

**PURIFICACIÓN Y MARCAJE DE ANTICUERPOS
MONOCLONALES**

**Paola Andrea Torres
Estudiante**

**Trabajo de grado presentado como requisito parcial para
Optar al título de Bacterióloga**

**Pontificia Universidad Javeriana
Facultad de Ciencias
Noviembre de 2001**

AGRADECIMIENTOS

La autora expresa sus agradecimientos a:

DRA ADRIANA CUELLAR AVILA, Bacterióloga y docente de la Pontificia Universidad Javeriana. Por brindarme la oportunidad de trabajar en su grupo de investigación, por su apoyo y comprensión durante todo este tiempo, por tener confianza en mis capacidades. Gracias Adriana.

WILSON MEJIA, Microbiologo, y Bioquimico, actualmente trabaja en investigación en el laboratorio de Hormonas de la Universidad Nacional. Gracias por colaborarme desinteresadamente dedicando parte de su tiempo a enseñarme, por compartir sus conocimientos para engrandecer este trabajo y por demostrarme que trabajando duro se pueden lograr grandes cosas. Wilson mil y mil Gracias.

DR JHON MARIO GONZALEZ, Medico, docente y director de la unidad de citometría de flujo de la Pontificia Universidad Javeriana. Por permitirme trabajar en la Unidad de Citometría de Flujo de la Pontificia Universidad Javeriana y prestarme su colaboración y apoyo científico en la realización de este trabajo.

RESUMEN

El objetivo de este trabajo fue purificar y marcar anticuerpos monoclonales en el laboratorio, con el fin de adquirir la experiencia en esta área, para en un futuro producirlos y poderlos emplear en la unidad de citometría de flujo de la Pontificia Universidad Javeriana.

Para esto se cultivaron hibridomas productores de anticuerpos monoespecificos y se marcaron con un fluorocromo derivado de la Fluoresceína, denominado Fluos.

Se logro purificar un anticuerpo monoclonal anti IgM y emplearlo exitosamente en ensayos de citometría de flujo. Se pudo determinar que el monoclonal esta dirigido contra un marcador que se expresa en el 44% de la población linfoide total, que es común para la población de linfocitos T y B, y que su expresión en las células CD3+ es baja.

Con este trabajo, se abren las posibilidades de poder producir anticuerpos monoclonales de la especificidad requerida en un futuro próximo. Planteando perspectivas de desarrollo en el campo investigativo y docente.

TABLA DE CONTENIDO

1. INTRODUCCIÓN	1
2. MARCO TEORICO	3
2.1 ANTICUERPOS MONOCLONALES	3
2.2 CITOMETRIA DE FLUJO	8
2.2.1 FLUOROCROMOS	11
2.2.2 APLICACIONES DE LA CITOMETRÍA DE FLUJO	14
2.3 MARCADORES LINFOIDES	15
3.OBJETIVOS	19
4. JUSTIFICACION	20
5. METODOLOGÍA	21
5.1 AMPLIFICACION DE LOS HIBRIDOMAS	21
5.2 PURIFICACION DE LOS ANTICUERPOS	21
5.2.1 PRECIPITACION	21
5.2.2 CUANTIFICACION DE LA PROTEINA	22
5.2.3 CROMATOGRAFIA DE FILTRACIÓN EN GEL	22
5.3 MARCAJE	22
5.4 ENSAYOS DE CITOMETRÍA DE LUJO EMPLEANO EL ANTICUERPO MARCADO	23
5.5 DIAGRAMA DE METODOLOGÍA PROPUESTA	24
6. RESULTADOS	25
6.1 AMPLIFICACION DE HIBRIDOMAS	25

6.1. 1. PRESENCIA DEL ANTICUERPO EN EL SOBRENADANTE DEL CULTIVO.	26
6.2. PURIFICACIÓN DEL ANTICUERPO	27
6.2.1 PRESENCIA DEL ANTICUERPO EN LA SOLUCIÓN DIALIZADA	27
6.2.2 CUANTIFICACION DE PROTEINA EN EL PRECIPITADO	28
6.2.3 CROMATOGRAFIA	28
6.2.4 CUANTIFICACION DE PROTEINA DE LAS FRACCIONES OBTENIDAS EN LA CROMATOGRAFIA	30
6.3 MARCAJE	30
6.3.1 RELACION FLUOS / PROTEINA	32
6.4 ESTANDARIZACION DEL ANTICUERPO MARCADO CON FLUOS	33
6.5 EXPRESION DEL MARCADOR EN LA POBLACION LINFOIDE CD3+ Y CD3-	34
6.5.1 EXPRESION DEL MARCADOR EN LA POBLACION CD3+.	35
6.5.2 EXPRESION DEL MARCADOR EN LA POBLACION CD3-	37
6.6 ENSAYOS DE CITOMETRÍA DE FLUJO, PARA DEFINIR EN QUE POBLACION MARCA EL ANTICUERPO PURIFICADO.	38
7. DISCUSIÓN	44
8. BIBLIOGRAFÍA	48

LISTA DE FIGURAS

	Pag
Figura 1. Amplificación de hibridomas	25
Figura 2. Presencia del anticuerpo en el sobrenadante	26
Figura 3. Presencia del anticuerpo en la solución dializada	27
Figura 4. Cromatograma de purificación de IgM	29
Figura 5. Cromatograma del marcaje de IgM	31
Figura 6. Cromatograma de FLUOS	31
Figura 7. Estandarización del anticuerpo marcado con FLUOS	34
Figura 8. Expresión del marcador en la población CD3+	36
Figura 9. Expresión del marcador en la población CD3-	37
Figura 10. Anti CD8 y FLUOS	38
Figura 11. Anti CD3 y FLUOS	39
Figura 12. Anti CD4 y FLUOS	39
Figura 13. Anti CD19 y FLUOS	40
Figura 14. Anti CD22 y FLUOS	40
Figura 15. Anti CD25 y FLUOS	41
Figura 16. Anti CD56 y FLUOS	41
Figura 17. Anti CD5 y FLUOS	42
Figura 18. Anti CD69 y FLUOS	42
Figura 19. Anti CD38 y FLUOS	43

LISTA DE ABREVIATURAS

Acs: Anticuerpos

CD: Cluster of differentiation

CMH: Complejo Mayor de Histocompatibilidad

CPA: Célula presentadora de antígeno

DNA: Acido Dexosirribonucleico

FITC: Isotiocianato de Fluoresceína

FLUOS: Hidroxisuccinamida - N - Carboxifluoresceína

FSC: Forward Scatter

HAT: Hipoxantina Adenina Timina

HGPRT: Hipoxantina Guanina Fosforribosil Transferasa

LB : