



11661  
2  
2-21  
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

Facultad de Estudios Superiores  
"CUAUITLAN"

ENRIQUECIMIENTO DE CLONAS PRODUCTORAS  
DE ANTICUERPOS CONTRA EL VIRUS DE LA  
RABIA MEDIANTE TRANSFERENCIA ADOPTIVA  
INTRAESPLENICA

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

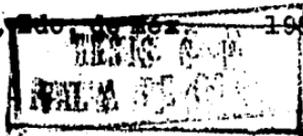
MAESTRA EN CIENCIAS  
(Asea Microbiología)

P R E S E N T A :

ALMA VIRGINIA LARA SAGAHON

Directores Dr. Alvaro Aguilar Setien Dr. Abel Ciprián Carrasco

Cuautitlán Izcalli, México, D.F. 1988





## **UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso**

### **DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

## CONTENIDO

1 INTRODUCCION	1
1.1 Generalidades	1
1.2 Anticuerpos monoclonales en Virologia	2
1.3 Rabia	3
1.3.1 Caracteristicas generales	3
1.3.2 Propiedades del virus	5
1.3.3 Anticuerpos monoclonales en investigaciones sobre el virus de la rabia	7
1.4 Metodologia para la producción de anticuerpos monoclonales	10
1.5 Modificaciones a la metodologia básica	17
2 OBJETIVOS	21
2.1 Planteamiento de objetivos	21
2.2 Diseño experimental	22
3 MATERIAL Y METODOS	26
3.1 Producción de antígeno de virus rábico y titulación	26
3.1.1 Virus	26
3.1.2 Cultivos celulares	26
3.1.3 Producción de virus	26
3.1.4 Titulación	27

3.2 Inmunoensayo enzimático en	
papel de nitrocelulosa (dot-ELISA)	27
3.2.1 Sensibilización del papel	
de nitrocelulosa	27
3.2.2 Determinación de anticuerpos	27
3.3 Transferencia adoptiva intraesplénica	29
3.3.1 animales	29
3.3.2 Inmunización de donadores	29
3.3.3 Células de bazo	29
3.3.4 Inoculación intraesplénica	30
3.4 Determinación del peso del bazo	33
3.5 Estudio histológico	33
3.6 Determinación del número de	
células de bazo productoras	
de anticuerpos específicos	34
3.6.1 Fundamento de la metodología	34
3.6.2 Experimentos	35
3.6.3 Procedimiento	37
3.7 Producción de células	
híbridas productoras de	
anticuerpos.	37
3.7.1 Preparación de timocitos	
y macrófagos	37
3.7.2 Células	38
3.7.3 Células de bazo	39
3.7.4 Fusión	39
3.7.5 Clonación	40

3.8 Analisis estadístico	41
4 RESULTADOS	43
4.1 Producción de antígeno de virus de la rabia y titulación	43
4.2 Título de anticuerpos en ratones donadores y receptores	43
4.3 Peso de los bazo	47
4.4 Estudio histológico	52
4.5 Determinación del número de células de bazo productoras de anticuerpos específicos	54
4.6 Fusión	63
5 DISCUSION Y CONCLUSIONES	69
6 BIBLIOGRAFIA	78

LISTA DE FIGURAS

	Página
1A Inmovilización e incisión del ratón receptor.	31
1B Inoculación intraesplénica de linfocitos en el ratón receptor.	32
2 Esquema de la técnica de réplica en papel de nitrocelulosa para la cuantificación de células productoras de anticuerpos en el bazo.	36
3 Título de anticuerpos en ratones donadores y receptores.	46
4 Media $\pm$ error estándar del peso del bazo de ratones receptores y ratones donadores.	50
5 Tamaño comparativo de los bazos de un ratón donador (A) y un ratón receptor (B).	51
6A Vaina periarteriolar en el bazo de un ratón receptor 4 días después de la transferencia adoptiva.	53
6B Células mononucleares tipo linfoide alrededor de la arteriola de un receptor.	53
7 Prueba de réplica en papel de nitrocelulosa. Puntos desarrollados en el lugar en donde se encontraba una célula productora de anticuerpos (unidad formadora de punto, UFP).	55
8 Media ( $\pm$ ) error estándar del número de células de bazo productoras de anticuerpos en los grupos experimentales III, IV y V.	58
9 Media del número de células de bazo productoras de anticuerpos en los grupos experimentales para determinar el efecto de cepa y/o ciclofosfamida y/o tipo de antígeno.	62
10 Rectas de regresión lineal entre: (A) el promedio de hibridomas y (B) el promedio de hibridomas productoras de anticuerpos específicos contra el número de células de bazo.	66

- 11 Prueba de inmunofluorescencia indirecta sobre impronta de cerebro de ratón infectado con virus de la rabia realizada con uno de los AM producidos.

LISTA DE CUADROS

Cuadro	Página
1 Grupos experimentales y pruebas realizadas en cada uno de ellos para comprobar la hipótesis planteada.	24
2 Grupos experimentales para determinar los efectos de cepa, tratamiento con ciclofosfamida y antígenos en el número de células productoras de anticuerpos.	25
3 Título de anticuerpos de ratones donadores y ratones receptores obtenidos por la prueba dot-ELISA.	44
4 Tabla de ANOVA de la transformación logarítmica del título de anticuerpos en ratones donadores y receptores.	45
5 Peso de bazo de ratones donadores y ratones receptores.	48
6 Tabla de ANOVA y prueba de Tuckey ( $\alpha=0.05$ ) de los resultados del peso de los bazos de ratones donadores y receptores.	49
7 Unidades formadoras de puntos en ratones inmunizados convencionalmente y ratones receptores <sup>6</sup> (UFP/10 células de bazo).	56
8 Tabla de ANOVA y prueba de Tuckey ( $\alpha=0.05$ ) <sup>6</sup> de las UFP obtenidas por 10 células de bazo en ratones inmunizados convencionalmente y en receptores.	57
9 Resultados de las UFP/10 <sup>6</sup> células de bazo en los grupos experimentales para determinar el efecto de cepa y/o ciclofosfamida y/o antígenos.	60

10	Tabla de ANOVA para determinar el efecto de cepa y/o ciclofosfamida y/o antígenos sobre las UFP/ <sup>6</sup> 10 células de bazo.	61
11	Efectos principales de los factores cepa, <sup>6</sup> ciclofosfamida y tipo de antígenos sobre las UFP/10 células de bazo.	62
12	Crecimiento de hibridomas en diferentes concentraciones de células de bazo.	65
13	Frecuencia de clones y de clones productoras de anticuerpos en diferentes concentraciones de células de bazo.	66

## RESUMEN

Se desarrolló una metodología de transferencia de linfocitos que permitió enriquecer el bazo del receptor con clonas productoras de anticuerpos contra el virus de la rabia y de esta manera se aumentó el rendimiento de la producción de hibridomas productores de anticuerpos contra este virus. Se transfirieron linfocitos de un ratón inmunizado contra el virus de la rabia y mezclados con este mismo antígeno a 2 receptores singénicos no inmunes, uno de los cuales había sido tratado con ciclofosfamida, la inoculación de esta mezcla se realizó intraesplénicamente. Se compararon el título de anticuerpos, peso del bazo, aspecto histológico del bazo y número de células de bazo productoras de anticuerpos específicos entre donadores y receptores. No se encontró diferencia significativa entre el título de anticuerpos de donadores y receptores. El aspecto histológico tanto de donadores como de receptores mostró la estructura típica de un bazo estimulado, con vainas periarteriolas hiperplásicas y numerosos centros germinales. El peso del bazo y el número de células productoras de anticuerpos específicos fue significativamente mayor en receptores que en donadores ( $p < 0.01$ ), en ninguna de estas pruebas se encontró diferencia entre receptores tratados con 1mg de ciclofosfamida y los no tratados. Se realizaron fusiones con 2 bazos de ratones receptores no tratados con ciclofosfamida. Se detectó la presencia de anticuerpos por la prueba Dot-ELISA en 30 de 144 pozos sembrados.

Se determinó el efecto sobre el número de células de bazo productoras de anticuerpos específicas de ratones receptores de las variables: 1) tipos de antígenos presentes en la suspensión viral (relevantes o contaminantes), 2) tratamiento con 2 mg de ciclofosfamida y 3) transferencia utilizando cepa ERA o cepa Acatlán V319. Se encontró que con los antígenos relevantes o el tratamiento con ciclofosfamida o la cepa Acatlán V319 se detectaron un mayor número de células productoras de anticuerpos específicos.

## INTRODUCCION

### 1.1 Generalidades

La inmunización de los animales es un proceso que induce una respuesta humoral heterogénea, ya que se producen distintos anticuerpos contra cada uno de los determinantes antígenicos, producto de cientos o miles de clonas secretoras. Una de las desventajas de este proceso es que entre estos productos policlonales se encuentran anticuerpos dirigidos contra antígenos indeseables.

Kohler y Milstein (1975) iniciaron una nueva era en la investigación inmunológica al demostrar que las clonas individuales de células secretoras podían ser immortalizadas por fusión con células de mieloma.

La generación de hibridomas productores de anticuerpos monoclonales (AM) resolvió muchas de las limitaciones de un suero hiperinmune convencional, ya que con ellos fue posible producir cantidades ilimitadas de anticuerpos con el grado de especificidad, afinidad y propiedades de acuerdo a necesidades particulares.

Desde su descubrimiento los AM se han aplicado en casi todas las ramas de la biología, lo cual es un reflejo de su utilidad práctica. Los estudios citados a continuación son algunos ejemplos del empleo de los AM: radioinmunoensayo de hormonas y drogas, pruebas de histocompatibilidad, localización y clasificación de tumores, inmunoterapia y purificación

de moléculas por cromatografía de afinidad (Melchers, *et al.*, 1978, Koprowski *et al.*, 1978). Además han resultado una herramienta invaluable en áreas como la infectología, parasitología, neuroquímica y embriología. Por otro lado dentro de la misma inmunología los AM han identificado moléculas en la superficie de los linfocitos que ha permitido clasificarlos en subpoblaciones (Carter y Meulen, 1984 ; McDade, 1985; Yelton, *et al.*, 1981).

## 1.2 Anticuerpos monoclonales en Virología

Aguilar y Kretschmer (1985) mencionaron las siguientes aplicaciones como las mas frecuentes de los AM en virología:

1. La localización de los sitios antigénicos de las proteínas virales, con el fin de examinar las bases moleculares de su variación.
2. La serotipificación de los virus en grupos, subgrupos, tipos, subtipos, etc.
3. La localización y definición de las proteínas codificadas por el genoma viral, su expresión y excreción celular.
4. El aislamiento en forma pura de los diferentes componentes relacionados, tales como el interferón.
5. La detección de proteínas de origen viral que se expresan en cantidades muy pequeñas.
6. El análisis de la habilidad protectora de los AM dirigidos

contra los diferentes componentes virales, así como la habilidad protectora de las diferentes clases de anticuerpos.

7. La estandarización del diagnóstico de las enfermedades virales.

8. El aislamiento de proteínas virales y sus RNA mensajeros como primer paso para la clonación molecular de los antígenos de interés.

### 1.3 La Rabia

#### 1.3.1 Características generales

La rabia es una enfermedad ampliamente distribuida en el mundo, sólo aquellos países con límites naturales tales como Australia, las Islas Británicas, Islandia y algunas otras islas han podido mantenerse libres de esta enfermedad (Espmark y Grandien, 1983; Davis *et al.*, 1978; Shope, 1984).

El virus de la rabia es único por su capacidad para infectar a todos los mamíferos, los cuales en su forma salvaje constituyen un reservorio amplio e incontrolable de la enfermedad, formando de esta manera un peligro constante para el hombre y los animales domésticos (Espmark y Grandien 1983, Davis *et al.*, 1978).

En los países industrializados la rabia de tipo urbano transmitida al humano por perros y gatos está prácticamente eliminada, predominando la rabia de tipo "silvestre". En

Europa occidental esta enfermedad reapareció en 1966 después de un periodo de 36 años en el cual se la había considerado practicamente erradicada. Desde entonces esta enfermedad ha permanecido en la región, presentándose en su forma silvestre, principalmente en el zorro rojo (Vulpes vulpes), el cual transmite la enfermedad a los bovinos y estos a su vez representan la principal fuente de contaminación humana (Aguilar-Setién et al., 1986; Sureau, 1985; Steek y Wandeler, 1980).

En las regiones tropicales y subtropicales de América Latina el perro continúa siendo el principal vector transmisor de la infección humana. En estas zonas el vampiro es el vector "reservorio" de la rabia "selvática" y son estos mamíferos los que transmiten la enfermedad a los bovinos. Particularmente en México se calculan pérdidas de 30 000 bovinos por año causadas por la rabia selvática (Hernández, 1976). La rabia urbana por su parte es responsable de aproximadamente 80 casos registrados al año de infección humana (Aguilar-Setién et al., 1986).

La rabia es una enfermedad letal para los animales superiores, incluyendo el hombre. El virus es estrictamente neurotrópico, se replica en las neuronas y se disemina a través de los axones y células nerviosas desde el sitio de la infección al sistema nervioso central. El virus no se ha detectado en la sangre de animales infectados (Davis et al., 1978; Koprowsky y Wiktor, 1981; Shope, 1985).

La transmisión ocurre por mordeduras y solo en muy raras ocasiones por inhalación o rasguños (Koprowski y Wiktor, 1981).

### 1.3.2 Propiedades del virus

El virus de la rabia pertenece a la familia Rhabdoviridae, género Lyssavirus. Los viriones son partículas con envoltura que presentan una forma cilíndrica con una extremidad redondeada y la otra plana similar a la forma de un proyectil. Sus dimensiones son de 175x70 nm (Davis et al., 1978; Luria et al., 1978; Kucera y Myrvik, 1985).

La envoltura contiene 1500 unidades de una proteína de membrana no glicosilada con peso molecular (PM) de 25.3 KDalton, designada como proteína M, y 1800 unidades de una glicoproteína (G) con un PM de 67 KDalton la cual forma las proyecciones o espículas del virión. En la proteína G reside la capacidad de inducir la formación de anticuerpos neutralizantes, además es responsable de la adherencia del virión a las células y actúa como hemaglutinina con los glóbulos rojos de ganso (Davis et al., 1978; Luria et al., 1978; Dietzchold et al., 1983).

La nucleocápside esta constituida por una molécula de ARN, una proteína N con un PM de 55.5 KDalton y una ARN polimerasa formada por dos polipéptidos, uno de alto PM (L, "large", 185 KDalton) y otro mas pequeño (NS, "non structural", 37.5 Kdalton). La molécula de ARN es de cadena sencilla y polaridad negativa y tiene un peso molecular de 3.5 a 4.6 millones de Dalton (Luria et al., 1978; Davis et

al., 1978; Espmark y Grandien, 1983).

La proteína más abundante de la nucleocápside es la N con 1800 unidades por virión. Con respecto a la ARN polimerasa cada virión contiene de 30 a 60 y 950 unidades de L y NS respectivamente (Dietzchold et al., 1978).

El virus penetra a las células por un proceso de fusión de membranas. En el citoplasma el ARN(-) participa en dos procesos: 1) replicación, en el cual se generan cadenas de ARN positivas y negativas. La síntesis del ARN (-) que formará parte del virión requiere de un molde de ARN(+). Se ha demostrado que la cadena ARN(+) que utiliza en la replicación no es precursora de los ARNm. 2) transcripción, la transcriptasa tiene un sitio promotor único en el genoma al cual copia secuencialmente produciéndose finalmente los ARNm monocistrónicos (Luria et al., 1978, Kucera y Myrvik, 1985).

Las tres proteínas de la nucleocápside son necesarias en ambos procesos, las proteínas L y NS actúan como polimerasas, mientras que la N debe de estar asociada al ARN para que este funcione como molde (Luria, et al., 1978, Kucera y Myrvik, 1985)

Una característica de estos virus es la generación de viriones incompletos. Estos son más cortos que las partículas normales y contienen solo una porción del ARN. Los viriones incompletos interfieren en la multiplicación del virus de tal manera que si se efectúan pases continuos de un lote de virus, se alcanza rápidamente una preponderancia de estas

partículas (Luria et al., 1978; Kucera y Myrvik, 1985).

Las nucleocápsidas se concentran en el citoplasma celular formando los cuerpos de inclusión que se observan mediante las técnicas de inmunofluorescencia y microscopía electrónica (Luria et al., 1978).

### 1.3.3 Anticuerpos monoclonales en investigaciones sobre el virus de la rabia

La aplicación de la nueva tecnología de los AM ha dado como resultado un conocimiento amplio de las características epidemio-inmunológicas de la rabia. Uno de los problemas resueltos con el empleo de los AM fue el de la variabilidad antigénica del virus; esto se demostró con la obtención de mutantes resistentes a la neutralización. La producción de estas variantes se ha logrado tanto in vivo como in vitro. La metodología in vitro implica el cultivo del virus en presencia de un determinado anticuerpo neutralizante (Wiktor y Koprowsky, 1978). Estas variantes permitieron analizar la estructura antigénica de la proteína G; de esta manera se determinaron 3 y 5 sitios antigénicos independientes en la proteína G de las cepas ERA y CVS, respectivamente (Koprowski y Wiktor, 1981; Lafon et al., 1983).

Por otro lado, se han producido variantes in vivo mediante la aplicación de dos metodologías: a) aislamiento del virus de ratones infectados y tratados posteriormente con un AM neutralizante y b) incubando el virus in vitro con el anticuerpo previamente a la inoculación en el ratón (Lafon et al., 1983). La variabilidad antigénica obtenida en estos

experimentos sugiere un posible mecanismo para la generación de la diversidad antigénica entre las cepas de virus de rabia existente en la naturaleza.

La selección de variantes resistentes a la neutralización ha sido aplicada en la caracterización de los determinantes antigénicos que definen la patogenicidad. Coullon *et al.* (1982) emplearon un grupo de variantes de las cepas CVS y ERA, seleccionadas con el AM 194-2, producido por Wiktor y Koprowsky (1980). Estas variantes presentaban características de patogenicidad muy peculiares ya que no mataban a los ratones adultos inoculados intracerebralmente, pero sí a los recién nacidos. Posteriormente se caracterizó el sitio de variación como una sustitución del aminoácido en la posición 333 de la secuencia de la proteína G (Flamand *et al.*, 1985). Dietzschold *et al.* (1983) observaron que las cepas no patógenas Flury-HEP y Kelev, son también resistentes a la neutralización por el AM 194-2, sugiriendo que este determinante antigénico puede ser esencial para la patogenicidad.

Los AM purificados específicos contra la glicoproteína, se han empleado para la producción de anticuerpos anti-idiotípicos. Esto fue realizado por Reagan *et al.* (1983) quienes inmunizaron conejos inyectándoles AM de ratón contra los sitios antigénicos de neutralización de la glicoproteína rábica. Con los anticuerpos anti-idiotípicos producidos por estos conejos se inmunizaron ratones en los cuales se comprobó la presencia de anticuerpos neutralizantes. En conclusión, este estudio demostró que un anticuerpo anti-

idiotípico puede simular la estructura antigénica de la glicoproteína viral de tal manera que es capaz de inducir la formación de un anticuerpo neutralizante (Reagan *et al.*, 1983).

En el campo de la ingeniería genética, los AM han permitido determinar si los virus vaccinia recombinantes que expresan el gene de la proteína G son biológicamente funcionales, ya que se observó que los recombinantes que indujeron la formación de anticuerpos neutralizantes y protegieron contra el desafío con virus patógeno reaccionaron con un panel de AM. Estas funciones no las realizaron los recombinantes que no reaccionaron con el panel de AM (Wiktor *et al.*, 1984; Kieny *et al.*, 1984).

La aplicación de los AM contra virus de la rabia que puede ser mas importante en nuestro medio es la diferenciación de cepas. Con los AM ha sido posible caracterizar las diferencias antigénicas entre virus de la rabia y virus estrechamente relacionados (Duvenhage, "Lagos-bat" y Mokola). También se han establecido diferencias entre los virus aislados de diferentes zonas geográficas, especies y entre cepas vacunales (Sureau *et al.*, 1983; Wiktor y Koprowsky, 1980; Flamand *et al.*, 1980).

De estos estudios se ha concluido que la mayoría de la cepas europeas, tienen patrones de reacción similares frente a los AM utilizados y que todas ellas presentan homología antigénica con la cepa Pitmann More (PM) que es la cepa utilizada en la fabricación de la vacuna producida en células diploides humanas, sin embargo algunas cepas provenientes de

Asia y Africa no presentaron la reactividad cruzada requerida para ser neutralizadas con la cepa PM (Shope, 1984).

Cabe mencionar que en México las características antigénicas de las cepas provenientes de vampiros y de perros han sido poco estudiadas, así como tampoco se han comparado las cepas vacunales con las cepas patógenas (Aguilar-Setién *et al.*, 1986).

#### 1.4 Metodología para la producción de anticuerpos monoclonales.

A pesar de que la tecnología de la producción de hibridomas ya está bien establecida, los pasos involucrados son muchos y cada uno de ellos se puede efectuar de diferentes maneras. La diversidad de trabajos publicados al respecto reflejan los problemas biológicos individuales. Los métodos varían en velocidad, confiabilidad y costo. Por lo tanto, cada investigador debe seleccionar y adaptar las estrategias publicadas a necesidades individuales.

Las etapas importantes en la producción de AM son:

**Selección del donador de linfocitos inmunes.** Existen tres especies con las cuáles se han podido producir hibridomas: el ratón, la rata y el humano. En la mayoría de los casos las ventajas prácticas hacen que el ratón sea el animal más utilizado, sin embargo existe la posibilidad de que se desee un anticuerpo contra una proteína de ratón para la cuál no

haya variantes genéticas, en este caso la rata será utilizada como donador de linfocitos inmunes (Reading, 1982).

**Selección de la línea celular.** Los tres principales criterios de selección de una línea de células de mieloma para la hibridación con linfocitos B inmunes son : 1) que no produzca cadenas ligeras ni pesadas de inmunoglobulinas, 2) que los híbridos producidos sean estables y 3) que proporcione un rendimiento alto de hibridomas (Reading, 1982).

La presencia de marcadores genéticos de resistencia es el fundamento para la selección de las células híbridas. Comúnmente se emplea la selección en medio HAT desarrollada por Littlefield (1964), ésta se basa en el hecho de que las células resistentes a la 8-azaguanina carecen de la enzima hipoxantina-guanina fosforibosil transferasa (HGPRT). Cuando la vía principal de biosíntesis de guanosina se bloquea por la aminopterina (un antagonista del ácido fólico) la enzima HGPRT convierte los nucleótidos de hipoxantina o guanina a guanosina. De esta manera las células HGPRT negativas mueren en un medio que contenga aminopterina e hipoxantina (medio HAT), pero las células híbridas sobreviven debido a que el linfocito les confiere la información genética para la síntesis de la HGPRT (Reading, 1982).

Otros métodos de selección desarrollados son: resistencia a 5-bromo-2'-desoxiuridina (BrDU), resistencia a ouabaina, inhibición biosintética reversible o por inhibidores reversibles (Reading, 1982). La inhibición irreversible de las proteínas de membrana de las células de mieloma se ha

realizado con compuestos tales como la yodacetamida y el dietilpircarbonato, estos compuestos reaccionan con grupos sulfhidrilos y amino libres, respectivamente. Las células tratadas mueren, pero pueden ser recuperadas por fusión con células no tratadas (Reading, 1982). Por otro lado, el tratamiento prolongado con inhibidores reversibles tales como la cicloheximida que interfiere en la síntesis de proteínas o como la actinomicina D que bloquea la síntesis de ARN causan la muerte celular lo cual se puede evitar por hibridación con células no tratadas.

Actualmente existen diversas líneas de células de mieloma principalmente de ratón ya que el sistema murino ha sido mas estudiado y se cuenta con un mayor número de líneas que cumplen los criterios antes mencionados. Las líneas de mieloma murino mas comunes son la P3.X63.Ag8.653, NS-1 y SP2/0. Sin embargo, no existe un criterio uniforme acerca de cuál línea produce mayor número de hibridomas. Por ejemplo, Fazekas y Scheideger (1980) indican que la 653 es mas efectiva que la SP2/0; Thiriart (1984) por el contrario obtiene un rendimiento muy alto con la línea SP2/0; Lane (1985) observó que la línea FOX-NY producida por Taggart y Samloff (1983) mejora el rendimiento de la línea SP2/0. Revisando la literatura se puede observar que existe aleatoriedad en la selección de la línea de mieloma dependiendo quizá mas de la disponibilidad, no obstante con cualquiera de ellas se obtienen rangos de hibridación desde  $10^4$  hasta  $10^7$  por bazo (Yelton et al., 1978; Goding, 1980).

**Inmunización.** Esta etapa es muy importante debido a que dependiendo de la respuesta lograda con el antígeno utilizado se obtendrá la proliferación de las clonas deseadas y relevantes. Sin embargo, la diversidad de protocolos de inmunización muestra la variabilidad de la respuesta inmune. En general se han hecho las siguientes recomendaciones: realizar la fusión 3 o 4 días después del último estímulo antigénico, debido a que en este tiempo existe una gran proliferación inducida por el antígeno; no hiperinmunizar con inyecciones múltiples y si estas son necesarias es importante reposar el animal algunos meses y estimular 3 o 4 días antes de la fusión (Reading, 1982; Stahl *et al.*, 1980).

La inmunización *in vitro* ha sido ensayada con éxito para producir hibridomas secretores de anticuerpos contra antígenos diversos (Anderson y Melchers, 1978; Hartgartner *et al.*, 1978; Reading, 1982; Van Ness *et al.*, 1984).

No obstante, Goldsby *et al.* (1978) produjeron hibridomas secretores de anticuerpos contra el hapteno dinitrofenilo, sin inmunización previa del donador de células esplénicas y estimulando la proliferación de linfocitos con el lipopolisacárido bacteriano.

**Fusión.** Los detalles precisos de los protocolos de fusión, varían entre los distintos laboratorios, ya que relativamente pocos investigadores han estudiado los diversos parámetros de esta etapa.

Fazekas y Scheidegger (1980) y Westwewould *et al.* (1984) observaron que la formación de hibridomas está determinada principalmente por el número de células de bazo, Westwewould

et al. en este mismo estudio encontraron que la proporción óptima entre células de bazo y células de mieloma es de 10:1, no obstante, otros autores han obtenido buenos resultados utilizando proporciones que van desde 1:1 hasta 10:1 (Yelton et al., 1978; Thiriart, 1984; Lane et al., 1984; Buttin et al., 1978).

Inicialmente las fusiones se realizaban utilizando como agente fusionante el virus Sendai (VS), pero actualmente se utiliza casi exclusivamente el polietilenglicol (PEG), puesto que es más eficaz y no constituye un elemento de contaminación como el VS.

Existen diversas marcas comerciales de PEG en presentaciones de diferentes pesos moleculares. Fazekas y Scheideger (1980) encontraron que la preparación Merck 4000 GK (Cat. No. 9727) produjo más hibridomas que otros. Sin embargo, Lane et al. (1984) reportaron que el PEG marca Kodak 1450 proporciona aún mejores rendimientos que el Merck 4000 GK.

El tiempo de exposición al PEG es otro punto crítico de la fusión, debido a que no puede ser muy corto porque se obtienen pocos híbridos ni muy largo porque aumenta la toxicidad. Lane (1985) midió diferentes tiempos de exposición y encontró que el tiempo óptimo es de 45 segundos para una concentración de PEG de 50%. Los protocolos tradicionales emplean un minuto con PEG al 50% a 37 C (Galfré y Milstein, 1979; Oi y Hersenberg, 1980; Fazekas y Scheideger, 1980) o 7 a 9 minutos a temperatura ambiente con PEG al 30 a 35 % (Geftter et al., 1977).

Otro método desarrollado recientemente es la electrofusión, en el cual se promueve la formación de híbridos mediante la aplicación de un campo eléctrico (Karsten *et al.*, 1985; Lo *et al.*, 1984).

Algunos investigadores han demostrado que el empleo de timocitos y macrófagos como células nodriza aumenta la eficiencia del desarrollo de los hibridomas. Parece ser que el efecto favorable de estas células se debe a la producción de factores de crecimiento (como interleucina I) y a la eliminación de los restos de las células que mueren los días posteriores a la fusión (Fazekas y Scheideger, 1980; Lernhardt *et al.*, 1978 y Di y Herzenberg, 1980).

**Pruebas de la producción de anticuerpos.** La importancia de esta etapa radica en que la prueba utilizada, determinará que se detecte el anticuerpo con las propiedades deseadas. La prueba debe ser lo suficientemente sensible y rápida, de tal manera que detecte los híbridos relevantes en el menor tiempo posible.

En general se recomienda no intentar recuperar todas las clonas productoras de anticuerpos, sino realizar una prueba que detecte los anticuerpos con las propiedades deseadas; por ejemplo, si se necesita un alto título de anticuerpos de alta afinidad se aislarán las clonas cuyos cultivos resulten positivos en diluciones 1:10 o 1:100, si se requieren anticuerpos que fijan complemento se tendrá que implementar una prueba de citotoxicidad o si se desean obtener anticuerpos de una clase o subclase, pueden ser detectados directamente utilizando un

antisuero específico contra el isotipo requerido (Claffin y Williams, 1978; Herzenberg *et al.*, 1980).

