



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE GUERRERO

**UNIDAD ACADÉMICA DE CIENCIAS QUÍMICO BIOLÓGICAS
UNIDAD ACADÉMICA DE MEDICINA
UNIDAD DE INVESTIGACIÓN ESPECIALIZADA EN MICROBIOLOGÍA**

MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

**“PRODUCCIÓN DE ANTICUERPOS MONOCLONALES CONTRA
LA PROSTAGLANDINA E2 (PGE2) EN RATONES BALB/C”**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOMÉDICAS**

P R E S E N T A:

Q.B.P. VERANYER GUTIERREZ ÁVILA

DIRECTORA DE TESIS: Dra. AMALIA VENCES VELÁZQUEZ

CODIRECTORA DE TESIS: M.C. YOLANDA MEDINA FLORES

InDRE

Chilpancingo Gro. Diciembre del 2011



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE GUERRERO
UNIDAD ACADÉMICA DE CIENCIAS QUÍMICO BIOLÓGICAS
UNIDAD ACADÉMICA DE MEDICINA
UNIDAD DE INVESTIGACIÓN ESPECIALIZADA EN MICROBIOLOGÍA
MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

APROBACIÓN DE TESIS

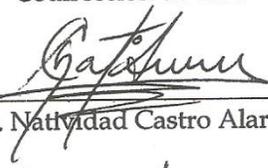
En la ciudad de Chilpancingo, Guerrero, siendo los 31 días del mes de agosto de dos mil once, se reunieron los miembros del Comité Tutorial designado por la Academia de Posgrado de la Maestría en Ciencias Biomédicas, para examinar la tesis titulada "Producción de anticuerpos monoclonales contra la prostaglandina E2 (PGE2) en ratones BALB/c", presentada por la alumna Veranyer Gutiérrez Ávila para obtener el Grado de Maestría en Ciencias Biomédicas. Después del análisis correspondiente, los miembros del comité manifiestan su aprobación de la tesis, autorizan la impresión final de la misma y aceptan que, cuando se satisfagan los requisitos señalados en el Reglamento General de Estudios de Posgrado e Investigación Vigente, se proceda a la presentación del examen de grado.

El Comité Tutorial


Dra. Amalia Vences Velázquez
Dirección de tesis


M en C. Yolanda Medina Flores
Codirección de tesis


Dra. Emma Rosalba Leyva Salgado

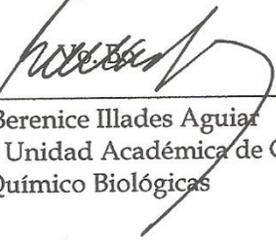

Dra. Natividad Castro Alarcón


Dra. Ma. Elena Moreno Godínez




Vo. Bo
Dra. Isela Parra Rojas
Coordinadora del Posgrado en Ciencias Biomédicas




Dra. Berenice Illades Aguiar
Directora de la Unidad Académica de Ciencias Químico Biológicas

Este trabajo se realizó en el Laboratorio de Anticuerpos monoclonales del Instituto de Diagnóstico y Referencias Epidemiológicas (InDRE) de la SSA en México D.F.

Bajo la dirección de la

Dra. Amalia Vences Velázquez

La Codirección de la

M en C. Yolanda Medina Flores

La asesoría de la

Dra. Ma. Elena moreno Godínez

Dra. Natividad Castro Alarcón

Esta investigación se desarrolló con el financiamiento de PROMEP (UAGUER-107).

Durante el período en que cursó la Maestría en Ciencias Biomédicas, la C. **Veranyer Gutiérrez Ávila**, recibió beca del CONACYT.

AGRADECIMIENTOS

Por medio de estas líneas quiero mostrar mi más sincero agradecimiento a todas aquellas personas que de alguna manera hicieron posible la realización de este trabajo:

A la M.C Yolanda Medina Flores por su apoyo y amistad incondicional durante el desarrollo de este proyecto, por haberme aceptado en el laboratorio de anticuerpos monoclonales.

A la Dra. Amalia, por haber propuesto el tema de investigación y brindarme la oportunidad de desarrollarlo.

A mis sinodales: Dra. María Elena Moreno Godínez y Natividad Castro Alarcón por las correcciones brindadas a mi trabajo.

A todos los compañeros que forman parte del laboratorio de anticuerpos monoclonales y que durante mi estancia en el me brindaron su amistad: Anabelle, Amanda, Aarón, Connie, Edith, Elibeth, Jaqueline, Juan Carlos, Luis, Marisol, don Mario y Olga.

A mis amigos de la maestría Cahua, Ramón e Inés gracias por su amistad.

A mis compañeros de la maestría por los momentos vividos durante estos 2 años.

DEDICATORIAS

Son muchas las personas especiales a las cuales me gustaría dedicar este trabajo:

A dios por haberme permitido llegar hasta esta esta etapa de mi vida.

A mi niño hermoso: Yael, tu que me has regalado momentos felices y que has soportado mi ausencia durante meses.

A mis padres Maura y Valeriano, no les había agradecido todo lo que han hecho por mí: su amor, apoyo, sacrificios. Los quiero mucho y espero algún día regresarles algo de lo mucho que me han dado.

A mis hermanos Oliver, Julio, Marina, Liliana y Juan Luis que aunque lejos de mí, siempre están conmigo.

A todos mis familiares: abuelos (Rosa, Florina y Luis), tíos, sobrinos y primos por sus consejos y ánimos.

ÍNDICE

	Pág.
RESUMEN	1
ABSTRACT	2
INTRODUCCIÓN	3
MATERIAL Y MÉTODOS	7
RESULTADOS	12
DISCUSIÓN	19
ANEXOS	24
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	32

ÍNDICE DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1 Respuesta inmune humoral de los 5 ratones después de 3 inmunizaciones con PGE2	12
Figura 2 Colonia de hibridomas. Vistos en aumento 10X en el microscopio Invertido	13
Figura 3 Hibridomas positivos evaluados mediante ELISA indirecto a una longitud de onda de 490 nm.	14
Figura 4 Subclonas productoras de anticuerpos anti-PGE2 evaluadas mediante ELISA indirecto a una longitud de onda de 490 nm	15
Figura 5 Subclases de los anticuerpos producidos por los hibridomas 5F3D9E12, 5C2D3F5 Y 1C7B5B10	17
Figura 6 Corrimiento electroforético de los anticuerpos de tipo IgG1 anti-PGE2 purificados de los sobrenadantes de los hibridomas 1C7B5B10 5C2D3F5 y 5F3D9E12, en gel de gradiente (5 al 10% de acrilamida) en condiciones reductoras y no reductoras.	18
Figura 7 ELISA indirecto como prueba final del anticuerpo monoclonal	18

ÍNDICE DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1 Esquema de inmunización	7
Tabla 2 Calendario del cambio de medio para la selección bioquímica de los hibridomas	9
Tabla 3 Hibridomas originales y los grupos de clonas obtenidos	16
Tabla 4 Concentración de los anticuerpos monoclonales.	17

RESUMEN

Las prostaglandinas son ácidos carboxílicos insaturados, que consisten en un esqueleto de 20 carbonos con un anillo ciclopentano, se encuentra en casi todos los tejidos y líquidos orgánicos, su producción aumenta en respuesta a diversos estímulos y ejercen un amplio espectro de efectos biológicos. En determinados procesos patológicos, como en las inflamaciones y en las neoplasias, existe una sobreexpresión de la enzima COX-2, que cataliza la producción de prostaglandinas como la PGE2 la cual estimula la angiogénesis, la progresión del cáncer, promueve la invasión celular, inhibe la apoptosis y conduce a una inmunosupresión, por lo que se sugiere que pueda ser utilizado como un marcador de diagnóstico contra lesiones precancerosas, principalmente en cérvix. En el presente trabajo se describe la producción de anticuerpos monoclonales contra la prostaglandina E2 utilizando la técnica de generación de hibridomas. Para ello los ratones fueron inmunizados con 4 dosis del antígeno (25 µg de PGE2-BSA o solo PGE2). El título de anticuerpos anti-PGE2 fue determinado por ELISA indirecto tanto en el suero de los ratones y en los sobrenadantes de cultivo. Se obtuvieron un total de 82 subclonas productoras de anticuerpos anti-PGE2. De estas se eligieron 3, las que presentaron mayor absorbancia para ser expandidas en botellas de 25cm² y de ellas se obtuvieron los anticuerpos monoclonales. Se determinó la subclase de los anticuerpos por medio de ELISA de captura y se encontró que las 3 subclonas producen anticuerpos IgG subclase 1. Se purificaron los anticuerpos utilizando el kit comercial Montage Antibody Purification Columns with PROSEP G Media y finalmente se determinó la concentración de los anticuerpos obteniéndose para la subclona 1C7B5B10 110µg/mL, para la 5C2D3F5 119µg/mL y para la 5F3D9E12 300µg/mL.

Palabras claves: anticuerpos monoclonales, prostaglandina E2, cáncer.

ABSTRACT

Prostaglandins are unsaturated carboxylic acids, which consist of a 20-carbon skeleton with a cyclopentane ring, they are found in almost all body tissues and fluids, and their production increases in response to various stimuli and have a broad spectrum of biological effects. In certain pathological processes, such as inflammation and neoplasias, there is overexpression of COX-2, an enzyme, which catalyzes the production of prostaglandins such as PGE2. The increase in PGE2 production stimulates angiogenesis, progression of cancer, promotes cell invasion, inhibits apoptosis, leads to immunosuppression and therefore it is suggested that can be used as a diagnostic marker against precancerous lesions, especially in the cervix. This work describes the production of monoclonal antibodies against prostaglandin E2 using the technique of generating hybridomas. Mice were immunized with 4 doses of antigen (25 µg of PGE2-BSA or only PGE2). The title of anti-PGE2 antibodies was determined by indirect ELISA in the serum of mice and supernatants of culture. Obtained a total of 82 subclones producing antibodies anti-PGE2. Of these 3 were chosen, which showed higher absorbance to be expanded in 25cm² bottles and they were obtained monoclonal antibodies. Subclass was determined by capture ELISA and found that the 3 subclones generate antibodies IgG subclass 1. Antibodies were purified using the kit comercial Montage Antibody Purification Columns with PROSEP G Media and finally determined the antibody concentration obtained for the subclone 1C7B5B10 110µg/mL, for 5C2D3F5 119µg/mL and for 5F3D9E12 300µg/mL.

Keywords: monoclonal antibodies, prostaglandin E2, cancer.

INTRODUCCIÓN

Las prostaglandinas (PG) son ácidos carboxílicos insaturados, que consisten en un esqueleto de 20 carbonos con un anillo ciclopentano, se encuentra en casi todos los tejidos y líquidos orgánicos, su producción aumenta en respuesta a diversos estímulos y ejercen un amplio espectro de efectos biológicos (Christie, 2009). Son una familia de moléculas biológicamente activas con diversas acciones dependiendo del tipo de PG y la célula blanco.

Entre las funciones de las prostaglandinas podemos mencionar que: actúan como mensajeros autócrinos y parácrinos, participan en la inducción de la inflamación, en la mediación de señales de dolor, la inducción de fiebre, en la contracción del músculo liso (incluyendo el útero), relajación del músculo liso (especialmente la serie PGE), y en la protección de las paredes del estómago (Brandt, 2004, Chizzolini and Brembilla, 2009).

La biosíntesis de las prostaglandinas empieza con la liberación de fosfolípidos de la membrana celular, cuando el tejido es expuesto a un estímulo fisiológico o patológico (estímulos mecánicos, inmunológicos, químicos u hormonales, factores de crecimiento, citocinas). Los fosfolípidos son rápidamente metabolizados a ácido araquidónico por acción de la fosfolipasa A2 y posteriormente son oxigenados por la enzimas ciclooxigenasas (COX) también llamadas prostaglandina H sintetasa, produciendo una prostaglandina intermedia PGH₂ (Tilley *et al.*, 2001). Se han identificado 3 isoformas de COX con diferentes distribuciones y funciones fisiológicas: COX 1, COX 2 y COX 3 (Reid *et al.*, 2003). COX 1 es una enzima que se expresa de manera constitutiva e interviene en la síntesis del tromboxano A₂ en plaquetas y macrófagos, PGI₂ en plaquetas y célula endotelial y PGE₂ en útero, ovario, osteoclastos, riñón y estómago, entre otros tejidos. COX 2 es una enzima inducible originada por el estímulo mecánico e inmunológico (inflamatorio), que promueve la formación de diversos mediadores proinflamatorios, principalmente prostaglandinas-prostanoides (E₂, D₂, I₂) (Christie, 2009). COX-3 fue descubierta en el 2002, y se cree que es una variante de COX-1 por splicing de un intrón. Tiene una secuencia similar, pero no secuencia de aminoácidos idéntica a COX-1, y tiene algunas diferencias funcionales (Brandt, 2004).

La prostaglandina E2 (PGE2), alguna vez considerada como el prototipo de mediador de la inflamación, es ahora considerada como un promotor del crecimiento neoplásico y de la angiogénesis tumoral. Este concepto ha sido establecido por estudios experimentales que muestran una mayor expresión de las isoformas de la ciclooxigenasa (COX-1 y COX-2), así como niveles aumentados de PGE2, el principal producto de la actividad de estas enzimas, en varios tejidos tumorales (ej. los tumores de colon, mama, pulmón, próstata, cérvix) (Subbaramaiah and Dannenberg, 2007, Finetti *et al.*, 2008).

Se han sugerido varios mecanismos por los que la PGE2 producida por COX-2 ejerce su actividad tumorigénica. En primer lugar, la PGE2, el principal metabolito de la COX-2, es un promotor del crecimiento celular y puede estimular la proliferación de las células cancerígenas. En segundo lugar, la COX-2 es un estimulador angiogénico y que puede aumentar la producción de factores angiogénicos y la migración de las células endoteliales. En tercer lugar, la PGE2 producida por COX-2 es una molécula anti-apoptótica que puede prevenir la apoptosis inducida por fármacos contra el cáncer. En cuarto lugar, la PGE2 es una molécula inmunomoduladora que puede suprimir la actividad antitumoral de las células Natural Killer y macrófagos. Por último, la expresión de COX-2 puede incrementar la capacidad invasiva de las células tumorales y está estrechamente relacionado con metástasis a los ganglios linfáticos (Pan *et al.*, 2008, Jain *et al.*, 2008).

La PGE2 ejerce sus funciones biológicas a través de la unión a cuatro tipos de receptores acoplados a proteína G denominados EP1- 4, que se acoplan río abajo a distintos sistemas de segundos mensajeros (Sugimoto and Narumiya, 2007). EP1 es un receptor acoplado a proteína Gq que produce señales de Ca^{2+} y diacilglicerol mientras que EP2 y los receptores EP4 están acoplados a proteínas Gs y elevan los niveles de cAMP. El receptor EP3, por último, del cual existen 8 variantes producidas por medio del splicing alternativo, conduce principalmente a la desregulación de la vía de señalización de cAMP por la inhibición de la adenilato ciclasa mediada por proteína Gi (Kuo *et al.*, 2009).

Con el descubrimiento de los Anticuerpos Monoclonales (AcMo) por Köhler y Milstein en 1975 provoca un gran avance en todo el ámbito de la Biomedicina, y de forma

especial en el diagnóstico, pronóstico y tratamiento del Cáncer. Los biomarcadores tumorales son algunas de las sustancias contra lo que se han producido anticuerpos monoclonales utilizándolos como un método de diagnóstico. Los biomarcadores, son sustancias producidas por las células tumorales o por otras células del cuerpo como respuesta al desarrollo del cáncer o de lesiones benignas (no cancerosas). Estas sustancias se pueden encontrar en la sangre, orina, o directamente en el tumor o en tejidos adyacentes al mismo (Bigbee W, 2003). La mayoría de los biomarcadores tumorales ni son ideales ni son sintetizados exclusivamente por el tumor, detectándose en el suero y otros líquidos biológicos en ausencia de cáncer, por lo que su empleo, así como su interpretación, no es fácil ni sencillo, Por tal motivo, sus determinaciones habrá que analizarlas de forma muy correcta, valorando enfermedades benignas concomitantes (Shakespeare, 2008).

La prostaglandina E2 es un reconocido mediador de la inflamación. Se han encontrado que niveles altos de PGE2 se relacionan con la progresión tumoral. Sugiriendo esta prostaglandina como un buen biomarcador tumoral.

Los anticuerpos monoclonales son inmunoglobulinas con una especificidad definida, producidos por una célula híbrida producto de la fusión de una clona de Linfocitos B y una célula tumoral. Sus actividades biológicas se caracterizan por la unión específica a un ligando (comúnmente conocido como antígeno) (Peterson, 2005). Los anticuerpos monoclonales tienen la característica peculiar de que son altamente específicos y sensibles (Chiarella and Fazio, 2008), lo cual los hace las herramientas ideales para la investigación biológica, diagnóstico médico y tratamiento (Pata *et al.*, 2009).

La tecnología de generación de hibridomas para crear anticuerpos monoclonales fue descrita por Köhler y Milstein en 1975 (Álvarez-Vallina, 2004). Los hibridomas son células derivadas de la fusión de células de mieloma inmortal con linfocitos B tomados del bazo de los animales inmunizados con el antígeno blanco (Chiarella and Fazio, 2008).

De forma general esta tecnología se encuentra basada en los siguientes aspectos:

Los linfocitos B sintetizan su DNA por dos vías: endógena o de novo y exógena. Estas células del bazo mueren en periodos cortos cuando se encuentran en cultivo.

La línea del mieloma utilizada es hipoxantina-guanina-fosforribosil-transferasa negativa (HGPRT-) característica por la cual no sintetizan DNA por vía exógena, realizándose únicamente la síntesis por vía endógena (Medina and Gavilondo, 2000). La unión de estas 2 líneas celulares, se realiza a través de un agente fusógeno: el polietilenglicol (PEG); facilitándose de esta manera, la formación de células híbridas. Estos híbridos heredan del linfocito B: la capacidad de producir anticuerpos a través de su vía exógena activa y de las células de mieloma heredan la capacidad de crecer viables en medio de cultivo. Posteriormente, se realizan pruebas para detectar el anticuerpo de interés (tamizaje) mediante la técnica de ELISA (Ensayo Inmunoabsorbente Ligado a Enzima) , que en caso de resultar positivas, se procede a realizar la clonación; proceso que consiste en la obtención de una población celular derivada de una célula madre, de forma que todas las células hijas posean la misma información genética (Machado *et al.*, 2006).

La producción de anticuerpos dirigidos contra moléculas lipídicas bioactivas es un proceso difícil y complejo. Sin embargo se han obtenido anticuerpos monoclonales contra moléculas lipídicas como ejemplos tenemos: anticuerpos anti-colesterol (Biro *et al.*, 2007), anti-esfingosina 1-fosfato (O'Brien *et al.*, 2009), también ya se han producido anticuerpos monoclonales contra las prostaglandinas E y F (Brune *et al.*, 1985, Tanaka *et al.*, 1985).

El objetivo planteado en este trabajo fue producir anticuerpos monoclonales contra la PGE2 en ratones Balb/c mediante la técnica de generación de hibridomas. Se tiene la finalidad de usarlos como herramientas de diagnóstico en trabajos posteriores en lesiones precancerosas principalmente en cérvix uterino.

MATERIAL Y MÉTODOS

Acoplamiento de la PGE2 a Albúmina Sérica Bovina (BSA)

La prostaglandina E2 (Cayman Chemical) fue unida covalentemente a la albúmina sérica bovina (Calbiochem) mediante N-(3-dimetilaminopropil)-N'-etilcarbodiimida ácido clorhídrico (EDC-HCl) (Sigma). Para estabilizar la reacción se adicionó N-hidroxisuccinimida (NHS) (Sigma) utilizando el protocolo recomendado por el fabricante (anexo 1).

Inmunización

Se utilizaron 5 ratones Balb/c hembras de 6 semanas de edad, los cuales fueron inmunizados por vía intraperitoneal con 25 µg del conjugado PGE2-BSA emulsificado con Adyuvante Completo e Incompleto de Freud en proporción 1:1 cada 7 días (tabla 1). La última inmunización se realizó 3 días antes de la fusión solo con PGE2 (25µg).

Tabla 1. Esquema de inmunización

Día	Dosis	Tipo de adyuvante	Vía de inoculación
1	25 µg (conjugado)	Completo	IP
7	25 µg (conjugado)	Incompleto	IP
14	25 µg (conjugado)	Incompleto	IP
21	25 µg (PGE2)		IP

* Conjugado (PGE2 + albúmina sérica bovina)

*IP intraperitoneal

Estandarización del ELISA

Con la finalidad de estandarizar la técnica de ELISA se realizó una curva de concentraciones del conjugado PGE2-BSA con 50 µg, 25 µg, 12 µg y 7 µg. Los sueros de los ratones inmunes se probaron a diferentes diluciones (1:1000 - 1:64000), la concentración que se utilizó para determinar el título de anticuerpos tanto en el suero de los ratones como en los sobrenadantes de cultivo fue de 7 µg/mL.

Monitoreo del título de anticuerpos anti-PGE2

La respuesta inmune humoral de los ratones fue monitoreada mediante ELISA indirecto después de la tercera inmunización con PGE2. Con la finalidad de detectar anticuerpos específicos contra la PGE2 se utilizó la ovoalbúmina (OVA) en lugar de la BSA. Se diluyó el antígeno (PGE2-OVA) en una concentración de 7 µg/mL en amortiguador de carbonatos a pH 9.6 para sensibilizar los pozos de poliestireno de las placas de ELISA. A la placa se agregaron 100 µL/pozo de la solución de antígeno y se incubó a 4°C por 20 hrs. Esta solución se eliminó vertiendo el contenido de la placa y el exceso se secó sobre una gasa. La placa se lavó 3 veces con PBS Tween 20 al 0.5% a pH 7.2, el intervalo de tiempo entre cada lavado fue de 5 min. Para bloquear los sitios en donde no se adhirió el antígeno se agregaron 200 µL/pozo de solución bloqueadora (leche al 5% diluida en PBS Tween 20 pH 7.2); se incubó por 30 min a 37°C. Los 3 lavados se repitieron como se mencionó anteriormente. Se agregaron 100 µL del suero diluido de cada uno de los ratones. Las diluciones se realizaron en PBS Tween pH 7.2 y fueron de 1:1000 hasta 1:64000. La placa se incubó por 2 hrs a 37°C. Los 3 lavados se repitieron como se describió anteriormente. Se colocaron 100 µL/pozo del conjugado anti-gamma globulina total de ratón peroxidasa diluido 1:4000. La placa se incubó a 37°C durante 2 hrs. Se repitieron las operaciones de lavado de la placa descritas anteriormente. Después se colocaron 100 µL/pozo de la solución cromógeno/sustrato para peroxidasa y se incubó por 30 min. La reacción se detuvo agregando 100 µL/pozo de ácido sulfúrico 2N. Finalmente se leyeron las absorbancias de cada pozo en el lector de ELISA (Bio-Rad) a una longitud de onda de 490 nm.

Fusión celular

Para realizar la fusión celular se utilizaron las células de mieloma X63 Ag8.653 (ATCC) y los linfocitos B obtenidos del bazo del ratón con mayor título de anticuerpos anti-PGE2, las cuales fueron fusionadas utilizando como agente fusionante al polietilenglicol al 42%. Los hibridomas fueron seleccionados por su crecimiento en el medio selectivo HAT 100X (hipoxantina, aminopterinina y timina). En la tabla 2 se

muestran los cambios realizados del medio selectivo HAT durante la selección bioquímica de los hibridomas.

Tabla 2. Calendario del cambio de medio para la selección bioquímica de los hibridomas

DÍA	TIPO DE MEDIO	ACTIVIDAD
1	DMEM-SFB 12%-HAT	Fusión
4	DMEM-SFB 12%-HAT	Cambio de medio
6	DMEM-SFB 12%-HAT	Cambio de medio
8	DMEM-SFB 12%-HAT	Cambio de medio
11	DMEM-SFB 12%-HT	Cambio de medio
13	DMEM-SFB 12%-HT	Cambio de medio
15	DMEM-SFB 12%-HT	Cambio de medio

DMEM = Medio Mínimo de Eagle Modificado por Dulbecco

SFB = Suero Fetal Bovino

Selección de los hibridomas positivos

Después de dos semanas de realizada la fusión celular, se seleccionaron los pozos con híbridos viables y confluencia mayor al 50% para poder detectar aquellos de interés por su capacidad de secretar el anticuerpo específico. Se obtuvieron los sobrenadantes de cultivo de los pozos y por medio de ELISA indirecto se determinó la presencia de anticuerpos anti-PGE2.

Clonación celular

Los hibridomas que dieron positivos en el ELISA indirecto se clonaron mediante la técnica de dilución limitante, la cual se llevó a cabo realizando diluciones seriadas de la suspensión celular positiva en la toda la fila A de una placa de 96 pozos, pasados 10 min se observaron al microscopio, se eligió el pozo que contenía aprox. 30 células, el cual se diluyo en 18 mL de medio DMEM y se distribuyó en los pozos restantes (los pozos que contenían una célula fueron marcados). Se mantuvieron en

observación todos los días hasta que se hizo visible el racimo de células, en este momento los sobrenadantes se probaron por ELISA indirecto para evidenciar la presencia de anticuerpos anti-PGE2. Se consideraron positivos aquellos cuya lectura fue mayor a 0.5 (valor de corte). Cuatro de los hibridomas positivos (5C1E11, 5C2D3, 5F3D9 y 1C7B5) se subclonaron por la misma técnica, esto con la finalidad de garantizar su monoclonalidad y los demás hibridomas fueron expandidos a botellas, congelados y conservados en nitrógeno líquido. Posteriormente se probaron los sobrenadantes de cultivo de las subclonas mediante ELISA indirecto para determinar la presencia de anticuerpos anti-PGE2.

Expansión de los hibridomas

Se eligieron las 3 subclonas con mayor absorbancia y que provinieran de diferentes placas (1C7B5B10, 5C2D3F5 y 5F3D9E12) para ser expandidos a botellas de 25 cm² y de estos obtener los anticuerpos monoclonales. Las demás subclonas productoras de anticuerpos monoclonales anti-PGE2 fueron congeladas y conservadas en nitrógeno líquido.

Determinación de la subclase de los anticuerpos anti-PGE2 mediante ELISA de captura

Se sensibilizó una placa de ELISA con 100 µL del isotipo de IgG de ratón, anti-IgG1, anti-IgG2a, anti-IgG2b, anti-IgG3 y se incubó a 4°C por 20 hrs. Esta solución se eliminó vertiendo el contenido de la placa y el exceso se secó sobre una gasa. La placa se lavó 3 veces con PBS-Tween 20 al 0.5% a pH 7.2, el intervalo de tiempo entre cada lavado fue de 5 min. Posteriormente se agregaron 200 µL/pozo de solución bloqueadora (leche al 5% diluida en PBS-Tween 20 pH 7.2); se incubó por 30 min a 37°C. Los lavados se repitieron como se mencionó anteriormente. Se adicionaron 100 µL/pozo de los sobrenadantes a probar. La placa se incubó por 2 hrs a 37°C. Los lavados se repitieron como en pasos anteriores. Se colocaron 100 µL/pozo del conjugado anti-gamma globulina total de ratón peroxidasa diluido 1:4000. La placa se incubó a 37°C durante 2 hrs. Se repitieron los lavados anteriormente mencionados. Después se colocaron 100 µL/pozo de la solución cromógeno/sustrato

para peroxidasa y se incubó por 30 min en oscuridad. La reacción se detuvo agregando 100 μ L/pozo de ácido sulfúrico 2N.

Finalmente se leyeron las absorbancias de cada pozo en el lector de ELISA (Bio-Rad) a una longitud de onda de 490 nm.

Purificación de los anticuerpos monoclonales anti-PGE2 por cromatografía de afinidad con proteína G.

Se utilizó el kit comercial Montage Antibody Purification Columns with PROSEP G Media y se siguieron las recomendaciones del fabricante para su uso (anexo 4).

Electroforesis en poliacrilamida (PAGE)

Para verificar la pureza del anticuerpo se realizó una electroforesis en poliacrilamida en condiciones reductoras y no reductoras. El gel separador se utilizó a una concentración del 10% y el gel concentrador al 5%. Se cargaron 30 μ L de las muestras (previamente preparadas) en los pozos del gel concentrador, en uno de los carriles se incluyó el marcador estándar de pesos moleculares. Se corrió a 150 Volts y se dejó desarrollar por aproximadamente 30 min hasta que el frente iónico se encontró a medio cm del final de las placas. El gel se tiñó con una solución de Comassie al 0.06% y se destiñó con la solución decolorante ácido acético al 7%.

Evaluación final de la actividad del anticuerpo monoclonal por ELISA indirecto

Se realizó un ELISA indirecto para evaluar la actividad de los anticuerpos purificados. El procedimiento es el mismo que el descrito anteriormente para evaluar el suero de los ratones y los sobrenadantes de cultivo, la diferencia es que se agregan 100 μ L de las fracciones eluídas que contienen los anticuerpos en lugar del suero y los sobrenadantes.

RESULTADOS

Respuesta de anticuerpos anti-PGE2 en los ratones Balb/c

Se evaluó la respuesta inmune humoral desarrollada por los 5 ratones Balb/c que fueron inmunizados con PGE2, mediante ELISA indirecto. Como se esperaba, no hubo reactividad en los sueros preinmunes contra la PGE2, ya que se consideró como positivo a aquellos con absorbancias mayores a 1. De los 5 ratones se eligió al número 3, ya que presentó la mayor respuesta inmune humoral contra la PGE2 presentando títulos de anticuerpos de 1:4000 (figura 1) esto después de la tercera inmunización.

