transferidas a una membrana de nitrocelulosa (NC). Luego del bloqueo, con leche descremada al 4% durante una hora, se incubaron los anticuerpos

durante 18 horas a 4 grados Celsius. Posterior al lavado, se añadió la anti-inmunoglobulina de ratón en conejo biotinilada 1:1000 (Dakopatts) 1 hora a 37 grados Celsius, luego del lavado, se adicionó el complejo avidina/biotina (Dako) 1 hora a 37 grados Celsius y después de un último lavado, la reacción se reveló al añadir el sustrato 3-Amino-9-ethylcarbazole (AEC) (Sigma Immuno Chemical).

Cuantificación de inmunoglobulina G (IgG):

Se cuantificó por el sistema inmunoenzimático de fase sólida que se produce en el Centro de Inmunología Molecular.

RESULTADOS Y DISCUSION

De los esquemas de inmunización empleados resultó el que se aplicó a los grupos de animales III y IV, donde se obtuvo títulos de anticuerpos desde 1:5000 hasta 1:20 000. En los grupos I y II los títulos de anticuerpos fueron inferiores a 1:1000. Estos resultados no coinciden con los de Williams y colaboradores (10), quienes utilizaron el esquema para obtener anticuerpos de alta afinidad.

De los grupos III y IV se seleccionó el animal de mayor título para llevar a cabo la fusión celular. Diez días después, se evaluó la misma, los resultados se muestran en la tabla 3. Los cuales coinciden con reportes anteriores y superan otros resultados. Valores de eficiencia de fusión superiores al 60% son considerados como muy satisfactorios (12, 15).

El tamizaje de los 234 pozos, donde se observó crecimiento de células híbridas concluyó con la selección de ocho hibridomas altamente secretores de anticuerpos anti-fibronectina humana, el hibridoma F1Fn-R/1-B2 se sometió a un primer clonaje, donde el 100% de los clones obtenidos secretaban anticuerpos específicos. El hibridoma F1Fn-R/1-B2/A1 seleccionado se sometió a un segundo clonaje y se obtuvieron resultados iguales al anterior, lo que demuestra su monoclonalidad (12). Por último, se eligieron cuatro hibridomas para la confección de un banco de trabajo y posterior caracterización.

Los valores de cuantificación de IgG se muestran en la tabla 4.

Con los resultados obtenidos del inmunoblotting se demostró la especificidad de reconocimiento del AcM. Al enfrentarlo a la fibronectina y al plasma humano se observó una sola banda que se corresponde, en ambos, con el patrón de 340 000 Daltons.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Morrison PR, Edsall JT, Miller SG. Preparation and properties of serum and plasma proteins XVIII. The separation of purified fibrinogen from fraction I of human plasma. *J Am Chem Soc* 1948; 70:3103-08.
2. Mosesson MW, Umfleet RA. The cold-insoluble globulin of human plasma. *J Biol Chem* 1970; 245:5728-36.
3. Engvall E, Rouslahti E. Binding of soluble form of fibroblast surface protein, fibronectin, to collagen. *Int J Cancer* 1977; 20:1-5.
4. Mosher DF. Physiology of fibronectin. *Ann Rev Med* 1984; 35:561-75.
5. Zardi L, Cianfriglia M, Balza E, Carnemolla B, Siri A, Croce CM. Species-specific monoclonal antibodies in the assignment of the gene for human fibronectin to chromosome 2. *EMBO J* 1982; 1:929-33.
6. Beezhold DH, Lause BD. Stimulation of rat macrophage interleukin 1 secretion by plasma fibronectin. *Immunol Invest* 1987; 16:437-49.
7. Stenman S, Vaheri A. Distribution of a major connective tissue protein, fibronectin, in normal human tissues. *J Exp Med* 1978; 147:1054-64.
8. Yang N-S, Kirkland W, Jorgensen T, Furmanski P. Absence of fibronectin and presence of plasminogen activator in both normal and malignant human mammary epithelial cells in culture. *J Cell Biol* 1980, 84:120-30.
9. Joffe EBDK, Puricelli L, Mariotto R, Eijan AM, de Lustig, ES. Fibronectin and laminin expression in breast cancer and lymph node metastases. Lack of correlation with fibronectin plasmatic levels. *Medicina (Buenos Aires)* 1988; 48:499-505.

10. Williams DJL, Newson J, Naessens I. Quantitation of bovine immunoglobulin isotypes and allotypes using monoclonal antibodies. *Vet Immunol Immunopathol* 1989; 24:267-283.
11. Fernández A, et al. Utilización de líneas celulares de cáncer mamario humano en la obtención de anticuerpos monoclonales que reconocen tejido tumoral. *Interferón y Biotecnología* 1986; 3:125-138.
12. Gavilondo J. Manual teórico-práctico sobre tecnología de obtención y producción de anticuerpos monoclonales murinos. CIGB: C. de la Habana, 1988.
13. Kohler G and Milstein C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature* 1975; 256:495-497.
14. Sorell L, Fernández ME, Penton E, Lopez J, Perez IC. Producción y características de anticuerpos monoclonales contra lipoproteínas que contienen apoproteína. *B. Interferón y Biotecnología* 1986; 3:239-241.
15. Freyre M., et al. Anticuerpos monoclonales que reconocen los factores de crecimiento epidérmico humano y murino. *Interferón y Biotecnología* 1989; 6(1):32-43.

ANEXOS

Tabla 1. Esquema de inmunización empleado en los grupos I y II

Subgrupo A: Donantes de esplenocitos.
DIA 0: Inoculación de 100 g de FN + ACF, 0.2 ml, IP.
Subgrupo B: Receptores de esplenocitos.
DIA 27: Irradiación con 600 rads de Cobalto-60
Subgrupo A:
DIA 28: Sacrificio y obtención de esplenocitos.
Subgrupo B:
DIA 28: Trasplante de 20 millones de células + 25 g de FN,
DIA 33: Sangría. Evaluación de títulos.
Día 34: FUSION.

Tabla 2. Esquema de inmunización empleado en los grupos III y IV

Día	Dosis Adyuvante	Vía Administración
0	100 Completo 0,2 ml	IP
7	100 Incompleto 0,2 ml	IP
14	100 Incompleto 0,2 ml	IP
17	Sangría-evolución de títulos	
21	50-0,1 ml	IV
24	Fusión	

Tabla 3. Evaluación de la fusión

Pozos sembrados	Pozos con crecimiento	% de híbridos Eficiencia
288	234	81.25
No de hibridomas	Primer clonaje	Segundo clonaje seleccionados

Tabla 4. Resultados de la cuantificación de IgG de los sobrenadantes de cultivo metabolizado correspondientes a los hibridomas seleccionados

AcM	Hibridoma	IgG (ug/ml)
1B-2	A1/A11	9,55
1B-2	A1/C2	10,70
1B-2	A1/C10	9,90
1B-2	A1/F7	10,30