Por otro lado, también se deben considerar la precisión, costo y velocidad como criterios de selección de la prueba, de tal manera que se puedan realizar múltiples ensayos en las diferentes etapas de la clonación.

En los últimos años se han desarrollado una gran diversidad de técnicas que detectan la presencia de anticuerpos monoclonales, muchas de ellas son modificaciones de las metodologías básicas de las cuales las más comúnmente empleadas son: radioinmunoensayo, enzaimmunoensayo, citotoxicidad e inmunofluorescencia (Al Moudallal *et al.*, 1984; Pauli *et al.*, 1984; Russell *et al.*, 1983).

**Clonación.** La clonación se debe efectuar tan pronto como se hayan identificado los cultivos productores de anticuerpos, ya que esto disminuye la posibilidad de sobrepoblación con clonas irrelevantes (Goding, 1980; Taggart y Samloff, 1983). En los primeros experimentos en los que se aislaron clonas productoras de anticuerpos, la clonación se realizó por cultivo en medio semisólido con agarosa suave, de acuerdo a la metodología de Coffino *et al.* (1972). sin embargo, este método tiene la desventaja de que a menos que se tenga una técnica que detecte anticuerpos sobre o en el medio semisólido, se debe de recultivar las clonas en medio líquido. Por esta razón los investigadores actualmente prefieren utilizar la clonación por diluciones limitantes.

Si se cultivan pequeñas cantidades de células, la fracción de pozos con crecimiento deberá seguir la distribución de Poisson:

$$F(o) = e^{-m}$$

donde  $F(o)$  es la fracción de pozos donde no hay crecimiento y  $m$  es el promedio de clones por pozo. Si  $m=1$  entonces  $F(o)=0.37$ . Es decir, para obtener una probabilidad razonable de que los pozos contienen clones únicas, más del 37% de los cultivos no deben de tener crecimiento. Aunque este método supone una eficiencia del 100 % se recomienda realizar más de una clonación (Henry et al., 1980).

### 1.5 Modificaciones a la metodología básica

Uno de los problemas existentes en la producción de AM es la baja frecuencia con que se obtienen los hibridomas secretadores. La siguiente observación es útil para apreciar lo anterior; si se tiene un rendimiento de 1 clona por cada  $2 \times 10^5$  células de bazo se tendría un total de 500 hibridomas de un bazo que proporcionara  $10^8$  células. Si además se utiliza un inmunógeno fuerte como son los eritrocitos de carnero que producen aproximadamente 1 célula secretora por cada 100 esplenocitos se tendrían de este bazo un total de 5 hibridomas secretadores de anticuerpos anti-eritrocitos. Se puede concluir que cualquier variable que afecte tanto el rendimiento de hibridomas como el número de células secretoras en el bazo repercutirá en la cantidad resultante de clones productoras de anticuerpos. Por otro lado, el rendimiento final también dependerá de la sensibilidad de la

prueba utilizada en la detección de anticuerpos.

Con el fin de aumentar la eficiencia de la metodología diversos investigadores han planteado nuevas técnicas en algunas de las diferentes etapas.

**Estrategias de inmunización.** Para aumentar la respuesta hacia el antígeno deseado Sakato y Eissen (1975) conjugaron el antígeno a una molécula altamente inmunogénica como la hemocianina; Knudsen (1985) obtuvo una inmunización efectiva absorbiendo pequeñas cantidades del antígeno a papel de nitrocelulosa y reduciéndolo a partículas diminutas por tratamiento con dimetilsulfóxido antes de la inoculación. Spitz *et al.* (1984) inmunizaron animales inoculando pequeñas cantidades de antígeno intraesplénicamente.

Por otro lado, para eliminar la respuesta hacia antígenos indeseables Thalhamer *et al.* (1985) propusieron la inmunización con una mezcla de antígenos y anticuerpos contra los antígenos contaminantes.

**Fusión.** Buttin *et al.* (1978) propusieron la fusión sobre membranas de nitrocelulosa, mediante esta técnica estos autores obtienen un alto rendimiento de hibridomas secretores de anticuerpos anti-idiotípicos. La metodología consiste en centrifugar la mezcla de células de bazo y células de mieloma en un tubo de centrifuga filtrante. La fusión se realiza sobre la membrana en la cual se sedimentan ambos tipos de células.

Van Mourik *et al.* (1984) previamente a la fusión fraccionaron las células de bazo por medio de la centrifugación en

gradiente de densidad (con Percoll) y encontraron que las células con una densidad específica de  $1.065 \text{ g/cm}^3$  produjeron un mayor número de hibridomas secretores de anticuerpos.

La fusión selectiva de los linfocitos B secretores del anticuerpo deseado ha sido ensayada por algunos autores. Kranz et al. (1980) incorporaron fluoresceína a las células de mieloma, posteriormente las incubaron con células de bazo inmunes (antifluoresceína) formándose agregados celulares con los cuales realizaron la fusión. Esta modificación resultó en un número mayor de hibridomas antifluoresceínicos en relación con los obtenidos mediante una fusión "normal".

Lo et al. (1984) explotaron la alta afinidad entre la avidina y la biotina para promover la fusión selectiva. En este estudio se conjugó covalentemente el antígeno a la avidina y luego se incubó con la suspensión de linfocitos para formar un complejo linfocito-B-antígeno-avidina, el cuál a su vez se mezcló con células de mieloma que tenían biotina unida covalentemente a su superficie. La fusión se realizó mediante la aplicación de un campo eléctrico (electrofusión). Los autores reportan la obtención de hibridomas secretores de anticuerpos de alta afinidad.

A pesar de que las técnicas de fusión selectiva reducen considerablemente el número de híbridos que deben ser ensayados, no han sido utilizadas ampliamente lo cuál sugiere que deben existir dificultades técnicas que no permiten su aplicación extensiva.

**Enriquecimiento de células productoras de anticuerpos.**

Además de las modificaciones antes mencionadas, es posible enriquecer el bazo con células B específicas contra el antígeno en estudio (Rathjen y Underwood, 1985). Con este fin, las células de bazo de ratones inmunizados pueden ser inyectadas a receptores singénicos irradiados junto con el antígeno (transferencia adoptiva). Esto da como resultado la amplificación de la respuesta de células B específicas y un aumento en la producción de hibridomas secretores de hasta 50 veces (Moller, 1968; Kennedy *et al.*, 1966). La técnica de transferencia adoptiva ha sido empleada dando resultados exitosos por Thiriart (1984).

## 2

## OBJETIVOS

## 2.1 Planteamiento de objetivos

Se ha demostrado que la transferencia de linfocitos de un donador inmune a animales no inmunes, singénicos e irradiados aumenta considerablemente el número de células productoras de anticuerpos, esto se debe a la inhibición de los mecanismos de regulación de la respuesta inmune en los receptores (Moller, 1968).

La ciclofosfamida es un agente citotóxico empleado extensamente como inmunosupresor. Este compuesto actúa sobre células en fases intermitótica o proliferante, su actividad inhibitoria es efectiva antes y después del estímulo antigénico, además produce una reducción proporcionalmente mayor en el número de linfocitos B que en la cifra de linfocitos T (Turk y Parker, 1979; Turk y Poulter, 1972).

La ciclofosfamida es inactiva hasta que es metabolizada por el hígado. Aunque no se ha identificado el residuo activo, se encuentra en la circulación por solo algunas horas después de su administración (Webb y Winkelstein, 1983).

De acuerdo con estos antecedentes el objetivo del presente trabajo fue el de desarrollar una metodología de transferencia intraesplénica de linfocitos para enriquecer el bazo del receptor con clones productoras de anticuerpos contra el virus de la rabia, ensayando a la ciclofosfamida como inhibidor de los mecanismos de regulación de la

respuesta inmune del receptor. Esto con el fin de mejorar el rendimiento en la producción de anticuerpos monoclonales contra el agente mencionado.

## 2.2 Diseño experimental

**Hipótesis.** La transferencia de linfocitos inmunizados y mezclados con suspensión de virus de la rabia a un ratón receptor no inmunizado, singénico e inmunosuprimido con ciclofosfamida favorece la proliferación de clonas específicas. El aumento de la multiplicación clonal se reflejará en el aspecto histológico, en el título de anticuerpos, número de células de bazo productoras de anticuerpos y en el número de clonas híbridas productoras de anticuerpos. El crecimiento del bazo será indicativo del asentamiento y desarrollo en este órgano de las células transferidas.

En el cuadro número 1 se muestran los grupos experimentales y la pruebas realizadas para corroborar ésta hipótesis.

En un experimento independiente se evaluó el efecto de tres variables sobre el número de células productoras de anticuerpos en ratones receptores. Se utilizó un diseño factorial  $2 \times 2 \times 2$ . Los factores y sus respectivos niveles fueron:

- A: 1) respuesta hacia antígenos contaminantes.
- 2) respuesta hacia antígenos relevantes.

- B: 1) receptores no tratados.  
2) receptores tratados con ciclofosfamida.
- C: 1) linfocitos transferidos mezclados con cepa  
Acatlán-V319.  
2) linfocitos transferidos mezclados con la cepa  
ERA.

Se tuvieron dos repeticiones por cada nivel de cada factor.

El cuadro No. 2 muestra la definición de los grupos formados para este experimento.

Cuadro No. 1

Grupos experimentales y pruebas realizadas en cada uno de ellos para comprobar la hipótesis planteada.

Grupo de ratones	Título de anticuerpos	peso del bazo	Estudio histológico	Número de células productoras de anticuerpos específicos	Fusión
I: no inmunizados	--	--	2	2	--
II: inmunosuprimidos con 1mg de ciclofosfamida	--	--	2	--	--
III: Donadores de linfocitos	5	5	2	2	--
IV: Receptores no tratados	5	5	2	2	2
V: Receptores tratados con 1 mg de ciclofosfamida	5	5	2	2	--

Los números indican el número de ratones en cada grupo.

Cuadro No. 2  
 Grupos experimentales para determinar los efectos de cepa,  
 tratamiento con ciclofosfamida y antígenos en el número de células  
 de bazo productoras de anticuerpos.

Cepa	Ciclofosfamida (mg)	Antígenos	Grupo experimental
Linfocitos mezclados con suspensión de cepa Acatlán V319	0	contaminantes relevantes	A B
	2	contaminantes relevantes	C D
	0	contaminantes relevantes	E F
	2	contaminantes relevantes	G H

**MATERIAL Y METODOS****3.1 Producción de antígeno de virus rábico (Acatlán-V319) y titulación.**

**3.1.1 Virus:** Se utilizaron las cepas vacunales Acatlán-V319 y ERA amablemente proporcionadas por el Dr. R. Ojeda de la Productora Nacional de Biológicos Veterinarios y Sanyconn S.A. de C.V., respectivamente. El título de ambas cepas fue de 10<sup>5</sup> (ratón 10-15 g). La cepa Acatlán-V319 fue cultivada y titulada en nuestro laboratorio.

**3.1.2 Cultivos celulares:** Para replicar el virus se utilizó la Línea celular BHK 21 (ATCC, 1978) que fue cultivada hasta obtener monoestratos confluentes en medio BHK-21 (Gibco) suplementado con penicilina, estreptomina, 6 % de medio triptosa fosfato (TPB) y 10% de suero fetal bovino (SFB).

**3.1.3 Producción de virus:** Los monoestratos de células BHK<sup>2</sup> obtenidos en botellas de plástico de 80 cm<sup>2</sup> de superficie (Falcon), fueron inoculadas con un mililitro de la suspensión viral de la cepa Acatlán V319 (3.1.1) adicionando al inóculo 0.1 mg de DEAE-Dextrán. Después de una hora de incubación el inóculo fue desechado y el monoestrato se lavó tres veces con solución amortiguadora de fosfatos (PBS, pH 7.2). Posteriormente se agregó medio de mantenimiento (BHK, suplementado con penicilina, estreptomina, 6 % TPB y 2 %

SFB). Cinco días posteriores a la inoculación se cosechó el sobrenadante (suspensión del virus de la rabia, SVR) y se procedió a la titulación.

**3.1.4 Titulación:** 8 Grupos de 6 a 7 ratones de la cepa CDI de 15 a 20 g de peso fueron inoculados por vía intracerebral con 0.03 ml de diluciones seriadas base 10 de la SVR.

El título en dosis letales al 50 % (LD<sub>50</sub>) se calculó de acuerdo al método de Reed y Muench (Davis *et al.*, 1978), la observación de los ratones infectados se realizó durante 21 días.

### **3.2 Inmunoensayo enzimático en papel de nitrocelulosa (dot-ELISA).**

Esta prueba se empleó para la titulación de anticuerpos séricos de ratón y para la detección de anticuerpos en el medio de cultivo de hibridomas. La metodología empleada se basó en la descrita por Lin y Halbert (1983), a la cual se le hicieron algunas modificaciones.

**3.2.1 Sensibilización del papel de nitrocelulosa:** La SVR preparada como se indicó antes (3.1.3) se filtró a través de papel de nitrocelulosa (Millipore) utilizando un portafiltro con capacidad para 250 ml (Millipore) hasta la saturación del papel. Posteriormente se dejó secar la membrana. Se cortaron discos de aproximadamente 5 mm de diámetro, los cuales se conservaron a -20 °C hasta el momento de su utilización.

**3.2.2 Determinación de anticuerpos:** Los discos se descon-

gelaron y se colocó uno en cada uno de los pozos de placas de plástico de 96 pozos de fondo plano (Falcon o Nunc). Con el fin de bloquear los sitios inespecíficos de unión del conjugado, se agregaron a cada pozo 75 microl de solución de leche descremada (Sveltes, Nestlé) al 5 % en solución amortiguadora de trietanolamina (TBS; 7.5 g de NaCl, 2.8 ml de trietanolamina, 17 ml de HCl 1N, 0.1g de MgCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O, 0.02 g de CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O, H<sub>2</sub>O cuanto basta para 1 l). Las placas con la solución bloqueadora se incubaron a 37 °C durante 15 minutos, transcurrido este tiempo, se aspiró la solución. Se agregaron 50 microl de los anticuerpos a probar provenientes del suero de ratón o de sobrenadante sin diluir de cultivo de hibridomas, seguido de un periodo de incubación de 1 hora a 37 °C. Para titular los sueros de ratones se realizaron 5 diluciones seriadas base 4, empezando con la dilución 1:40. Posteriormente los discos se lavaron 3 veces con solución TBS-Tween 20 al 0.05 %, la tercera vez se dejaron los discos 10 minutos con la solución de lavado. En seguida se agregaron 50 microl de solución de conjugado peroxidasa-antigamaglobulina de ratón (Sigma) diluido 1:200 en TBS-leche descremada al 1%, incubándose 1 h a 37 °C. El procedimiento de lavado descrito anteriormente se repitió luego de la incubación con el conjugado. Por último se agregaron 75 microl de solución de sustrato (7.5 mg de diaminobencidina (Sigma), 15 microl de H<sub>2</sub>O y 15 ml de TBS) incubándose 30 minutos a temperatura ambiente. La solución sustrato se aspiró, se lavaron los discos con TBS y se dejaron secar.