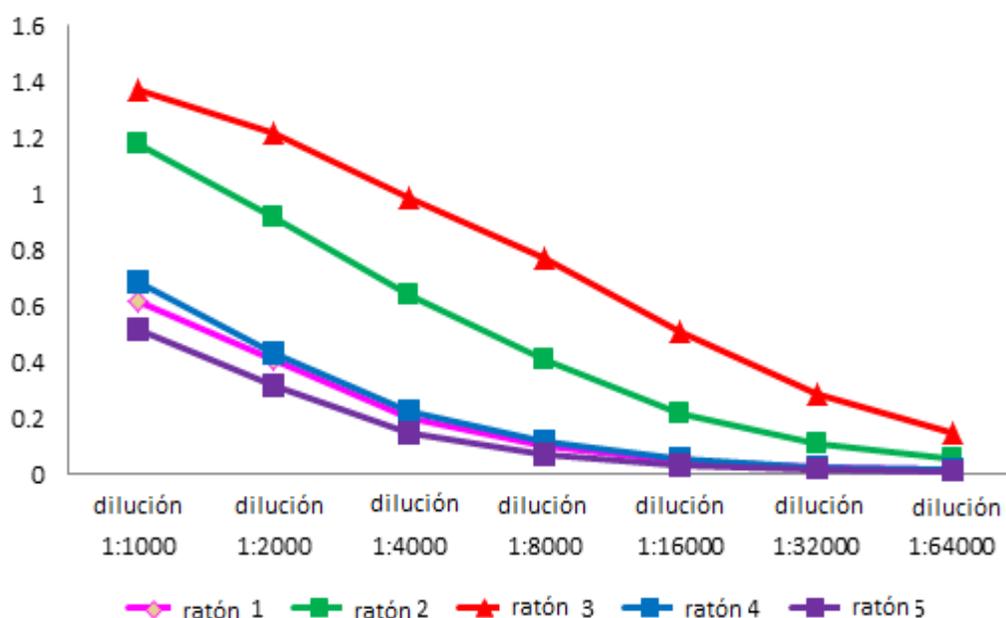


Figura 1. Respuesta inmune humoral de los 5 ratones después de 3 inmunizaciones con PGE2-BSA. Se utilizó como antígeno para la prueba de ELISA al conjugado PGE2-OVA (7µg) y se utilizaron diluciones seriadas del suero de ratón hiperinmune (1:1000 a 1:64000). D.O = Densidad Óptica.

Fusión celular

La fusión celular se llevó a cabo con las células de bazo del ratón número 3 y con las células de mieloma X63 Ag8.653. Las células obtenidas se mantuvieron 10 días en

HAT (medio selectivo de hibridomas) y posteriormente se cambiaron a HT (Hipoxantina y Timidina) por 5 días. Después de este tiempo solo proliferaron los hibridomas (figura 2). Obteniéndose un total de 148 pozos con hibridomas viables, calculándose una eficiencia de fusión del 31%.

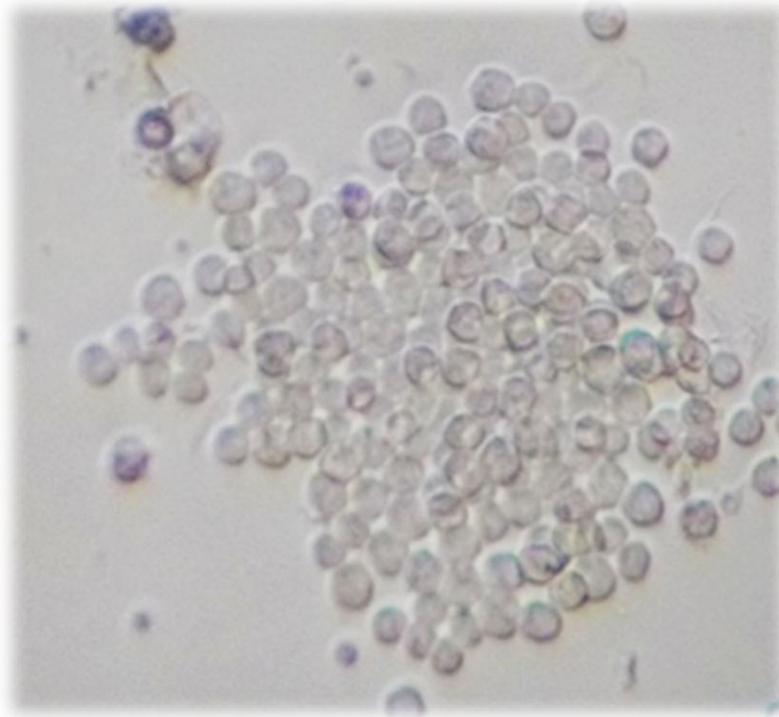


Figura 2. Colonia de hibridomas. Vistos en aumento 10X en el microscopio invertido.

Selección de los hibridomas positivos a PGE2

Para seleccionar a los hibridomas productores de anticuerpos anti-PGE2 se realizó un ELISA indirecto. De las 5 placas de cultivo se obtuvieron sobrenadantes positivos de 7 pozos, los cuales se clonaron mediante la técnica de dilución limitante. En la figura 3 se muestran las absorbancias obtenidas de los 7 sobrenadantes de cultivo mayores a 0.5 de absorbancia, considerado como valor de corte (el control negativo mostró un valor de 0.2).

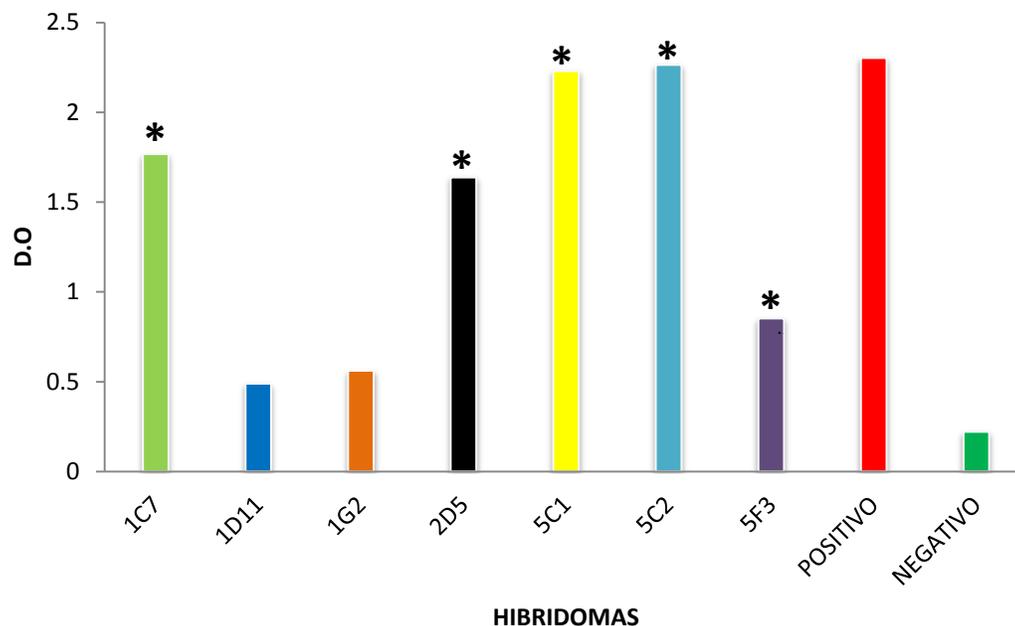


Figura 3. Hibridomas positivos evaluados mediante ELISA indirecto a una longitud de onda de 490 nm. Se utilizó como antígeno al conjugado PGE2-OVA (7 μ g) y como anticuerpo primario a los anticuerpos presentes en los sobrenadantes de cultivos directos. D.O = Densidad Óptica

* Hibridomas seleccionados para clonación celular

Clonación celular

Como resultado de las 2 clonaciones se obtuvieron 82 clonas productoras de anticuerpos monoclonales anti-PGE2 (figura 4), las cuales fueron determinadas por ELISA indirecto, los valores con absorbancias mayor a 0.5 se consideraron como positivos. En la tabla 3 se muestra los hibridomas originales y las clonas a partir de ellos.

Producción de anticuerpos monoclonales contra la prostaglandina E2 (PGE2) en ratones Balb/c