Los discos positivos se tiñeron color café. El título de

anticuerpos fue calculado considerando la última dilución que presentaba una coloración café mas fuerte que los controles negativos, los cuales consistieron de diluciones seriadas de suero de ratón desprovisto de anticuerpos contra el virus de la rabia por una parte y TBS-leche descremada al 1% por otra.

### **3.3 Transferencia adoptiva intraesplénica**

**3.3.1 animales:** Tanto donadores como receptores. fueron ratones Balb/c de 20 a 25 g de peso.

**3.3.2 Inmunización de donadores:** Los ratones donadores fueron inmunizados mediante 2 inoculaciones con 0.5 ml de SVR por las vias intramuscular, subcutánea e intraperitoneal. Las dosis se aplicaron con un intervalo de dos semanas entre cada una de ellas. Después de 3 semanas de la última inoculación estos animales fueron utilizados como donadores de células de bazo. En el caso del experimento 2 descrito posteriormente (3.6.2), uno de los donadores se inmunizó aplicando el segundo estímulo con la cepa ERA (3.1.1).

**3.3.3 Células de bazo:** Los donadores se sangraron y sacrificaron. En condiciones de esterilidad se les extrajo el bazo, el cual se colocó en una caja de Petri con medio de Iscove (Sigma), los linfocitos se liberaron desgarrando el bazo con agujas, transfiriéndose después a un tubo de ensayo. Los restos de tejido fueron eliminados dejándolos sedimentar durante 5 minutos. El sobrenadante fue transferido a un tubo cónico de centrifuga, pasándolo a través de una pipeta Pasteur obturada con fibra de vidrio para retener

desechos y células muertas, centrifugándose después 8 minutos a 200 g. Las células se resuspendieron en NH Cl amortiguado (450 ml de NH Cl al 0.83 %, 50 ml de TRIS base al 2.06 %, pH 7.65) con el fin de lisar eritrocitos, dejando reposar las células en esta solución unos cinco minutos y centrifugando nuevamente 8 min a 1200 rpm. Se preparó una mezcla de linfocitos y antígeno (MLA) agregando a las células 0.5 ml de SVR. Se efectuó el conteo celular en la cámara de Neubauer corroborando la viabilidad por medio de la exclusión de la tinción con azul de tripán.

**3.3.4 Inoculación intraesplénica:** La inoculación intraesplénica se efectuó de acuerdo a la metodología descrita por Spitz et al. (1984). Las células de bazo de cada donador previamente inmunizado, fueron transferidos a dos ratones receptores; uno de los cuales había sido inmunosuprimido por medio de la inyección intramuscular de 1 o 2 mg de ciclofosfamida 24 horas antes de la transferencia. Los receptores fueron anestesiados mediante la inyección intramuscular de 80 microg de dehidrobenzperidol (Droperidol, Janssen Ph) y 2.5 mg de clorhidrato de quetamina (Disosianest, 20th Century Mx.). Una vez logrado el efecto anestésico cada ratón se colocó en una tablilla recostado en el lado derecho e inmobilizado con cinta adhesiva como se muestra en la figura 1A. Se desinfectó el cuadrante superior izquierdo del abdomen con una solución de benzal al 30 %. En seguida se hizo una incisión longitudinal en la piel de 1 a 1.5 cm de largo. La piel se separó de la capa muscular para



Figura No. 1A. Inmovilización e incisión del ratón receptor.



Figura No. 18. Inoculación intraesplénica de linfocitos en el ratón receptor.

dejar expuesta la pared abdominal. Una segunda incisión se hizo en las capas musculares y el peritoneo para dejar expuesto el bazo. El órgano se exteriorizó sujetando su extremo ventral con ayuda de pinzas de relojero inyectando 0.2 ml de la mezcla de linfocitos y antígeno del virus de la rabia (en promedio  $2 \times 10^7$  células), como se puede observar en la figura 1B. Después de la inyección, el bazo se regresó a la cavidad peritoneal, el peritoneo y las capas musculares se suturaron con un punto, los bordes del corte de piel se aproximaron y se cerraron con 2 a 3 puntos. Cinco días después, los receptores fueron sacrificados para dilucidar la eficiencia de la metodología, determinando el título de anticuerpos séricos, el peso y aspecto histológico del bazo, el número de células productoras de anticuerpos contra el virus de la rabia y en la hibridación con células de mieloma como se menciona en el capítulo correspondiente a objetivos.

#### **3.4 Determinación del peso del bazo.**

Los bazos tanto de ratones donadores como de receptores se pesaron inmediatamente después de su extracción en una balanza analítica.

#### **3.5 Estudio histológico**

El estudio histológico se realizó en cinco grupos de bazos clasificados de acuerdo al tratamiento aplicado al ratón de procedencia:

I: No inmunizados

II. Inmunosuprimidos con 1 mg de ciclofosfamida.

III. Donadores de linfocitos.

IV. Receptores no tratados.

V. Receptores tratados con 1mg de ciclofosfamida.

Los bazo se fijaron en formol-PBS (pH 7.2) al 3 % inmediatamente después de su extracción; se incluyeron en parafina para la realización de cortes de 5 micras de espesor. Finalmente fueron teñidos con la técnica de hematoxilina -eosina y observados en un microscopio de luz transmitida.

### 3.6 Determinación del número de células de bazo productoras de anticuerpos específicos.

**3.6.1 Fundamento de la metodología.** Con base en los trabajos de Rao y Pande (1985) y de Sharon *et al.*, (1979), en el presente estudio se implementó una metodología de réplica en papel de nitrocelulosa para cuantificar las células de bazo productoras de anticuerpos específicos. La técnica consiste en cultivar las células de bazo inmune sobre discos de papel de nitrocelulosa sensibilizados con el antígeno como se describió en 3.2.1. Teóricamente el anticuerpo liberado por los linfocitos B específicos se va a fijar al antígeno retenido en el papel sensibilizado. La reacción antígeno-anticuerpo se pone luego en evidencia mediante la técnica de inmuno ensayo enzimático descrita anteriormente (3.3.2). De esta manera en el lugar en donde se encuentre una célula productora de anticuerpos específicos aparecerá un punto

oscuro que en el presente trabajo se denominará "unidad formadora de puntos" (UFP). En la figura No. 2 se esquematiza el procedimiento descrito.

**3.6.2 Experimentos.** Esta prueba se realizó en dos experimentos consecutivos.

**Experimento 1.** Se comparó el número de UFP en los siguientes grupos de bazo pertenecientes a ratones:

Grupo I. No inmunizados (control negativo).

Grupo III: Donadores de linfocitos.

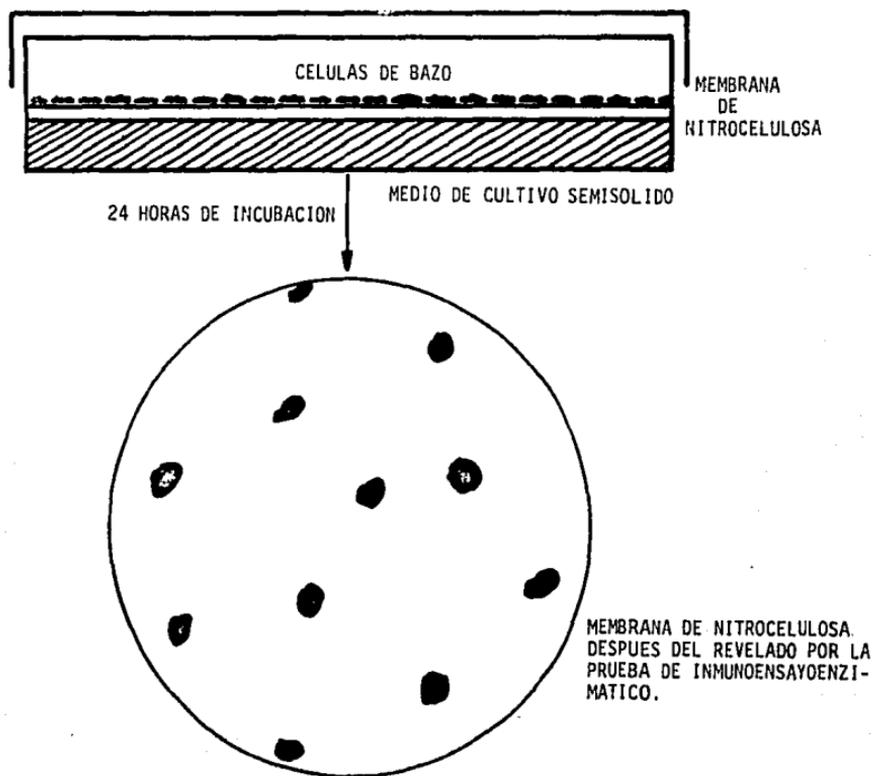
Grupo IV: Receptores no tratados con ciclofosfamida.

Grupo V: Receptor tratado con ciclofosfamida 24 horas antes de la transferencia.

**Experimento 2.** Se determinó el efecto de las variables cepa, tratamiento con ciclofosfamida y respuesta hacia antígenos contaminantes o relevantes sobre las UFP de ratones receptores. Para esto se cuantificó la diferencia entre las UFP formadas en discos sensibilizados con la SVR (UFP contra antígenos totales) y las UFP en discos sensibilizados con suspensión de células BHK no infectadas (antígenos contaminantes).

Esta diferencia se evaluó en los grupos definidos en el cuadro 2 (ver sección 2.2).

FIGURA 2. ESQUEMA DE LA TECNICA DE REPLICA EN PAPEL DE NITROCELULOSA PARA LA CUANTIFICACION DE CELULAS PRODUCTORAS DE ANTICUERPOS EN EL BAZO



**3.6.3 Procedimiento.** Se sensibilizaron discos de nitrocelulosa (Millipore) de la misma manera como se describió antes (3.2.1) tanto con SVR como con suspensión obtenida de cultivo de células BHK no infectadas. Se colocaron los discos en cajas Petri que contenían medio iscove semisólido suplementado con 20 % de SFB, glutamina, penicilina, estreptomina y 0.75 % de agarosa. Se prepararon suspensiones de las células de los bazo (SCB) y se ajustaron a concentraciones de  $10^7$  células por ml. Por cada bazo se utilizaron dos discos en los cuales se colocaron 0.05 y 0.1 ml de SCB, respectivamente. Luego de un periodo de incubación de 24 horas, los discos se lavaron con solución de TBS-Tween 20 y se procedió a revelar la producción de anticuerpos mediante la técnica de inmuno ensayo enzimático.

Utilizando un microscopio estereoscópico se contaron las UFP en cada disco.

### **3.7 Producción de células híbridas productoras de anticuerpos.**

Se realizaron 2 fusiones cada una con un bazo de un ratón receptor no tratado con ciclofosfamida.

**3.7.1 Preparación de timocitos y macrófagos:** 24 a 48 horas antes de la fusión se sembraron timocitos y macrófagos como células alimentadoras en los pozos destinados a recibir los hibridomas recién formados.

Para la obtención de timocitos se utilizaron ratones de 3 semanas de edad, los cuales se sacrificaron. Se les extrajo el timo en condiciones estériles. Las células se liberaron

rasgando el timo con agujas. Los agregados celulares se eliminaron por sedimentación. Se preparó una suspensión celular en 5 ml de medio selectivo HAT-20 % SFB (preparado con 2 ml de solución HAT 2X marca Sigma, en 100 ml de medio Iscove suplementado con glutamina, antibióticos y 20 % de SFB). Se verificó viabilidad por exclusión de la tinción con azul de tripán, se contaron las células y se conservaron a 4 ° C mientras se prepararon las células de exudado peritoneal.

Los macrófagos de exudado peritoneal se obtuvieron de ratones de 3 meses de edad a los cuales después de haber sido sacrificados se les retiró la piel abdominal. Por vía intraperitoneal se les inyectaron 5 ml de solución de sacarosa 0.34M a 4 ° C. Se aplicó un masaje ligero al abdomen antes de extraer por punción el líquido intraperitoneal. Se centrifugó 8 min a 200 g, se desechó el sobrenadante y las células se resuspendieron en 5 ml de medio HAT-20 % SFB. Al igual que en el caso anterior se realizó el conteo celular y se verificó la viabilidad por exclusión de la tinción con azul de tripán.

Los timocitos y macrófagos se mezclaron en una proporción 10:1 en medio HAT. El volumen de medio necesario se calculó de tal manera que se distribuyeran 0.5 ml por pozo conteniendo aproximadamente  $10^5$  macrófagos y  $10^6$  timocitos. Las placas fueron entonces colocadas a 37 ° C y 5 % de CO<sub>2</sub> hasta el momento de su utilización.

**3.7.2 Células:** Se utilizó la línea celular SP2 de mieloma de ratón gentilmente donada por el Dr. Vianey de la

Secretaría de Salud.

El medio de crecimiento utilizado para el cultivo de estas células fue Iscove suplementado con glutamina, estreptomycin, penicilina, fungizona y 20% de SFB. Se utilizaron cultivos de 48 horas en botellas de plástico de 80 cm<sup>2</sup> de superficie (Falcon). En cada una de las fusiones se empleó el contenido de dos de las botellas de cultivo (aproximadamente  $2 \times 10^7$  células) centrifugándose en tubos de plástico de 50 ml. Se lavaron con PBS resuspendiéndose después en medio Iscove sin suero. Se contaron y se verificó viabilidad por tinción con azul de tripán.

**3.7.3 Células de bazo:** Las células de bazo se preparan como se indicó (3.3.3). Después del tratamiento con  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , las células se lavaron 2 veces con PBS. Se resuspendieron en medio Iscove suplementado con glutamina, estreptomycin, penicilina y fungizona (ISS). Se pasaron a través de una pipeta Pasteur obturada con fibra de vidrio. Se contaron y se verificó viabilidad por exclusión de la tinción con azul de tripán.

**3.7.4 Fusión:** La técnica utilizada fue la descrita por por Fazakas y Scheidegger (1980).

Las células de mieloma y las células de bazo se mezclaron en proporción 1:2. La suspensión celular mixta se centrifugó (200 g, 8 min). Se aspiró el sobrenadante. Las células se golpearon ligeramente para soltarlas. Se agregaron 0.6 a 0.8 ml de polietilenglicol (Sigma) al 50% en ISS precalentado a 37 °C, gota a gota, lentamente y agitando. Esta operación se

llevó a cabo en unos 60 segundos. Posteriormente se agregó medio ISS, precalentado a 37 °C, de la siguiente manera: el primer mililitro se adicionó durante 30 segundos, los siguientes 3 ml se adicionaron en 60 segundos, después 10 ml en 1-2 minutos, finalmente se llena el tubo y se deja 5 minutos a 37 °C. Posteriormente se centrifugó (200 g, 8 min) y se resuspendió en el volumen adecuado de HAT-20 % SFB.

Las células se repartieron a razón de  $3.28 \times 10^6$ ,  $1.64 \times 10^6$ ,  $0.75 \times 10^6$  y  $0.2 \times 10^6$ . Se sembraron 18 pozos de placas de 24 pozos con cada una de estas concentraciones.

Después de un periodo de incubación de 10 días, se contó el número de pozos con crecimiento de clonas y se verificó la producción de anticuerpos detectándolos en el medio de cultivo por medio de la prueba de inmunoensayo enzimático ya descrita (sección 3.2).

La cuantificación y análisis de los resultados de la fusión se describirán en el capítulo correspondiente al análisis estadístico.

**3.7.5 Clonación:** La clonación se efectuó con base en la técnica de dilución limitante descrita por Henry *et al.*, (1980). Por cada colonia de células híbridas que se clonaron, se utilizaron 2 placas de 24 pozos, en cada pozo se sembraron previamente timocitos y macrófagos ( $10^6$  y  $10^5$ , respectivamente) en medio HAT-20 % SFB. Una muestra del cultivo se diluyó de tal manera que 230 células híbridas se suspendieron en 4.8 ml de medio, se sembraron 18 pozos con 0.2 ml de esta suspensión, con este procedimiento quedó 1 ml al cual se agregaron 4 ml de medio y se sembraron otros 18 pozos con 0.2

ml. Finalmente se adicionaron 1.4 ml de medio y se repartieron en los 12 pozos restantes. En cada dilución se sembraron aproximadamente 10, 2 y 1 células por pozo.

### 3.8 Analisis estadístico

Las diferentes pruebas estadísticas empleadas en el presente trabajo fueron:

**Análisis de varianza (ANOVA).** Se aplicó en los resultados de peso del bazo, de título de anticuerpos y de unidades formadoras de puntos.

En los casos de peso del bazo y título de anticuerpos se utilizó un diseño en bloques aleatorios. En el experimento número 1 de la determinación de UFP se empleó un diseño completamente al azar.

Las hipótesis planteadas fueron del tipo:

$H_0$ : Todas las medias son iguales

$H_1$ : No todas las medias son iguales

se rechazó  $H_0$  cuando se obtuvo una "p" menor de 0.05.

**Prueba de Tuckey:** Se empleó esta prueba para ver diferencias entre medias posteriormente al análisis de varianza. Esta prueba se realizó con un nivel  $\alpha=0.05$ .

**Análisis de regresión lineal:** Se utilizó para determinar si los resultados obtenidos en las fusiones estaban de acuerdo a la distribución de Poisson.

Las variables analizadas fueron:

X= número de células de bazo

Y=  $-\ln(\text{No. de pozos negativos}/\text{No. total de pozos})$

**Distribución de Poisson:** La distribución de Poisson se utilizó como modelo para la estimación del crecimiento monoclonal Henry et al., (1980). El No. promedio de clonas por pozo se calculó de acuerdo a la forma logarítmica del término cero de la distribución de Poisson.

$$m = -\ln(\text{No. de pozos negativos}/\text{No. total de pozos})$$

La frecuencia de clonas por número de células de bazo se calculó mediante la fórmula

$$f = m/c$$

donde  $c$  indica el número de células de bazo por pozo.

El análisis estadístico se realizó atendiendo a lo publicado por Snedecor y Cochran (1971), Daniel (1977) y Hurley et al (1981).

## 4

## RESULTADOS

## 4.1 Producción de antígeno de virus de la rabia y titulación

El antígeno de la cepa Acatlán V319 producido en el presente trabajo alcanzó un título de  $10^{5.7}$  DL (i.c. ratón de 15 a 20 g, cepa CD1).  
50

## 4.2 Título de anticuerpos en ratones donadores y receptores

La prueba de dot-ELISA implementada detectó anticuerpos hasta la dilución 1:10240 en un suero de ratón en el cual se obtuvo un título de 1:3125 mediante la prueba de seroneutralización en ratón de 15 g.

El cuadro No. 3 indica el título de anticuerpos obtenido en el grupo de ratones donadores (grupo III) sangrados el día de la transferencia y los grupos de ratones receptores tratados y no tratados con ciclofosfamida (grupos IV y V, respectivamente), sangrados cuatro días después de la transferencia.

El análisis de los datos por ANOVA no mostró diferencia significativa (cuadro No. 4). En la figura No 3, se indican los resultados del título de anticuerpos de cada grupo junto con su media y error estándar.

Cuadro No. 3  
 Titulo de anticuerpos de ratones donadores y  
 ratones receptores obtenidos por la  
 prueba dot-ELISA

-----		
Grupo		
-----	-----	-----
III	IV	V
640	640	2560
2560	2560	10240
640	2560	2560
2560	2560	2560
640	640	640
-----		
Media		
Geométrica 1114.3	1470.3	2559.8

III: Donadores

IV: Receptores no tratados.

V: Receptores tratados con 1mg de ciclofosfamida.

Los datos representan la mediana de 3 observaciones efectuadas.

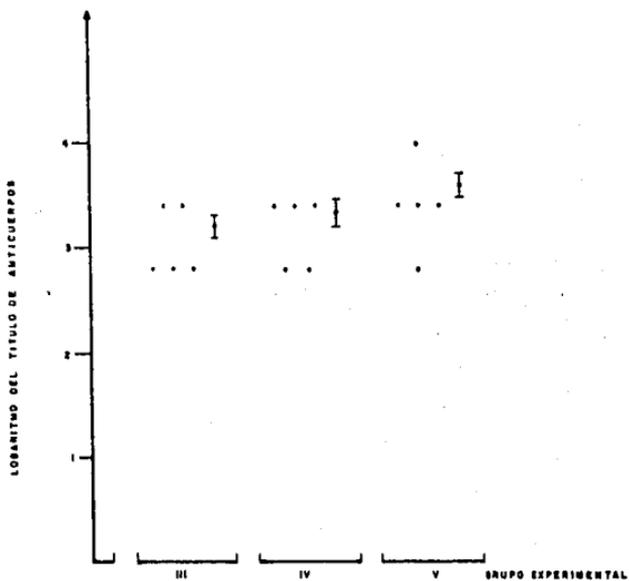
Cuadro No. 4

Tabla de ANOVA de la transformación logarítmica del título de anticuerpos en ratones donadores y receptores.

f.v.	g.l.	S.C.	C.M.	Fc	p
Trat.	2	0.338	0.169	3.500	n.s.
Bloques	4	1.208	0.302		
Error	8	0.386	0.048		
Total	14	1.933			

f.v.: Fuente de variación.  
 g.l.: Grados de libertad.  
 S.C.: Suma de Cuadrados.  
 C.M.: Cuadrados Medios.  
 F.c.: Estadístico F calculado.  
 n.s.: No significativo.

FIGURA N.º 3.- LOGARITMO DE LOS RESULTADOS DEL TITULO DE ANTICUERPOS, JUNTO CON SU MEDIA Y ERROR ESTANDAR, EN RATONES DONADORES Y RECEPTORES.



III.- RATONES DONADORES

IV.- RECEPTORES NO TRATADOS

V.- RECEPTORES TRATADOS CON 1mg DE CICLOFOSFAMIDA

#### 4.3 Peso de los bazo

El peso del bazo de los ratones receptores fue significativamente mayor que el de los donadores ( $P < 0.05$ ). El promedio de las diferencias entre donadores y receptores fue de 58 mg lo cual representa un 57 % del peso de bazo promedio de los donadores.

En el cuadro No. 3 se muestran los datos del peso del bazo de los 3 grupos estudiados. El análisis estadístico realizado mediante ANOVA y la prueba de Tuckey posterior no reveló diferencia significativa entre receptores tratados con ciclofosfamida y no tratados (cuadro No. 4). La figura No. 4 indica media  $\pm$  error estándar de cada grupo. En la figura No. 5 se puede apreciar la diferencia de tamaño entre el bazo de los donadores y el bazo de los receptores.

Cuadro No. 5  
Peso de bazo de ratones donadores y ratones  
receptores (en mg).

	----- Grupo -----		
	III	IV	V
	139.6	162.7	167.3
	107.4	146.6	145.4
	74.7	166.4	165.7
	109.6	196.6	163.6
	107.1	173.6	168.9
	-----		
Media	107.7	169.2	162.2
Error E.	7.54	7.54	7.54

III: Ratones donadores.

IV: Receptores no tratados.

V: Receptores tratados con 1 mg de ciclofosfamida.

Cuadro No. 6

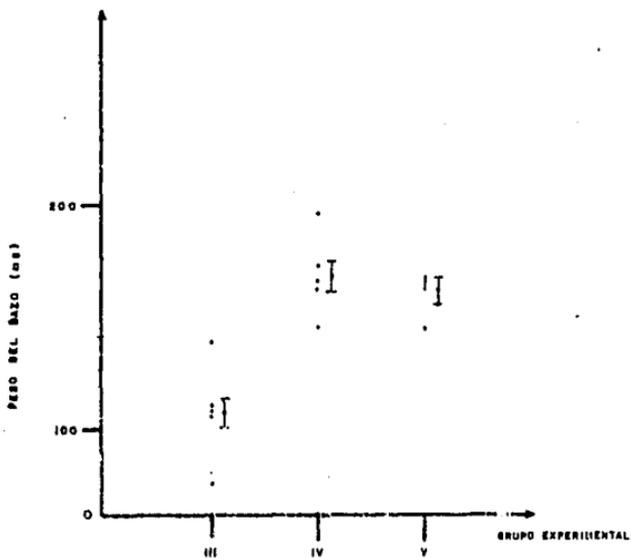
Tabla de ANOVA y prueba de Tuckey ( $\alpha=0.05$ ), de los resultados del peso de los bazo de ratones donadores y receptores.

f.v.	g.l.	S.C.	C.M.	Fc	P
Trat.	2	11326.3	5663.2	11.6	<0.05
Bloques	4	1621.9	405.5		
Error	8	3906.3	488.3		
Total	14	15232.6			

-----  
 III IV V

Los tratamientos unidos por una barra no mostraron diferencia estadísticamente significativa. (III= donadores, IV=receptores no tratados, V=receptores tratados con 1 mg de ciclofosfamida).

FIGURA No 4.— RESULTADOS Y MEDIA  $\pm$  ERROR ESTANDAR DE LOS PESOS DE LOS SAZOS DE RATONES DONADORES Y RECEPTORES.



III.— RATONES DONADORES

IV.— RECEPTORES NO TRATADOS

V.— RECEPTORES TRATADOS CON CICLOFOSFAMIDA

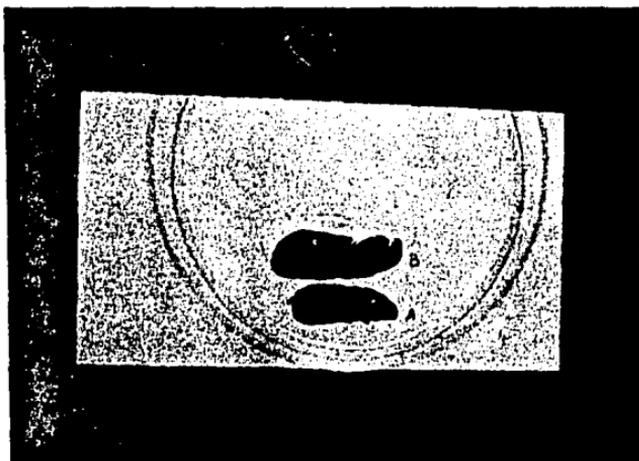


Figura No. 5. Tamaño comparativo de los bazo de un ratón donador (A) y un ratón receptor (B).

#### 4.4 Estudio histológico

En el estudio histológico se observó que los bazos de los receptores tanto tratados con ciclofosfamida como los no tratados, tenían una estructura típica de un bazo estimulado, con vainas periarteriolares hiperplásicas y numerosos centros germinales (figuras 6A y 6B). Esto también se observó en el bazo de los ratones estimulados convencionalmente.

En los bazos de los receptores no se observaron células que detectaran un proceso inflamatorio.

Los bazos de los ratones tratados con 1 mg de ciclofosfamida no mostraron depleción linfóide y su aspecto fue similar al del ratón no estimulado.



Figura No. 6A. Vaina periarteriolar en el bazo de un ratón receptor 4 días después de la transferencia adoptiva.

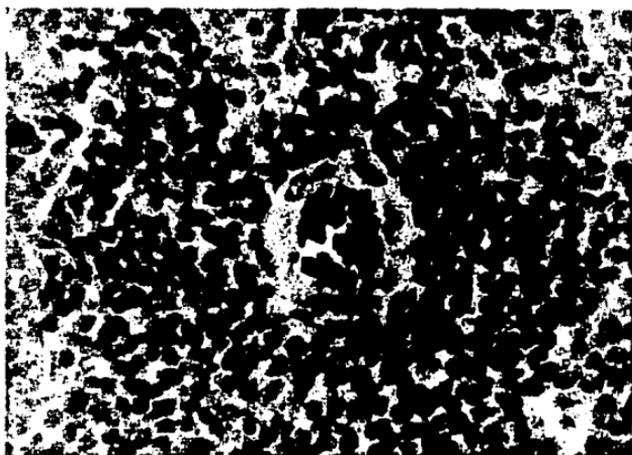


Figura No. 6B. Células mononucleares tipo linfóide alrededor de la arteriola de un receptor.

#### 4.5. Determinación del número de células de bazo productoras de anticuerpos

La figura No. 7, muestra el puntilleo revelado mediante la prueba de enzima inmunoensayo, en estas fotografías puede verse el centro de los puntos mas oscuro y una atenuación hacia la periferia.

**Experimento 1.** Los resultados del experimento No. 1 se muestran en el cuadro No. 7. En los ratones inmunizados de manera convencional ( grupo III de ratones donadores) se obtuvo un promedio de 482 UFP/10<sup>6</sup> células de bazo (CB). En los bazos de los ratones receptores se observaron en promedio 712 y 888 UFP/10<sup>6</sup> CB (en tratados y no tratados con ciclofosfamida respectivamente). En el grupo testigo que contenía células de bazo de un ratón normal no inmunizado (grupo I), no se observó la formación de puntos, lo que indica la especificidad de la prueba.

Los resultados del ANOVA y de la posterior prueba de Tuckey (Cuadro No.8) indicaron una diferencia estadísticamente significativa ( $P < 0.01$ ) entre el grupo de donadores y los grupos receptores. Sin embargo, no se observó diferencia significativa entre receptores tratados con ciclofosfamida y receptores no tratados.