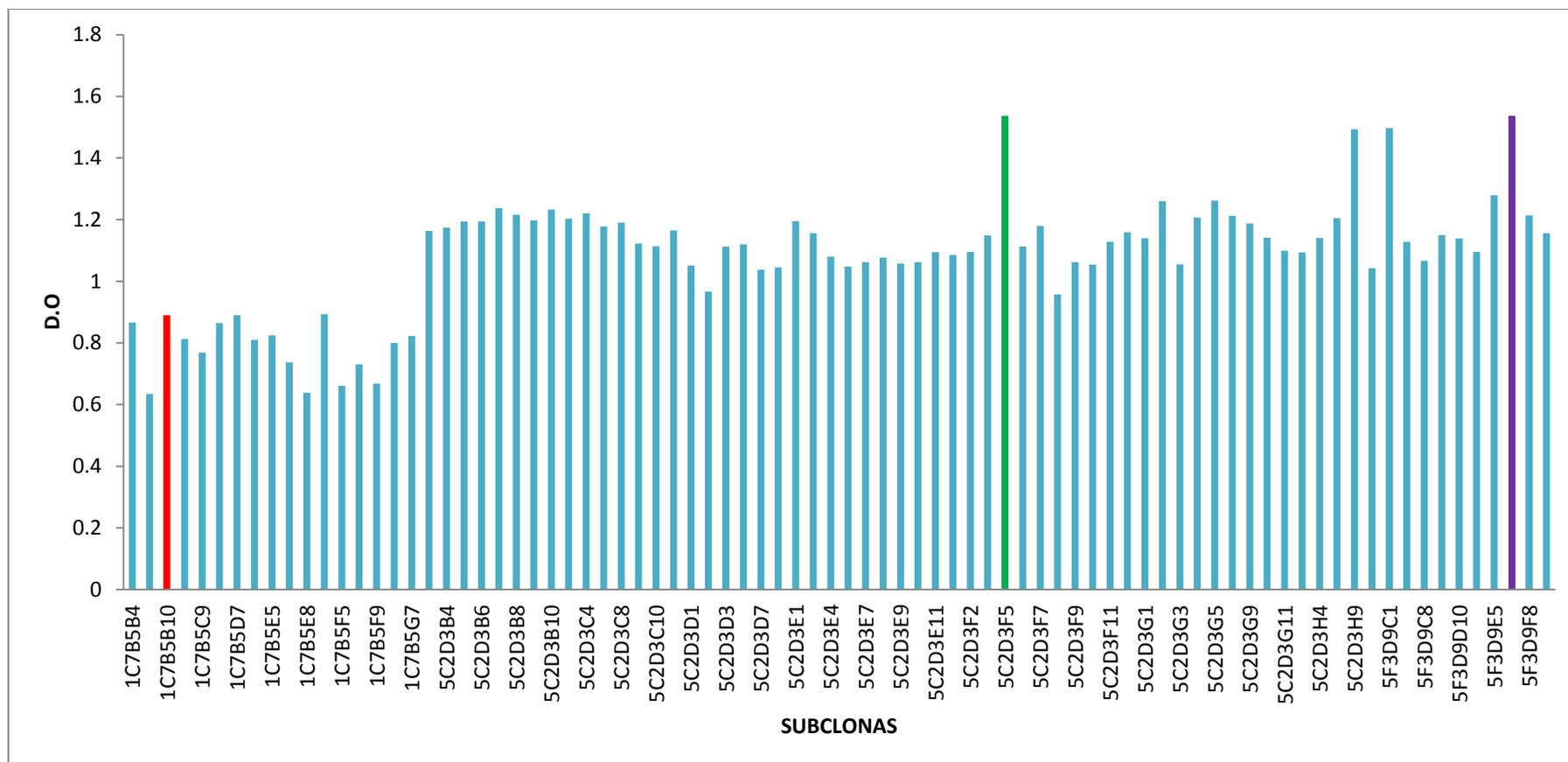


Figura 4. Subclonas productoras de anticuerpos anti-PGE2 evaluadas mediante ELISA indirecto a una longitud de onda de 490 nm. Se utilizó como antígeno al conjugado PGE2-OVA (7µg) y como anticuerpo primario a los anticuerpos presentes en los sobrenadantes de cultivo directos. D.O = Densidad Óptica. * Las barras con diferentes colores corresponden a los hibridomas seleccionados para ser expandidos

Tabla 3. Hibridomas originales y los grupos de clonas obtenidos

Híbridos originales	Clonas	Subclonas				
1C7	1C7B5	1C7B5B4,	1C7B5B6,	*1C7B5B10,	1C7B5C7,	1C7B5C9,
		1C7B5D2,	1C7B5D7,	1C7B5D10,	1C7B5E5,	1C7B5E7,
		1C7B5E8,	1C7B5F3,	1C7B5F5,	1C7B5F7,	1C7B5F9,
		1C7B5G2,	C7B5G7			
5C2	5C2D3	5C2D3B2,	5C2D3B4,	5C2D3B5,	5C2D3B6,	5C2D3B7,
		5C2D3B8,	5C2D3B9,	5C2D3B10,	5C2D3C2,	5C2D3C4,
		5C2D3C6,	5C2D3C8,	5C2D3C9,	5C2D3C10,	5C2D3C11,
		5C2D3D1,	5C2D3D2,	5C2D3D3,	5C2D3D6,	5C2D3D7,
		5C2D3D8,	5C2D3E1,	5C2D3E2,	5C2D3E4,	5C2D3E5,
		5C2D3E7,	5C2D3E8,	5C2D3E9,	5C2D3E10	5C2D3E11,
		5C2D3F1,	5C2D3F2,	5C2D3F4,	*5C2D3F5,	5C2D3F6,
		5C2D3F7,	5C2D3F8,	5C2D3F9,	5C2D3F10,	5C2D3F11,
		5C2D3F12,	5C2D3G1,	5C2D3G2,	5C2D3G3,	5C2D3G4,
		5C2D3G5,	5C2D3G6,	5C2D3G9,	5C2D3G10,	5C2D3G11,
		5C2D3H3,	5C2D3H4,	5C2D3H6,	5C2D3H9	
5F3	5F3D9	5F3D9B10,	5F3D9C1,	5F3D9C7,	5F3D9C8,	5F3D9C9,
		5F3D9D10,	5F3D9E2,	5F3D9E5,	*5F3D9E12,	5F3D9F8,
		5F3D9F9				

* Hibridomas seleccionados que fueron expandidos y obtenidos los anticuerpos monoclonales.

Determinación de subclases de los anticuerpos monoclonales contra la PGE2

Se evaluaron los sobrenadantes de cultivo de las subclonas 5F3D9E12, 5C2D3F5 Y 1C7B5B10 para determinar las subclases de los anticuerpos mediante ELISA de captura, se observó que los anticuerpos producidos por los 3 hibridomas son de tipo IgG1 (figura 5).

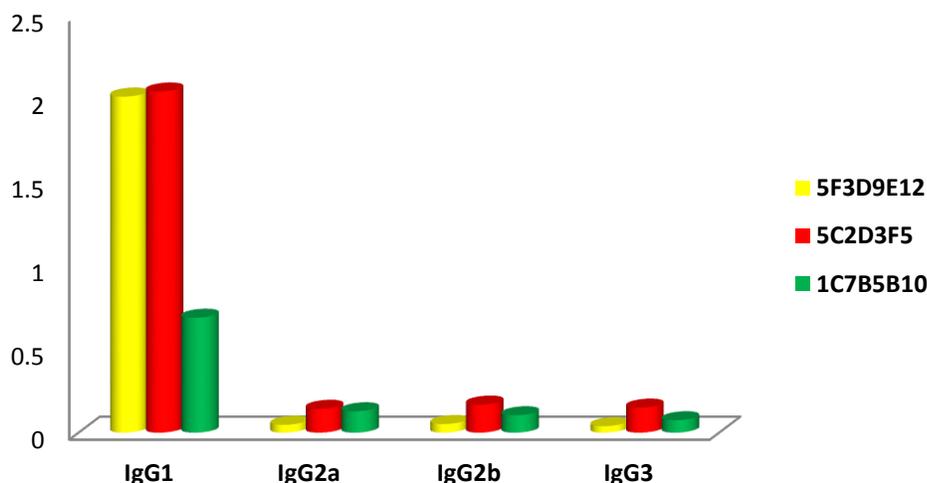


Figura 5. Subclases de los anticuerpos producidos por los hibridomas 5F3D9E12, 5C2D3F5 Y 1C7B5B10. Subclases: IgG1, IgG2a, IgG2b e IgG3 a una dilución de 1:10000.

Purificación de los anticuerpos anti-PGE2

Las fracciones colectadas como resultado del proceso de purificación fueron leídas a 280 nm obteniéndose las concentraciones mostradas en la tabla 4.

Tabla 4: concentración de los anticuerpos monoclonales.

Sobrenadante purificado	Concentración
1C7B5B10	110µg/mL
5C2D3F5	119µg/mL
5F3D9E12	300µg/mL

Electroforesis de los anticuerpos anti-PGE2

Para verificar la pureza de los anticuerpos se realizó una electroforesis en geles de poliacrilamida, en la figura 6 se pueden observar las bandas correspondientes a las cadenas pesadas (50 kDa) y las cadenas ligeras (25 kDa) de los anticuerpos purificados. La pureza de los anticuerpos no se logró al 100%, ya que se observan bandas inespecíficas que no corresponden a los anticuerpos monoclonales.

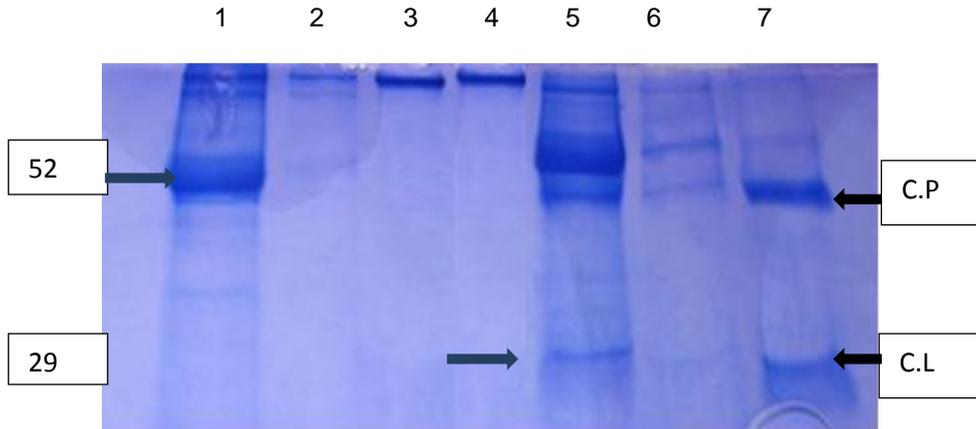


Figura 6. Corrimiento electroforético de los anticuerpos de tipo IgG1 anti-PGE2 purificados de los sobrenadantes de los hibridomas 1C7B5B10, 5C2D3F5 y 5F3D9E12, en gel de gradiente (5 al 10% de acrilamida) en condiciones reductoras y no reductoras. Carril 1: Marcador de peso molecular, carril 2, 3 y 4: anticuerpos purificados de los 3 hibridomas en condiciones no reductoras; carril 5, 6 y 7: anticuerpos purificados de los 3 hibridomas en condiciones reductoras. C. P = cadena pesada, C.L = cadena ligera.

Evaluación de la actividad de los anticuerpos anti-PGE2 después de ser purificados.

Para evaluar la reactividad de los anticuerpos anti-PGE2 después del proceso de purificación se evaluaron mediante un ELISA indirecto (figura 7). Los anticuerpos monoclonales provenientes de las subclonas 1C7B5B10, 5C2D3F5 y 5F3D9E12 si están funcionalmente activos

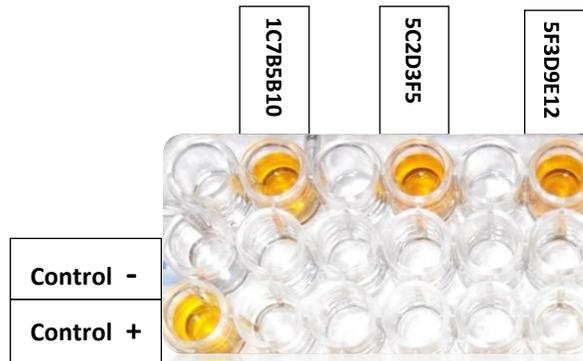


Figura 7. ELISA indirecto como prueba final del anticuerpo monoclonal. Antígeno (PGE2-OVA 7µg), anticuerpo primario: anticuerpos anti-PGE2 de los 3 hibridomas; anticuerpo secundario: α-ratón IgG en cabra dilución 1:4000.