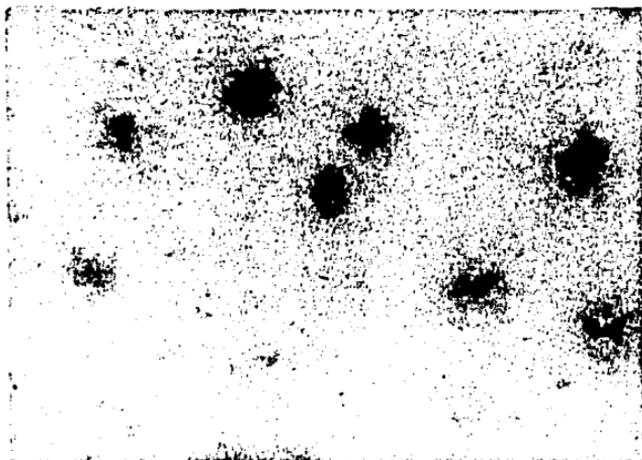


Figura No. 7. Prueba de réplica en papel de nitrocelulosa. Puntos desarrollados en el lugar en donde se encontraba una célula productora de anticuerpos (unidad formadora de puntos, UFP). Puede observarse el centro mas obscuro y una atenuación hacia la periferia.

Cuadro No. 7.

Unidades formadoras de puntos en ratones  
donadores y ratones receptores

(UFP/106 células de bazo)

	Grupo			Media
Control negativo	I	0	0	0
Donadores	III	230	534	482
Receptores no tratados	IV	944	832	888
Receptores con ciclofosfamida	V	697	727	712
Error estándar				± 50.0

Los datos son resultados de dos ratones por grupo.

Cuadro No. 8

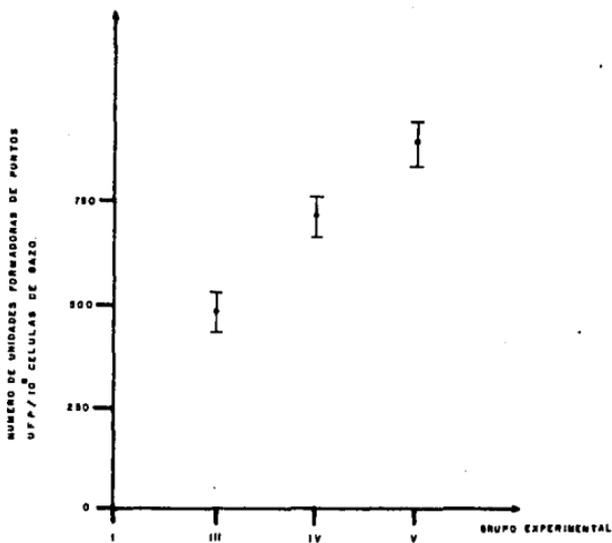
Tabla de ANOVA y prueba de Tuckey ( $\alpha=0.05$ ) de las UFP  
 obtenidas por 10 células de bazo en ratones donadores  
 y en receptores.

F.V.	g.l.	S.C.	C.M.	Fc	P
Trat.	2	165 808.0	82 904.1	20.50	<0.01
Error	3	12 130.0	4 043.3		
Total	5	177 938.0			

III IV V

Los tratamientos unidos con una barra no mostraron diferencia estadísticamente significativa. (III= células de bazo de donadores, IV=bazo de receptor no tratado y V=bazo de receptor tratado con ciclofosfamida).

FIGURA N.º 6.- MEDIA  $\pm$  ERROR ESTANDAR DEL NUMERO DE CELULAS DE BAZO PRODUCTORAS DE ANTICUERPOS ESPECIFICOS EN RATONES DONADORES Y RECEPTORES.



- I.- RATONES NO INMUNIZADOS
- III.- RATONES DONADORES
- IV.- RATONES RECEPTORES NO TRATADOS
- V.- RECEPTORES TRATADOS CON 1mg DE CICLOFOSFAMIDA

**Experimento No. 2.** Los resultados y las medias de las  $UFP/10^6$  células de bazo contra antígenos relevantes y contra antígenos contaminantes en los diferentes grupos experimentales se muestran en el cuadro No. 9 y la figura No. 9.

El ANOVA del diseño factorial  $2^3$  no demostró significancia estadística de las interacciones (cuadro No. 10). Sin embargo, los efectos principales de cada uno de los tres factores si fueron estadísticamente significativos. La transferencia de linfocitos mezclados suspensión de virus de la cepa Acatlán V319 produjo un mayor número de UFP ( $p < 0.01$ ), en promedio  $202.25 UFP/10^6$  CB mas que cuando los linfocitos se mezclaron con virus de la cepa ERA. Esto último independientemente de que los receptores hayan sido tratados o no con ciclofosfamida y sin considerar también que la respuesta haya sido hacia antígenos contaminantes o hacia antígenos relevantes. En el grupo de células procedentes de receptores tratados con 2 mg de ciclofosfamida se obtuvieron  $160.25 UFP/10^6$  CB mas que en las células de receptores no tratados, independientemente en este caso, de la cepa utilizada en la transferencia e indistintamente si la respuesta se llevó a cabo hacia antígenos relevantes o hacia antígenos contaminantes. En todos los casos la respuesta hacia antígenos relevantes fue mayor en aproximadamente  $300 UFP/10^6$  CB, tanto en los receptores no tratados como en los tratados con ciclofosfamida y sin considerar también la cepa utilizada. Los efectos principales y el error estándar de cada uno de estos factores se muestran en el cuadro número 11.

Cuadro No. 9 6

Resultados del número de unidades formadoras de puntos por 10 células de bazo en los grupos experimentales para determinar el efecto de cepa, ciclofosfamida y antígenos.

Cepa	Ciclofosfamida (mg)	Antígenos	Grupo experimental	Resultados		Media
				1	2	
Linfocitos mezclados con suspensión de cepa Acatlán V319	0	contaminantes relevantes	A	222	270	246.0
			B	511	665	588.0
	2	contaminantes relevantes	C	485	622	553.0
			D	680	776	728.5
Linfocitos mezclados con suspensión de cepa ERA	0	contaminantes relevantes	E	102	144	123.0
			F	373	494	433.5
	2	contaminantes relevantes	G	181	197	139.0
			H	511	611	561.0

Cuadro No. 10.

Tabla de ANOVA para determinar el efecto de cepa y/o ciclofosfamida y/o antígenos sobre las UFP/ 10 CB.

F.V.	g.l.	S.C.	C.M.	Fc	P
Trat.	7	664 678.0	94 954.1	18.83	<0.01
Antígeno	1	359 400.2	359 400.2	71.29	<0.01
Ciclo	1	102 720.2	102 720.2	20.37	<0.01
An*Ci	1	2 809.0	2 809.0	0.55	n.s.
Cepa	1	163 620.2	163 620.2	32.45	<0.01
An*Ce	1	6 889.0	6 889.0	1.36	n.s.
Ci*Ce	1	16 129.0	16 129.0	3.19	n.s.
An*Ci*Ce	1	13 110.2	13 110.2	2.6	n.s.
Error	8	40 333.0	5 041.6		
Total	15	705 011.0			

Cuadro No. 11

Efectos simples y principales de los factores cepa,  
 ciclofosfamida y tipo de antígenos sobre las  
<sup>6</sup>  
 UFP/ 10 células de bazo.

Factor	Nivel	Efecto simple	Efecto principal
Antígenos	Contaminantes	277.9	299.7 (±50.2)
	Relevantes	577.6	
Ciclofosfamida	0	347.6	160.25 (±50.2)
	2	507.8	
Cepa	A V319	528.9	-202.2 (±50.2)
	ERA	326.6	

Los números representan UFP/10 <sup>6</sup> CB.

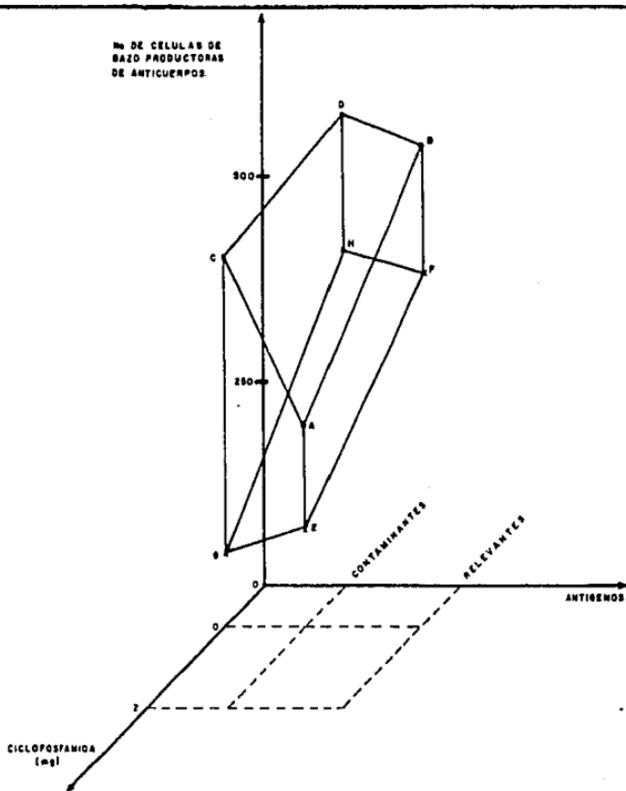


FIGURA No 9.- MEDIA DE LAS UFP/10<sup>6</sup> CB OBTENIDAS EN LOS GRUPOS DEL EXPERI-  
 MENTO 2. LOS PLANOS (ABCD) Y (EFGH) REPRESENTAN GRUPOS  
 TRATADOS CON CEPA ACAFLAN-VSIS Y ERA, RESPECTIVAMENTE.  
 LOS PLANOS (ABEP) Y (CDGH) REPRESENTAN LOS GRUPOS NO  
 TRATADOS Y TRATADOS CON CICLOFOSFAMIDA, RESPECTIVAMENTE.  
 LOS PLANOS (ACEG) Y (BDHF) REPRESENTAN LOS GRUPOS CON  
 RESPUESTA HACIA ANTIGENOS CONTAMINANTES Y HACIA ANTIGENOS  
 RELEVANTES, RESPECTIVAMENTE.  
 CADA UNO DE LOS GRUPOS A, B, C, D, E, F, G, H SE ENCUEN-  
 TRAN DEFINIDOS EN EL CUADRO No 2.

#### 4.6 Fusión

Los cuadros números 12 y 13 muestran los resultados de las dos fusiones realizadas con los dos bazos de ratones receptores estimulados con cepa Acatlán V319 y no tratados con ciclofosfamida. El análisis de regresión demostró la relación lineal entre el número de células esplénicas y el promedio por pozo tanto del número de clonas como del número de clonas productoras de anticuerpos ( $r = 0.99$ ). Las rectas de regresión (figura 10) obtenidas fueron:

$$1) m = 1.32 \times 10^{-6} X + 0.032$$

$$2) m' = 1.2 \times 10^{-7} X + 0.07$$

donde: m = promedio de clonas por pozo

m' = promedio de clonas productoras de anticuerpos por pozo.

De estas relaciones resultaron las frecuencias de 1 ( $\pm 0.12$ ) clona por  $7.3 \times 10^5$  CB y 1 ( $\pm 0.22$ ) clona productora de anticuerpos por  $7.96 \times 10^6$  CB. Ya que cada bazo de receptor proporcionó un promedio de  $1.3 \times 10^8$  células, se puede estimar un total de 171 ( $\pm 20$ ) clonas de hibridomas por bazo y 15 ( $\pm 4$ ) clonas productoras de anticuerpos por bazo.

Se clonaron tres de las colonias de hibridomas obtenidas, la figura número 11 muestra la tinción por inmunofluorescencia indirecta de una impronta de cerebro de ratón infectado con virus de la rabia, realizada con uno de los anticuerpos monoclonales producidos.

Cuadro No. 12

Crecimiento de hibridomas en diferentes concentraciones de células de bazo.

Concentración de células de bazo 6 x10	Pozos sembrados	Pozos con hibridomas	Pozos con hibridomas productores de anticuerpos
3.28	36	36	13
1.64	36	32	9
0.68	36	22	5
0.20	36	9	3
<b>Total</b>	<b>144</b>	<b>99</b>	<b>30</b>

Resultados de dos fusiones cada una con el bazo de un ratón receptor no tratado con ciclofosfamida y estimulado con la cepa Acatlán V-329.

Cuadro No. 13

Frecuencia de clonas y de clonas productoras de anticuerpos en diferentes concentraciones de células de bazo.

concentración de células de bazo $6 \times 10^6$ A	Clonas		Clonas productoras de anticuerpos	
	Promedio por pozo (m)*	Frecuencia**	Promedio por pozo (m')†	frecuencia
3.28	----	----	0.45	0.14
1.64	2.2	1.34	0.29	0.17
0.68	0.94	1.38	0.15	0.23
0.20	0.28	1.43	0.08	0.43

\* m y m' calculadas a partir de la forma logarítmica del término cero de la distribución de Poisson ( $m = -\ln F_0$ )

\*\* Calculada a partir de m/A

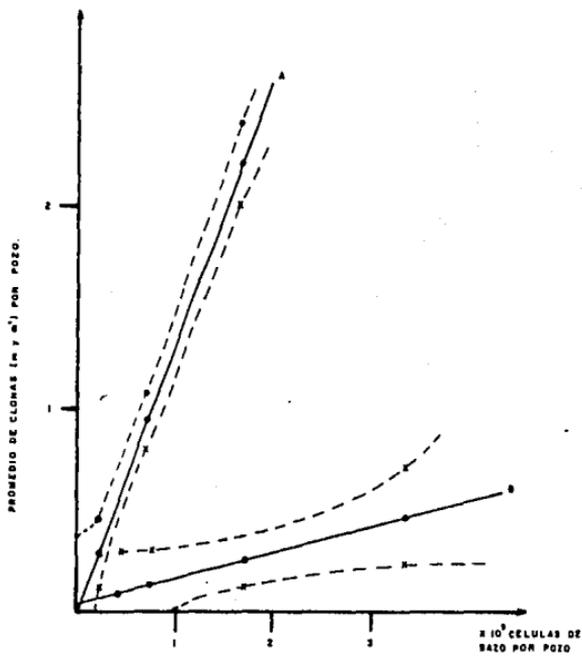


FIGURA No 10.- RECTAS DE REGRESION (CON 95% DE CONFIANZA) ENTRE (A) EL PROMEDIO DE CLONAS Y (B) EL PROMEDIO DE CLONAS PRODUCTORAS DE ANTICUERPOS ESPECIFICOS — CONTRA EL NUMERO DE CELULAS DE BAZO.



Figura No. 11. Prueba de inmunofluorescencia indirecta sobre impropia de cerebro de ratón infectado con virus de la rabia realizada con uno de los AM producidos.

5  
DISCUSION Y CONCLUSIONES

A partir de la década de los sesentas se llevaron a cabo numerosos experimentos de transferencia de inmunidad inyectando linfocitos de donadores inmunes a receptores singénicos no inmunizados, ejemplo de ello son los trabajos realizados por: Gowans y Knight (1964), Ford (1975) y Ptak *et al.*, (1986). Específicamente Moller (1968) inoculó por vía endovenosa células de bazo inmunes contra eritrocitos de carnero (mezclados con el mismo antígeno) a ratones singénicos inmunosuprimidos mediante radiaciones. El resultado obtenido fue un aumento considerable de células productoras de anticuerpos específicos en el bazo del receptor. Moller atribuyó este aumento a la eliminación de los mecanismos naturales de control de la respuesta inmune en estos animales. Mas aún, este autor demuestra que los anticuerpos circulantes tienen una función importante como reguladores de la proliferación de células productoras de anticuerpos.

Actualmente se sabe que la regulación de la respuesta inmune es una serie compleja de interacciones entre varios genes, células y moléculas (McConnell *et al.*, 1981). Los niveles de anticuerpos circulantes están regulados principalmente por los mismos anticuerpos y por linfocitos T supresores. Los anticuerpos inhiben la respuesta al eliminar el antígeno o al competir con el linfocito por el receptor para un determinante antigénico. Se han descrito 2 poblaciones de linfocitos T supresores, una de ellas es estimulada en res-

puesta directa al antígeno y la otra es activada en respuesta a los anticuerpos anti-idiotípicos (Stobo, 1983; McConnell et al., 1981).

Un animal no inmune e irradiado carece de los efectores de la supresión de la síntesis de anticuerpos debido a que las radiaciones afectan a la población de linfocitos. De esta manera al transferir linfocitos inmunes y mezclados con el antígeno a un receptor singénico, no inmune e irradiado, las clonas se multiplicarán sin restricción. Este hecho ha sido aplicado satisfactoriamente por French et al. (1986) y Thiriart (1984) para enriquecer el bazo con clonas productoras de anticuerpos y de esta manera aumentar la frecuencia de hibridomas secretores de anticuerpos.

En el presente trabajo por las dificultades que en nuestro medio implica la irradiación de animales se prefirió ensayar a la ciclofosfamida como agente para inhibir los mecanismos de regulación de la síntesis de anticuerpos.

Otra modificación a las técnicas establecidas de transferencia adoptiva fue la vía de inoculación intraesplénica por las ventajas prácticas que presentó con respecto a la inoculación intravenosa utilizada en los trabajos precedentes y para asegurar, el asentamiento en el bazo de un mayor número de células estimuladas transferidas, ya que según Kennedy et al. (1966) y Moller (1968) por vía intravenosa sólo el 1.5 % de las células inyectadas llegan y se quedan en el bazo.

Por otro lado se ha descrito que la inoculación intraesplénica de antígenos particulados o solubles favorece el surgimiento in situ de clonas productoras de anticuerpos

contra el antígeno inoculado (Spitz et al., 1984).

En trabajos precedentes se ha observado que la transferencia de linfocitos conduce a un aumento del título de anticuerpos en el receptor con respecto al donador. No obstante, en este estudio no se observó una diferencia significativa en el título de anticuerpos de donadores y receptores (cuadros 1 y 2, figura 3). Esto puede deberse a varios factores como son:

i) La titulación de anticuerpos en los receptores se efectuó 4 días posteriores a la transferencia, este periodo puede ser muy corto para que las células estimuladas hubiesen madurado a células plasmáticas.

ii) En los receptores puede existir una respuesta humoral localizada y circunscrita al bazo, ya que el antígeno y las células transferidas se depositaron en este órgano.

iii) Los donadores fueron sangrados 21 días después de un estímulo secundario aplicado por diferentes vías de inoculación con las cuáles se estimulan todos los órganos del sistema reticuloendotelial además del bazo.

Se ha señalado que el peso del bazo constituye un índice de repoblación celular en los animales inmunosuprimidos. En el presente trabajo se observó que el peso del bazo de los ratones receptores era superior al de los donadores (cuadros 3 y 4, figuras 4 y 5). El estudio histológico de estos órganos confirmó que el aumento de peso de los bazos de los receptores se debió a una repoblación linfocitaria y no a un proceso inflamatorio, ya que se observó la estructura

típica de un bazo estimulado, con gran cantidad de centros germinales y vainas periartériolares francamente hiperplásicas. Tampoco se observó atrofia del tejido que indicara una reacción injerto contra huésped o viceversa.

Rao y Pande (1985) implementaron el cultivo de células sobre papel de nitrocelulosa. Por otro lado, Sharon *et al.* (1979) utilizaron la técnica de réplica por inmunoadsorción para la detección de hibridomas productores de anticuerpos, esta técnica consiste en colocar, sobre el medio semisólido donde se efectúa la clonación, un disco de papel de nitrocelulosa sensibilizado con el antígeno, la producción de anticuerpos se revela posteriormente con anticuerpos antigamaglobulina marcados radiactivamente observándose los puntos obtenidos por autorradiografía. Estos trabajos fundamentaron la metodología implementada en el presente estudio para la cuantificación de células de bazo productoras de anticuerpos específicos.

Las técnicas reportadas actualmente en la literatura para la cuantificación de células productoras de anticuerpos específicos son: 1) conteo de unidades formadoras de placas líticas (UFP), en la cual se utilizan eritrocitos sensibilizados con el antígeno (Mishell y Shiigi, 1980); 2) determinación de anticuerpos en el medio de cultivo de diluciones limitantes de las células, esta metodología requiere que la técnica utilizada en la determinación de anticuerpos sea lo suficientemente sensible para detectar la producción de una sola célula (Henry *et al.*, 1980) y 3) citometría de flujo, los citomedidores de flujo son instrumentos capaces de anali-

zar y separar a las células de acuerdo a su tamaño, volumen, índice de refracción, viscosidad, contenido de ADN, ARN, proteínas y enzimas (Stites, 1983).

La metodología implementada en este trabajo ofrece diversas ventajas sobre las tres mencionadas anteriormente, puesto que la sensibilización con el antígeno del papel de nitrocelulosa es más sencilla de realizar que la sensibilización de eritrocitos, por otro lado, la técnica de ELISA para detectar la presencia de anticuerpos no requiere de instrumentos sofisticados ni costosos; además, esta metodología permite diferenciar entre linfocitos B y células plasmáticas, ya que los primeros se fijan al papel sensibilizado por medio de sus receptores del antígeno, la células adheridas y teñidas por la técnica de ELISA se pueden observar con el microscopio óptico. En cambio las células plasmáticas dejan el punto revelado por la prueba de ELISA y no se observa la célula.

La metodología implementada se piensa modificar y optimizar posteriormente para que pueda ser utilizada en la detección de hibridomas productores de anticuerpos.

Los resultados de la cuantificación de las células productoras de anticuerpos específicos indicaron que en un ratón donador existen aproximadamente 482 UFP por cada  $10^6$  células de bazo, mientras que en los receptores se detectan 888, casi 100 % más. Estos resultados confirman que hay multiplicación de las clonas en el receptor.

No se observó una diferencia significativa en el peso, en el estudio histológico, ni en las células productoras de

anticuerpos específicos de los bazo receptores tratados con 1 mg de ciclofosfamida y los no tratados (figuras 3-7, cuadros 5-8). Tampoco se observó depleción linfóide en el corte histológico del bazo de un ratón inmunosuprimido con 1 mg de ciclofosfamida. Sin embargo se comprobó la multiplicación de las células productoras de anticuerpos específicos tanto en receptores no tratados como en los tratados con ciclofosfamida (cuadros 7 y 8). Esto significa que 1 mg de ciclofosfamida no es suficiente para causar la inmunosupresión deseada, pero la carencia de anticuerpos en el receptor es un factor suficiente para que no haya supresión de la proliferación clonal, por lo menos hasta el cuarto día posterior a la transferencia.

Debido a que los donadores habían sido inmunizados con la SVR preparada con la cepa Acatlán V319 cultivada en células BHK, se trató de disminuir la respuesta hacia antígenos irrelevantes presentes en esta suspensión. Para esto, los linfocitos de los donadores se mezclaron con una suspensión de la cepa ERA producida en testículo primario de cerdo. Se comparó el efecto sobre las UFP/10<sup>6</sup> CB al realizar la transferencia mezclando los linfocitos con suspensión de la cepa ERA o con suspensión de cepa Acatlán V319, en el mismo experimento se estudió el efecto de tratar a uno de los receptores con 2 mg de ciclofosfamida, también se comparó la respuesta hacia antígenos relevantes e irrelevantes.

La respuesta hacia antígenos relevantes fue mayor en todos los casos estudiados (cuadro No. 11), sin embargo la respuesta hacia antígenos irrelevantes fue aproximadamente un

50 % de la respuesta hacia antígenos de interés (Cuadro No. 11), esto nos indica que hay una alta probabilidad de obtener clonas productoras de anticuerpos contra determinantes antigénicos que no pertenecen al virus de la rabia sino a otros componentes de la SVR como son los restos de las células BHK.

Los receptores tratados con 2 mg de ciclofosfamida mostraron una mayor proporción de UFP/10<sup>6</sup> CB que los no tratados ( $p < 0.01$ ), esto se puede deber a que esta cantidad del inmunosupresor si logra disminuir considerablemente la población linfóide del receptor y no tiene efecto residual sobre las células inoculadas.

Con la cepa Acatlán V319 se obtuvo una mayor cantidad de UFP/10<sup>6</sup> CB que con la cepa ERA ( $p < 0.01$ ), este resultado se explica por el hecho de que los donadores ya estaban estimulados con esta misma cepa, además la cepa Acatlán V319 tenía un título un poco más alto que la cepa ERA (10<sup>5.9</sup> y 10<sup>5</sup> DL<sub>50</sub>, respectivamente).

La fusión se realizó utilizando los bazo de dos de los ratones receptores no tratados con ciclofosfamida y estimulados con la cepa Acatlán V319. Las células fusionadas se repartieron a razón de  $3.28 \times 10^6$ ,  $1.64 \times 10^6$ ,  $0.68 \times 10^6$  y  $0.20 \times 10^6$  células esplénicas por pozo de cultivo. El motivo de utilizar estas diluciones fue la de aplicar la distribución de Poisson y de esta manera calcular la frecuencia real de clonas obtenidas por células de bazo.

De los resultados de la fusión (cuadros 12 y 13) se estimó un total de 171 (± 25) clonas por cada bazo de las

cuales 15 ( $\pm 4$ ) son productoras de anticuerpos, es decir 9 % de las clonas producidas por cada bazo segregaron algun anticuerpo detectado por la prueba Dot ELISA. En fusiones precedentes realizadas en las mismas condiciones pero utilizando células de bazo de ratones inmunizados convencionalmente, se obtuvieron solo 2 clonas productoras de anticuerpos.

La caracterización de los anticuerpos monoclonales producidos será posteriormente reportada en otro trabajo.

De acuerdo a lo discutido previamente se concluye que:

1. La transferencia adoptiva mediante la inoculación intraesplénica de linfocitos de un ratón donador a 2 receptores es eficaz y facilmente realizable.

2. Mediante la técnica implementada se logró obtener el doble de células productoras de anticuerpos específicos por cada 10<sup>6</sup> células de bazo.

3. Con la metodología propuesta se obtiene una mayor frecuencia de hibridomas productores de anticuerpos específicos.

4. Si bien no se observó ninguna diferencia entre receptores inmunosuprimidos con 1 mg de ciclofosfamida y los no inmunosuprimidos, la técnica en cualquiera de las dos condiciones resultó satisfactoria.

5. Al transferir los linfocitos a un receptor tratado con 2 mg de ciclofosfamida se obtiene un mayor número de células de bazo productoras de anticuerpos específicos.

6. La inmunización alternada con virus producido en diferentes sustratos disminuye la respuesta hacia antígenos irrelevantes.

7. La técnica de cuenta de Unidades Formadoras de Puntos ofrece diversas ventajas sobre las técnicas reportadas para el conteo de células productoras de anticuerpos específicos.

6  
BIBLIOGRAFIA

Aguilar, S.A. y Kretschmer, S.R. (1985). Anticuerpos monoclonales en enfermedades de origen viral. *Salud pública Méx.* 27 (3); 251-259.

Aguilar-Setién, A.; Pastoret, P.P.; Oros-Córdoba, D.; Kretschmer, R. (1986). Anticuerpos monoclonales en rabia. En: *Avances en el uso de vacunas 1985-1985*. Ed. Garza R.J. Y Franco D.G.G. Gerencia general de biológicos y reactivos, Secretaría de Salud. México.

Al Moudallal, Z.; Altshuh, D.; Briand, J.P.; Van regenmortel, M.H.V. (1984). Comparative sensitivity of different ELISA procedures for detecting monoclonal antibodies. *J. Immunol. Meth.* 68; 35-43.

Anderson, J.; Melchers, F. (1978). The antibody repertoire of hybrid cell lines obtained by fusion of X63-Ag8 myeloma cells with mitogen-activated B-cell blasts. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 81; 130-139.

Buttin, G.; Leguern, G.; Phalente, L.; Lin, E.C.C.; Medrano, L.; Cazenave, P.A. (1978). Production of hybrid lines secreting monoclonal anti-idiotypic antibodies by cell fusion on membrane filters. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 81; 27-35.

Carter, M.J.; Meulen, V. (1984). The application of monoclonal antibodies in the study of viruses. In: *Advances in virus research.* 29. Eds. Lauffer, M.A. and Maramorosh, K. Academic Press Inc. USA.

Claffin, L.; Williams, K. (1978). Mouse myeloma-spleen cell hybrids: enhanced hybridization frequencies and rapid screening procedures. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 81; 107-109.

Coffino, P.; Baumal, R., Loskov, R. and Scharff, M.D. (1972). Cloning of mouse myeloma cells and detection of rare variants. *J. Cell Physiol.* 79, 429-440.

Coullon, P.; Rollin, P.; Aubert, M.F.A.; Flamand,

A. (1982) Molecular basis of rabies virus virulence. I. Selection of avirulent mutants of the CVS strain with anti-G monoclonal antibodies. J. Gen. Virol. 6; 97-100.

Daniel, W.W. (1977). Bioestadística; base para el análisis de las ciencias de la salud. Limusa. México.

Davis, B.D.; Dulbecco, R.; Eissen, H.N.; Ginsberg, H.S.; Wood, W.B. Jr.; McCarthy, M. (1978). Tratado de microbiología. 2da. ed. Salvat Editores. España. 1391-1400.

Dietzschold, B.; Cox, J.; Schneider, T.; Wiktor, T.; Koprowski, H. (1978). Isolation and purification of a polymeric form of the glycoprotein of rabies virus. J. Gen. Virol. 40: 131-134.