DISCUSIÓN

En el presente trabajo se describe la producción y caracterización de anticuerpos monoclonales contra la PGE2, para su posterior uso en el desarrollo de técnicas inmunoenzimáticas (ELISA) e inmunohistoquímicas que permitan la detección y cuantificación de uno de los principales eicosanoides asociados a procesos patológicos, ya que altos niveles de esta prostaglandina ha sido relacionado con procesos inflamatorios y desarrollo del cáncer (Wang and Dubois, 2006). La dificultad para producir anticuerpos contra la PGE2 está bien documentada, sin embargo se han reportado estudios donde se han obtenido anticuerpos monoclonales contra la PGE2 utilizando la técnica de generación de hibridomas, uno de ellos tiene el propósito de neutralizar la actividad biológica de esta molécula “*in vitro*” e “*in vivo*” (Mnich *et al.*, 1995) y el otro utilizarlos en radioinmunoensayos (RIA), como un método de detección y cuantificación de PGE2 (Brune *et al.*, 1985).

Para la producción de anticuerpos monoclonales se deben tomar en cuenta varios aspectos, uno de ellos es la selección del antígeno, deben considerarse características tales como peso molecular, estructura tridimensional y solubilidad (Medina *et al.*, 2010). La PGE2 se considera un hapteno, ya que por sí sola no es capaz de inducir la formación de anticuerpos, debido a su naturaleza lipídica, tamaño pequeño y peso molecular bajo, pero tiene la característica de presentar un grupo carboxilo el cual se hizo reaccionar con el grupo amino de una proteína acarreadora (BSA) utilizando como reactivo acoplante al N'-etil-N'-[3-dimetilaminopropil] carbodiimida ácido clorhídrico (EDC-HCl) y la N-hidroxisuccinamida (NHS) para dar estabilidad y formar un enlace covalente y dar origen a una molécula compleja y por lo tanto inducir respuesta inmune humoral en los ratones Balb/c (Hermanson, 2008). Con este conjugado y la dosis adecuada (25 µg) se obtuvo muy buena respuesta inmune humoral por parte del ratón número 3 obteniendo títulos de anticuerpos de 1:4000 después de la tercera inmunización. Todos los ratones respondieron, pero no de igual manera, a diferencia del ratón 3, su respuesta fue más hacia la proteína acarreadora (BSA), esto puede deberse quizá al fondo genético de cada ratón o también a la inducción de la tolerancia inmunológica. Las razones por las cuales se utilizan los ratones Balb/c en la producción de anticuerpos monoclonales son las

siguientes: fácil manejo, son baratos de obtener y responden a menores cantidades de antígeno en comparación con otros animales de laboratorio. Además, se prefiere la utilización de ratones Balb/c, debido a que la mayoría de las líneas de mieloma de ratón existentes proceden de esta estirpe (Cowley, 1995).

Existe una gran variedad de métodos que permiten monitorear la respuesta inmune humoral de los ratones Balb/c. El método más utilizado es el ELISA indirecto, con el cual evaluamos el suero de los 5 ratones Balb/c. Para sensibilizar las placas de ELISA se utilizó un conjugado diferente al que se usó para inmunizar (PGE2-OVA 7 µg/mL) ya que solo utilizando una proteína diferente podíamos asegurar de que la detección de anticuerpos anti-PGE2 fuera correcta y evitar seleccionar aquellos producidos contra la BSA, además corría el riesgo de que si solo la PGE2 se unía a la placa de ELISA se eliminara con los lavados, y utilizando este conjugado la PGE2 quedó unida a la placa debido a que la ovoalbúmina tiene numerosos grupos funcionales útiles para enlazarse a pequeñas moléculas que de otro modo no se uniría eficientemente a las placas de poliestireno (se utilizó el mismo protocolo previamente descrito para la conjugación a la albúmina con excelentes resultados) (Hermanson, 2008).

Para realizar la fusión celular se utilizaron los linfocitos B del ratón número 3 y las células de mieloma X63 Ag8.653, estas últimas son una línea celular muy bien estudiada y ampliamente empleada. Posee las características comunes de la mayoría de las líneas celulares empleadas en la producción de anticuerpos monoclonales, esto es, crece indefinidamente, carece de la enzima HGPRT y no produce inmunoglobulinas propias. En teoría, la fusión celular puede ocurrir espontáneamente, pero esto es poco frecuente por lo que se requiere la utilización de agentes que promuevan la fusión celular. La fusión con polietilenglicol al 42% (PEG) es el método de elección en la obtención de hibridomas, permitiendo una alta reproducibilidad y eficiencia de fusión (Cowley, 1995). Tomando en cuenta los aspectos antes mencionados se obtuvo una eficiencia de fusión del 31%.

La selección de los hibridomas se efectuó añadiendo medio HAT el cual contiene componentes como la aminopterina que bloquea la síntesis de “novo” de los nucleótidos. De esta manera las células deficientes en la enzima HPGRT (necesaria

para la vía del salvamento), esto es, los híbridos mieloma-mieloma y las células de mieloma no fusionadas, mueren cuando este compuesto se encuentra en el medio de cultivo. El segundo tipo de híbridos formados, los híbridos linfocito-linfocito y los linfocitos no fusionados son células que mueren naturalmente tras 7-10 días de cultivo. El tercer tipo de híbridos, es decir el mieloma-linfocito sobrevive en el medio selectivo HAT, pues la célula de mieloma le aporta la capacidad de reproducirse de forma ilimitada, mientras el linfocito B aporta la enzima necesaria (HGPRT) para la síntesis de nucleótidos, utilizando la ruta de “salvamento”. Además, el medio de cultivo HAT incorpora hipoxantina y timidina como nucleótidos de refuerzo a la ruta de “salvamento” (Cowley, 1995). De esta manera tras mantener a las células 10 días con medio HAT se obtuvieron 148 pozos con hibridomas viables de un total de 480 pozos.

Para determinar cuántos de estos hibridomas viables eran productores de anticuerpos anti-PGE2, se evaluaron los sobrenadantes de cultivo mediante ELISA indirecto, para lo cual enfrentamos los sobrenadantes de cultivo de los hibridomas al antígeno (PGE2-OVA 7µg/mL) obteniendo 7 pozos con sobrenadantes positivos. El ELISA indirecto se realizó por duplicado para verificar los resultados y evitar errores a la hora de seleccionar a los hibridomas productores de anticuerpos anti-PGE2.

Una vez identificados los hibridomas positivos, el siguiente paso consistió en la clonación de 5 de estos hibridomas (1C7, 2D5, 5C1, 5C2 y 5F3), la clonación es uno de los pasos más importantes en la producción de los anticuerpos monoclonales, ya que garantiza la monoclonalidad del anticuerpo, al asegurar que toda la población se originó a partir de una sola célula; para esto se utilizó el método de dilución limitante, obteniéndose 19 clonas productoras de anticuerpos anti-PGE2. La clonación se repitió una vez más, para ello 4 clonas fueron seleccionadas (1C7B5, 5C1E11, 5C2D3, y 5F3D9), por que presentaron la mayor absorbancia (1.5 - 3) y además provenían de diferentes placas. De esta subclonación se seleccionaron 3 subclonas (1C7B5B10, 5C2D3F5 y 5F3D9E12) de un total de 82 subclonas productoras de anticuerpos anti-PGE2 utilizando el criterio anterior. Posteriormente se procedió a la expansión de los mismos y a la obtención masiva de Anticuerpos monoclonales anti-PGE2 para su posterior análisis y caracterización.

La producción de grandes cantidades de anticuerpos monoclonales puede realizarse recogiendo el sobrenadante de cultivo de los hibridomas, mediante la inducción de tumores ascíticos en ratones Balb/c o biorreactores (sistemas de cultivo a gran escala) (Cowley, 1995). Opte por la primera opción, es decir obtuve los anticuerpos de los sobrenadantes de cultivo de los hibridomas. La concentración de anticuerpos específicos en el sobrenadante del medio de cultivo oscila entre 10 y 100 µg/mL, además, en la mayoría de los inmunoensayos se prefiere la utilización del sobrenadante del cultivo celular, debido a que éste no se encuentra contaminado con niveles elevados de otros anticuerpos y su concentración es suficiente para la realización de la mayoría de los ensayos. Por ello, los hibridomas se expandieron en botellas de 25 cm² hasta obtener aproximadamente 150 ml de sobrenadante.

El ELISA de captura determinó que las subclases de los anticuerpos producidos por los 3 hibridomas (1C7B5B10, 5C2D3F5 y 5F3D9E12) son de tipo IgG1. Este dato nos sirvió para elegir el método de purificación de los anticuerpos presentes en los sobrenadantes de cultivo ya que de acuerdo a la literatura esta subclase tiene mayor afinidad por la proteína G que por la proteína A (Cowley, 1995., Medina *et al.*, 2010), por lo tanto la purificación de los anticuerpos se realizó por cromatografía de afinidad utilizando el kit comercial Montage Antibody Purification Columns with PROSEP G Media, se obtuvieron cantidades suficientes de AcMo para el hibridoma 1C7B5B10, una concentración de 110µg/mL, para el 5C2D3F5 119µg/mL y para el 5F3D9E12 300µg/mL, suficientes para ser utilizados en los inmunoensayos, con un grado de pureza aceptable, ya que para uso diagnóstico el nivel de pureza aceptable está entre el 70-80%. La pureza se determinó mediante electroforesis en geles de poliacrilamida, obteniéndose una banda correspondiente a la cadena pesada de aproximadamente 50 kDa y otra correspondiente a la cadena ligera de aproximadamente 25 kDa.

Durante el proceso de purificación los anticuerpos pueden perder reactividad, es por ello que se realizó el ELISA indirecto para evaluar el buen funcionamiento de los anticuerpos ya purificados y se encontró que la purificación con proteína G no afectó la actividad de los tres anticuerpos monoclonales, ya que los resultados fueron

similares a los obtenidos con los anticuerpos sin purificar y por lo tanto se encuentran funcionalmente activos después de pasar por este proceso.

En conclusión el esquema de inmunización empleado dio muy buenos resultados, ya que se obtuvo una buena respuesta inmune humoral con títulos de anticuerpos anti-PGE2 de 1:4000. La eficiencia de fusión celular fue del 31%.

Del proceso de clonación y subclonación celular se obtuvieron 82 subclonas productoras de anticuerpos anti-PGE2. Los anticuerpos producidos por los hibridomas 1C7B5B10, 5C2D3F5 y 5F3D9E12 son de tipo IgG subclase 1. Las concentraciones obtenidas de los hibridomas 1C7B5B10, 5C2D3F5 y 5F3D9E12 son 110µg/mL, 119µg/mL y 300µg/mL respectivamente.

Los AcMo producidos en este trabajo pueden tener aplicaciones importantes en el diagnóstico de lesiones precancerosas para lo cual se sugiere probar el AcMo en diferentes muestras: suero, orina y directamente en tejido en estudios posteriores.

ANEXOS

Anexo 1. Vías de inmunización:

Vía intraperitoneal

1. Sostener el animal con el tórax hacia arriba, sujetando con el dedo índice y pulgar la piel del cuello del animal cercano a la nuca y la cola entre el dedo anular y meñique.
2. Colocar al animal en forma inclinada, con la cabeza hacia abajo.
3. Limpiar la zona abdominal con alcohol e introducir la aguja calibre 27 a través del peritoneo en posición inclinada, procediendo a inyectar el antígeno.

Anexo 2. Obtención de muestras de sangre:

Venosa:

1. Sujetar la cola del ratón
2. Limpiar la cola con alcohol al 70%.
3. Hacer un pequeño corte en la punta de la cola
4. Recolectar la sangre en un tubo.

Anexo 3. Conjugación de la prostaglandina E2 a albúmina sérica bovina mediante el uso de carbodiimidas

Paso 1: activación de la prostaglandina E2

- a) Disolver 1 mg de la prostaglandina E2 en 1 mL de buffer de conjugación (PBS)
- b) Agregar 0.4mg de EDC-HCl (N'-etil-N'-[3-dimetilaminopropil] carbodiimida ácido clorhídrico) y 0.6 mg de NHS (N-hidroxisuccinimida) a la solución del inciso a.
- c) Mezclar los componentes de la reacción y dejar que reaccionen durante 15 minutos a temperatura ambiente.
- d) Agregar 1.4 µL de 2-mercaptoetanol para inactivar al EDC-HCl.

Paso 2: conjugación de la prostaglandina E2 a albúmina sérica bovina

- a) Agregar 1mg de albúmina sérica bovina a la solución del paso 1.
- b) Mezclar la solución y permitir que la reacción de conjugación proceda durante 2 horas a temperatura ambiente.
- c) Parar la reacción agregando hidroxilamina.

d) Purificar el conjugado obtenido del exceso de reactivo mediante diálisis.

Anexo 4. Kit comercial Montage® Antibody Purification Columns with PROSEP G Media

Se equilibró la columna de proteína G con 10 mL del buffer de unión y se centrifugó a 1200 rpm durante 5 min y se eliminó el líquido, esta operación se repitió una vez más. Posteriormente el sobrenadante de cultivo se incorporó a la columna y se centrifugo a 900 rpm por 10 min, se recuperó el líquido y se volvió a incorporar a la columna para centrifugar en las mismas condiciones, esto se repitió una vez más. Posteriormente la columna se lavó al incorporar 10 mL del buffer de unión y se centrifugo a 1200 rpm durante 5 min. Finalmente se incorporaron a la columna 3 mL del regulador de elución y se centrifugo a 1200 rpm por 10 min.

Anexo 5. Soluciones (Medina et al., 2010)

Solución amortiguadora de carbonatos 0.1M, pH 9.6

Pesar 3.18 g de carbonato de sodio (Na_2CO_3) más 5.86 g de bicarbonato de sodio (NaHCO_3) y disolverlos en 800 mL de agua bidestilada. Ajustar el pH a 9.6 y aforar a 1000 mL. Guardar a 4°C.

Solución salina de fosfatos (NaCl 0.15M, fosfatos 0.01M, pH 7.2 [PBS])

Medir 800 mL de agua destilada, agregar 100 mL de *PB 10X y 8.75 g de NaCl. Disolver las sales y ajustar el pH a 7.2. Aforar a 1000 mL con agua bidestilada. Guardar a 4°C.

PB 10X. 2.62 g de $\text{NaH}_2\text{HPO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (fosfato de sodio monobásico monohidratado) mas 11.5 g de Na_2HPO_4 (fosfato de sodio dibásico anhidro). Disolver en 200 mL de agua bidestilada (calentar un poco hasta disolver los cristales) y aforar a 1000 mL con agua bidestilada.

Amortiguador de lavado (PBS-tween 20, 0.05%)

A un litro de PBS pH 7.2 añadir 500 μL de Tween 20. Guardar a 4°C.

Solución de bloqueo (leche descremada al 5%)

Pesar 5 g de leche descremada en polvo, disolver en 100 mL de PBS-Tween. Guardar a -20°C.

Solución de cromógeno/sustrato (ELISA) para peroxidasa

Pesar 4 mg de orto-fenilendiamina (OPD), añadir 5 mL de ácido cítrico 0.1M y 5 mL de citrato de sodio 0.1 M y adicionar 4µL de H₂O₂ al 30%.

NOTA: La solución se prepara inmediatamente antes de usarla y se mantiene en la oscuridad antes y durante su uso.

Solución ácido sulfúrico 2N

Cálculos tomando los siguientes datos del H₂SO₄:

Peso Mol: 98 Pureza: 95% Densidad: 1.84 g/mL

Tomar 56.06 mL de ácido sulfúrico (H₂SO₄) y añadir cuidadosamente a 850 mL de agua bidestilada y aforar a 1000 mL.

Acrilamida 30%-bis-acrilamida 0.8%

Pesar 29.2 g de acrilamida* (99.9% pureza) más 0.8% g de bis-acrilamida. Disolver en agua bidestilada y aforar a 100 mL.

Filtrar con papel Whatman 1

Guardar en frasco color ámbar a 4°C.

***NOTA:** manejar con guantes y cubrebocas este reactivo porque es neurotóxico.

Amortiguador del gel separador: Tris-Base 1.5M, pH 8.8

Disolver 18.17 g de Tris-base (Hidroximetil aminometano) en 85 mL de agua bidestilada. Ajustar el pH poco a poco con HCl concentrado hasta que se alcance un pH de 8.8. Aforar a 100 mL con agua bidestilada. Guardar a 40C.

Lauril sulfato de sodio (dodecil sulfato de sodio) SDS 10%

Pesar 10 g de SDS y aforar a 100 mL con agua bidestilada. Fraccionar y mantener a 4° C hasta su uso.

Persulfato de amonio al 10%

Pesar 100 mg de persulfato de amonio y disolver en 1 mL de agua bidestilada

NOTA: Se prepara al momento de usarse

Amortiguador del gel concentrador: Tris-HCl 0.5M pH 6.8

Pesar 6.05g de Tris y disolver en 85 mL de agua bidestilada. Ajustar el pH con HCl 1N hasta que el pH sea de 6.8. Aforar a 100 mL con agua bidestilada. Guardar a 4°C.

Amortiguador para electroforesis (tris-glicina-SDS)*

Medir 200 mL de tris-glicina-SDS 5X* y aforar a 1000 mL con agua bidestilada. Guardar a 4° C.

***Tris-glicina-SDS 5X:** 15 g de tris-base mas 72g de glicina mas 5 g de SDS en 1000 mL de agua bidestilada.

Nota: Este Amortiguador se puede usar 2 o 3 veces en la cámara inferior. Después de cada uso se filtra con papel Whatman 1

Amortiguador de muestra

Se mezclan 4 mL de agua destilada, 1mL de Tris-HCl 0.5M pH 6.8, 0.8 mL de glicerol, 1.6 mL de SDS 10%, 0.4 mL de 2-β-mercaptoetanol y 0.2 mL de azul de bromofenol 0.05% (p/v)

Cuando no se requiera 2-β-mercaptoetanol se sustituye por agua destilada.

Hacer alícuotas de 1 mL y mantener en congelación.

Azul de Coomassie 0.06% (para la tinción de geles)

Pesar 300 mg de azul de Coomassie, añadir 150 mL de metanol al 30% y 50 mL de ácido acético glacial al 10%. Aforar a 500 mL con agua bidestilada. Guardar en frasco color ámbar. Mantener a temperatura ambiente.

NOTA: Esta solución debe dejarse madurar una semana y filtrarse a través de papel Whatman 1 antes de usar. Puede todas las veces que se desee.

Soluciones decolorante para geles de acrilamida 2 (ácido acético al 7%)

Medir 7mL de ácido acético glacial y agregar a 100 mL de agua bidestilada. Mantener a temperatura ambiente.

Medio DMEM

Disolver un sobre de medio DMEM (GIBCO) en 800 mL de agua tridestilada y desionizada. Agregar 2 g de bicarbonato de sodio, 2 g de HEPES, 10 mL de antibióticos-antimicótico 100X (GIBCO BRL, 15240-062) o sustituirse por : 1 mL de penicilina G sódica (ampolleta de 1,000,000 UI), 1 mL de estreptomycin (ampolleta de 1g), 10 mL de anfotericina B 100X; agregar 16 mL de L-Glutamina 200 mM*, 1 mL β -mercaptoetanol 50 mM estéril, 10mL de aminoácidos esenciales 100X (GIBCO,), 0.2g de piruvato de sodio o: 18.2 mL de piruvato de sodio 100 mM; 1 mL de tilosina 1000X . Ajustar el pH a 6.8 (con NaOH 1N o con HCl 1N). Aforar a 1000 ml con agua tridestilada y desionizada. Esterilizar por filtración en membrana de 0.22 μ m y almacenar en frascos estériles de 100 mL y guardar a 4°C.

***Solución de L-glutamina 200 mM**

Pesar 14.615 g de L-glutamina, calidad cultivo celular (Gibco BRL No cat.21051-016) Disolverlos en 500 mL de agua bidestilada. Esterilizar por filtración en membrana de 0.22 μ m. Hacer fracciones de 20 mL y almacenarlas a -20° C hasta su uso.

Suero Fetal Bovino (SFB) descomplementado

El suero de ternera fetal grado cultivo celular (Hyclone No. cat. SH30070-03) se mantiene durante 30 min a 56°C en baño María para descomplementarlo. Fraccionar en tubos estériles de 50 mL y almacenarlos a -20°C.