Dietzschold, B.; Wunner, W.H.; Wiktor, T.J.; Lopes, A.D.; Lafon, M.; Smith, C.L.; Koprowski, H. (1983). Characterization of an antigenic determinant of the glycoprotein that correlates with pathogenicity of rabies virus. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 80, 70-74.

Espmark, A.; Grandien, M. (1983). Other viruses. In: Textbook of medical virology. Eds. Licke, E. and Norrby, E. Buttenworths & Co. England. 336-337.

Fazekas, S.G.S.; Scheidegger, D. (1980). Production of monoclonal antibodies: strategy and tactics. J. Immunol. Meth. 35; 1-21.

Flamand, A.; Wiktor, T.J.; Koprowsky, H. (1980). Use of hybridoma monoclonal antibodies in the detection of antigenic differences between rabies and rabies related virus. I. The nucleocapsid protein. J. Gen. Virol. (1980); 48:105-109.

Flamand, A.; Coulon, P. Dialo, A. Lafay, F. (1985). La rage: effet sur la virulence de mutations localisée dans le site III de la glycoprotéine. Summaries of communications, Symposium on vaccines and vaccinations, Institut Pasteur, Paris.

Ford, W.I. (1975). Lymphocyte migration and immune response. *Progr. Allergy*. 19, 1-4.

French, D.; Fischberg, E.; Buhl, S.; Scaherff, M.D. (1986). The production of more useful monoclonal antibodies. *Immunology Today* 7(11); 344-346.

Galfré G.; Milstein, C. (1979). Preparation of monoclonal antibodies; strategies and procedures. *Meth. Enzimol.* 73; 3-46.

Geffter, M.; Margulies, D.H.; Scharff, M.D. (1977). A simple method for polyethylene glycol promoted hybridization of mouse myeloma cells. *Somat. Cell. Genet.* 3, 231-236.

Goding, J.W. (1980). Antibody production by hybridoma. *J. Immunol. Meth.* 39; 285-308.

Goldsby, R.A.; Osborne, B.A.; Suri, D.; Mandel, A.; Williams, J.; Gronowicz, E.; Herzenberg, L.A. (1978). Production of specific antibody without specific immunization. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 81; 149-151.

Gowans, J.L.; Knight, E.S. (1964). The route of recirculation of lymphocyte in the rat. *Proc. Roy. Soc. Lond. B.* 159, 257-262.

Hengartner, H.; Luzzati, A.L.; Schreir, M. (1978). Fusion of in vitro immunized lymphoid cells with X63Ag8. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 81; 92-99.

Henry, C.; Marbrook, J.; Vann C.D.; Kodlin, D.; Wofsy, C. (1980). Limiting dilution analysis. In: Selected methods in cellular immunology. Eds. Mishell, B.B. and Shigii, S.M. Freeman, San Francisco, Ca. USA. 138-152.

Hernández, B.H. (1976). La rabia parásitante bovina definición del problema y metodología del control. *Ciencia Veterinaria* 1; 103-129.

Herzenberg, H.; Black, S.J.; Tokahisa, T.; Herzenberg, L.A. (1980). Memory B cells at

successive stages of differentiation affinity maturation and the role of IgD receptors. *J. Exp. Med.* **151**: 1071-1087.

Hurley, D.P.; Aguilar, A.; Garibay, J.; Landeros, J. (1981). Estadística, curso CINVESTAV-SEP. Depto. de matemáticas, FES Cuautitlan, UNAM. México.

Karsten, V.; Papsdorf, G.; Roloff, G.; Stolley, P.; Abel, H.; Walter, I.; Weiss, H. (1985). Monoclonal anti-cytokeratin antibody from a hybridoma clone generated by electrofusion. *Eur. J. Cancer Clin. Oncol.* **21**: 733-740.

Kennedy, J.C.; Till, J.E.; Siminovitch, L.; McCulloch, E.A. (1966). The proliferative capacity of antigen sensitive precursors of hemolytic plaque-forming cells. *J. Immunol.* **96**(8): 973-980.

Kieny, M.P.; Lathé, R.; Drillien, R.; Spehner, D.; Skori, S.; Schmitt, D.; Wiktor, T.J.; Koprowsky, H.; Lecocq, J.P. (1984). Expression of rabies virus glycoprotein from a recombinant vaccinia virus. *Nature*, **312**: 163-166.

Knudsen, K.A. (1985). Proteins transferred to nitrocellulose for use as immunogens. *Anal. Biochem.* **147**: 285-288.

Kohler, G.; Milstein, C. (1975). Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature* **256**: 495-497.

Koprowski, H.; Gerhard, W.; Wiktor, T.; Martinis, J.; Shander, M.; Croce, C.M. (1978). Anti-viral and anti-tumor antibodies produced by somatic cell hybrids. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **81**: 8-19.

Koprowski, H. and Wiktor, T. (1981). Monoclonal antibodies against rabies virus. In: *Monoclonal Antibodies hybridomas. A new dimension in biological analysis.* Eds. Kennet, R.H., McKearn, T.J. and Bechtol, K.B. Pleneun Press. New York-London.

Kranz, D.M.; Billing, P.A.; Herron, J. N.; Voss

Jr., E.W. (1980). Modified hybridoma methodology: Antigen-directed chemically mediated cell fusion. *Immunol. Commun.* 9(7); 639-651.

Kucera, L.S.; Myrvik, Q.N. (1985). *Fundamentals of medical virology*. 2th. ed. Lea & Febiger. USA. 136-141.

Lafon, M.; Wiktor, T.J.; MacFarlan, R.I. (1983). Antigenic sites on the CVS rabies virus glycoprotein: Analysis with monoclonal antibodies. *J. Gen. Virol.* 64; 843.

Lane, R.D.; Crissman, R.S.; Lachman, M.F. (1984). Comparison of polyethylene glycols as fusogens for producing lymphocyte-myeloma hybrids. *J. Immunol. Meth.* 72; 71-76.

Lane, R.D. (1985). A short-duration polyethylene glycol fusion technique for increasing production of monoclonal antibody-secreting hybridomas. *J. Immunol. Meth.* 81; 223-228.

Lernhardt, W.; Anderson, J.; Coutinho, A.; Melchers, F. (1978). Cloning of murine transformed cell lines in suspension culture with efficiencies near 100 %. *Expl. Cell. Res.* 111, 309-316.

Lin, K.; Halbert, T. (1983). Dot-Enzyme linked immunosorbent assay: a microtechnique for the rapid diagnosing of visceral leishmaniasis. *J. Immunol. Meth.* 64, 205-214.

Littlefield, J.W. (1964). Selection of hybrids from matings of fibroblasts *in vitro* and their presumed recombinants. *Science* 145, 709-710.

Lo, M.M.S.; Tsong, T.Y.; Conrad, M.K.; Strittmatter, S.M.; Hester, L.D.; Solomon, H.S. (1984). Monoclonal antibody production by receptor-mediated electrically induced cell fusion. *Nature* 310; 792-794.

Luria, S.E.; Darnell, J.E.; Baltimore, D.; Campbell, A. (1978). Animal virus multiplications: The RNA viruses. In: *General virology*. 3th ed. John

Wiley and sons, USA. 327-338.

McDade, J.E. (1985). Diagnostic application of monoclonal antibodies. Infections disease diagnosis. In: Monoclonal antibodies in clinical diagnostic medicine. Ed. Gordon, S.D. IGAKU-SHOIN. New York-Tokio. 137-152.

McConnell, I.; Munro, A.; Waldmann, H. (1981). The immune system. A course on the molecular and cellular basis of immunity. Blackwell Scientific Publications. England.

Melchers, F.; Potter, M.; Warner, N.L. (1978). Preface. Curr. Top. Microbiol. Immunol. 81; IX-XVIII.

Mishell, B.B.; Shiigi, S.M. (1980). Selected method in cellular immunology. W. H. Freeman and Co. USA.

Moller, G. (1968). Regulation of antibody synthesis. Cellular 7S production and longevity of 7S antigen-sensitive cells in the absence of antibody feedback. J. Exp. Med. 127; 291-305.

Oi, V.T. and Hersenberg, L.A. (1980). Immunoglobulin producing hybrid cell line. In: selected methods in cellular immunology. Eds. Mishell, B.B. and Shiigi, S.M. Freeman, San Francisco CA. USA. 351-372.

Ptak, W.; Green, D.R.; Flood, P. (1986). Cellular interactions in the adoptive transfer of contact sensitivity: Characterization of an antigenic-nonspecific *Vicia villosa*-adherent T cell needed for adoptive transfer into naive recipients. J. Immunol. 137(6); 1822-1828.

Pauli, G.; Gregersen, J.; Ludwig, H. (1984). Plaque/focus immunoassay: a simple method for detecting antiviral monoclonal or other antibodies and viral antigens in cells. J. Immunol. Meth. 74; 337-344.

Rao, S.G.A.; Pande, Gopal. (1985). A new method for the growth of myeloid progenitor cells on

nitrocellulose paper. J. Immunol. Meth. 85: 347-351.

Rathjen, P.A. and Underwood, P.A. (1985). Optimization of conditions for *in vitro* stimulation of dissociated mouse spleen cells for the production of monoclonal antibodies against peptide hormones. J. Immunol. Meth. 78: 227-237.

Reading, C.L. (1982). Theory and methods for immunization in culture and monoclonal antibody production. J. Immunol. Meth. 53: 261-291.

Reagan, K.J.; Wunner, W.H.; Wiktor, T.J.; Koprowsky, H. (1983). Anti-idiotypic antibodies induce neutralizing antibodies to rabies virus glycoprotein. J. Virol. 48, 660.

Russell, P.H.; Griffiths, P.C.; Cannon, M.J. (1983). A microwell immunoperoxidase test for screening hybridomas and for diagnosing Newcastle disease virus and Sendai virus. J. Immunol. Meth. 61: 165-170.

Sakato, N. and Eissen H.N. (1975). Antibodies to idiotypes of isologous immunoglobulins. J. Exp. Med. 141: 1411-1425.

Sharon, T.; Morrison, S.L.; Kabat, E.A. (1979). Detection of specific hybridoma clones by replica immunoadsorption of their secreted antibodies. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 76(3): 1420-1424.

Shope, R.E. (1984). Rabies enigma: Human and animal disease control. In: Applied virology. Ed. Kurstak, E. Academic Press Inc. London.

Shope, R.E.; Tignor, G.H.; Burrage, T.G. (1985). Advances in rabies virus research. In: Veterinary viral disease. Their significance in south-east Asia and the western Pacific. Ed. Della-Porta, A.J. Academic Press Inc: Australia. 361-373.

Snedecor, G.W.; Cochran, W.G. (1971). Métodos Estadísticos. CECSA, México.

Spitz, M.; Spitz, L.; Thorpe, R.; Eugui, E. (1984). Intraesplenic primary immunization for the production of monoclonal antibodies. *J. Immunol. Meth.* **70**; 39-43.

Stahli, C.; Staehelin, T.; Miggianno, V.; Schmidt, J.; Haring, P. (1980) High frequencies of antigen-specific hybridomas: dependence on immunization parameters and prediction by spleen cell analysis. *J. Immunol. Meth.* **32**; 297-304.

Steek, F.; Wandeler A.L.; The epidemiology of fox rabies in Europe. (1980). *Epidem. Rev.* **2**; 71-96.

Stites, D.P. (1983). Métodos clínicos de laboratorio para la localización de la función inmunitaria celular. En: *Inmunología básica y clínica*. Editores: Stites, D.P.; Stobo, J.D.; Funderberg, H.H. y Wells, J.V. 4ta. edición. El manual moderno. México.

Stobo, J.D. (1983). Interacciones celulares en la expresión y regulación de la inmunidad. En: *Inmunología básica y clínica*. Editores: Stites, D.P.; Stobo, J.D.; Funderberg, H.H. y Wells, J.V. 4ta. edición. El Manual Moderno. México.

Sureau, P.; Rollin, P.; Wiktor, T. (1983). Epidemiologic analysis of antigenic variations of street rabies virus: detection by monoclonal antibodies. *Am. J. Epidemiol.* **117** (5); 605-609.

Sureau, P. (1985). La vaccination contre la rage. *La recherche* **16**(168); 874-882.

Taggart, R.T. and Samloff, I.M. (1983). Stable antibody-producing murine hybridomas. *Science* **219**,1228-1230.

Thalhamer, J.; Freund, J. (1985). Passive immunization: a method of enhancing the immune response against antigens mixtures. *J. Immunol. Meth.* **80**; 7-13.

Thiriart, C. (1984). Etude préliminaire du système

antigenique des rotavirus. Memoire en vue de l'obtention du grade de licence en biologie moleculaire. Universite Libre de Bruxelles. Belgique.

Turk, J.L.; Parker D. (1979). The effect of cyclophosphamide on the immune response. *J. Immunopharm.* 1; 127-131.

Turk, J.L.; Poulter, L.W. (1972). Selective depletion of lymphoid tissue by cyclophosphamide. *Clin. Exp. Immunol.* 10; 285-287.

Van Mourik, P.; Rivero, R.A.; Van der Kwast, Th.H.; Lansdorp, P.B.; Zeijlemaker, W.P. (1984). Density separation of spleen cells increases fusion frequency and yield of Ig-producing hybridomas. *J. Immunol. Meth.* 68; 45-53.

Van Ness, J.; Laemli, V.K.; Pettijohn, D.E. (1984). Immunization in vitro and the production of monoclonal antibodies specific to insoluble and weakly immunogenic proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 81; 7897-7901.

Westerwoud, R.J.; Naipal, A.M.; Harrison, C.M.H. (1984). Improved fusion technique. II. Stability and purity of hybrid clones. *J. Immunol. Meth.* 68; 89-101.

Wiktor, T.J.; Koprowsky, H. (1978). Monoclonal antibodies against rabies virus produced by somatic cell hybridization: detection of antigenic variants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 78; 3938-3942.

Wiktor, T.J.; Koprowsky, H. (1980). Antigenic variants of rabies virus. *J. Exp. Med.* 152; 99-112.

Wiktor, T.J.; MacFarlan, R.I., Reagan, K.J.; Dietzschold, B.; Curtis, P.J., Wunner, W.H.; Kieny, M.P.; Lathe, R.; Lecocq, J.P.; Mackett, M.; Moss, B.; Koprowski, H. (1984). Protection from rabies by a vaccinia virus recombinant containing the rabies virus glycoprotein gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 81; 7194-7198.

Yelton, D.E.; Diamond, B.A.; Kwan, S.P. and Scharff, M.D. (1978). Fusion of mouse myeloma and spleen cells. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 81; 1-7.

Yelton, D.E.; Margulies, D.H.; Diamond, B.; Scharff, M.D. (1981). Plasmacytomas and hybridomas. Development and applications. In: *Monoclonal antibodies hybridomas. A new dimension in biological analysis.* Eds. Kennett, R.H., McKearn, T.J. and Bechtol, K.B. Plenum Press. New York-London.