Solución de criopreservación

Mezclar 9 partes de suero fetal descomplementado con 1 parte de dimetil-sulfóxido (DMSO, calidad cultivo celular) estéril, v/v. Conservar a 4° C

Solución de polietilenglicol (PEG 1300-1600 (Sigma No. Cat. P7777)).

Derretir el reactivo en baño María a 50-60 °C. Diluir al 42-43% con medio de cultivo Eagle modificado por Dulbeco (DMEM, preparar como lo indica el fabricante y esterilizar por filtración) sin suero a 45 °C. Ajustar el pH a 7.5-8, hasta que el reactivo, después de 10 min adquiera una coloración rojizo-violeta. Fraccionar en volúmenes de 0.5 mL y almacenar a 4°C (hasta 6 meses)

Medio selectivo con hipoxantina, aminopterina y timina (HAT)

Agregar 2 mL de HAT 50X (Sigma N-0262) a 100 mL de DMEM complementado con SFB. Conservar a 4°C

Medio selectivo con hipoxantina y timina (HT)

Agregar 2 mL de HT 50X (Sigma No. Cat. H-0137) a 100 mL de DMEM complementado con SFB. Conservar a 4°C

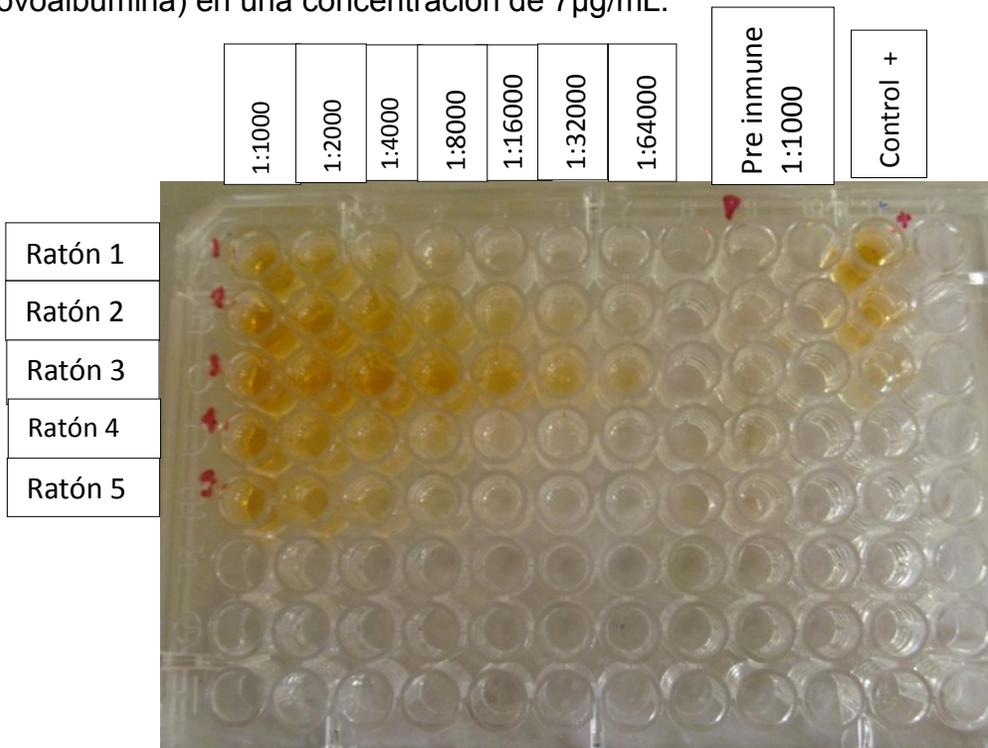
Glicina 0.1 M pH. 2.5.

Pesar 9.2 g del glicina (C₃H₈O₃) y disolver en 800 mL de agua bidestilada. Ajustar el pH a 2.5 y aforar a 1000 mL

NOTA: Esta solución se preserva a 4°C

Anexo 5: placas de ELISA

Placa de ELISA indirecto en donde se evaluaron los sueros partiendo de una dilución 1:1000 a 1:64000. Utilizando como antígeno al conjugado (PGE2 unida a ovoalbúmina) en una concentración de 7µg/mL.



Placa de ELISA donde se evaluaron los sobrenadantes de los hibridomas viables y en donde se determinó cuáles eran productores de anticuerpos anti-PGE2.



Placa de ELISA donde se evaluaron los sobrenadantes de las clonas y se determinó cuáles eran productoras de anticuerpos anti-PGE2



Placa de ELISA donde se evaluaron los sobrenadantes de las subclonas y se determinó cuáles eran productoras de anticuerpos anti-PGE2



REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ÁLVAREZ-VALLINA, L. 2004. *Anticuerpos monoclonales: realidades y perspectivas*, Editorial Complutense.
- BIGBEE W, H. R. 2003. Tumor markers and immunodiagnosis. *Cancer Medicine*.
- BIRO, A., CERVENAK, L., BALOGH, A., LORINCZ, A., URAY, K., HORVATH, A., ROMICS, L., MATKO, J., FUST, G. & LASZLO, G. 2007. Novel anti-cholesterol monoclonal immunoglobulin G antibodies as probes and potential modulators of membrane raft-dependent immune functions. *J Lipid Res*, 48, 19-29.
- BRANDT, M., PH.D 2004. Prostaglandin biosynthesis and functions.
- BRUNE, K., REINKE, M., LANZ, R. & PESKAR, B. A. 1985. Monoclonal antibodies against E- and F-type prostaglandins. High specificity and sensitivity in conventional radioimmunoassays. *FEBS Lett*, 186, 46-50.
- COWLEY, J. V. G. 1995. *Anticuerpos monoclonales*, Elfos Scientiae.
- CHIARELLA, P. & FAZIO, V. M. 2008. Mouse monoclonal antibodies in biological research: strategies for high-throughput production. *Biotechnol Lett*, 30, 1303-10.
- CHIZZOLINI, C. & BREMBILLA, N. C. 2009. Prostaglandin E2: igniting the fire. *Immunol Cell Biol*, 87, 510-1.
- CHRISTIE, W. W. 2009. PROSTANOIDS - PROSTAGLANDINS, PROSTACYCLINS and THROMBOXANES. *Scottish Crop Research Institute (and Mylnfield Lipid Analysis), Invergowrie, Dundee (DD2 5DA), Scotland*.
- FINETTI, F., SOLITO, R., MORBIDELLI, L., GIACHETTI, A., ZICHE, M. & DONNINI, S. 2008. Prostaglandin E2 regulates angiogenesis via activation of fibroblast growth factor receptor-1. *J Biol Chem*, 283, 2139-46.
- HERMANSON, G. T. 2008. *Bioconjugate techniques*, Academic Press.
- JAIN, S., CHAKRABORTY, G., RAJA, R., KALE, S. & KUNDU, G. C. 2008. Prostaglandin E2 regulates tumor angiogenesis in prostate cancer. *Cancer Res*, 68, 7750-9.
- KUO, K. T., WANG, H. W., CHOU, T. Y., HSU, W. H., HSU, H. S., LIN, C. H. & WANG, L. S. 2009. Prognostic role of PGE2 receptor EP2 in esophageal squamous cell carcinoma. *Ann Surg Oncol*, 16, 352-60.
- MACHADO, N., TÉLLEZ, G. & CASTAÑO, J. 2006. Anticuerpos monoclonales: desarrollo físico y perspectivas terapéuticas. *Infectio*, 10, 186-197.
- MEDINA, E. & GAVILONDO, J. 2000. *Manual de técnicas modernas en inmunología: teoría y práctica*, Secretaria de Salud.
- MNICH, S. J., VEENHUIZEN, A. W., MONAHAN, J. B., SHEEHAN, K. C., LYNCH, K. R., ISAKSON, P. C. & PORTANOVA, J. P. 1995. Characterization of a monoclonal antibody that neutralizes the activity of prostaglandin E2. *J Immunol*, 155, 4437-44.
- O'BRIEN, N., JONES, S. T., WILLIAMS, D. G., CUNNINGHAM, H. B., MORENO, K., VISENTIN, B., GENTILE, A., VEKICH, J., SHESTOWSKY, W., HIRAIWA, M., MATTEO, R., CAVALLI, A., GROTHJAHN, D., GRANT, M., HANSEN, G., CAMPBELL, M. A. & SABBADINI, R. 2009. Production and characterization of monoclonal anti-sphingosine-1-phosphate antibodies. *J Lipid Res*, 50, 2245-57.

- PAN, M. R., HOU, M. F., CHANG, H. C. & HUNG, W. C. 2008. Cyclooxygenase-2 up-regulates CCR7 via EP2/EP4 receptor signaling pathways to enhance lymphatic invasion of breast cancer cells. *J Biol Chem*, 283, 11155-63.
- PATA, S., TAYAPIWATANA, C. & KASINRERK, W. 2009. Three different immunogen preparation strategies for production of CD4 monoclonal antibodies. *Hybridoma (Larchmt)*, 28, 159-65.
- PETERSON, N. C. 2005. Advances in monoclonal antibody technology: genetic engineering of mice, cells, and immunoglobulins. *ILAR J*, 46, 314-9.
- REID, G., WIELINGA, P., ZELCER, N., VAN DER HEIJDEN, I., KUIL, A., DE HAAS, M., WIJNHOLDS, J. & BORST, P. 2003. The human multidrug resistance protein MRP4 functions as a prostaglandin efflux transporter and is inhibited by nonsteroidal antiinflammatory drugs. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100, 9244-9.
- SUBBARAMAIAH, K. & DANNENBERG, A. J. 2007. Cyclooxygenase-2 transcription is regulated by human papillomavirus 16 E6 and E7 oncoproteins: evidence of a corepressor/coactivator exchange. *Cancer Res*, 67, 3976-85.
- SUGIMOTO, Y. & NARUMIYA, S. 2007. Prostaglandin E receptors. *J Biol Chem*, 282, 11613-7.
- TANAKA, T., ITO, S., HIROSHIMA, O., HAYASHI, H. & HAYAISHI, O. 1985. Rat monoclonal antibody specific for prostaglandin E structure. *Biochim Biophys Acta*, 836, 125-33.
- TILLEY, S., COFFMAN, T. & KOLLER, B. 2001. Mixed messages: modulation of inflammation and immune responses by prostaglandins and thromboxanes. *Journal of Clinical Investigation*, 108, 15-23.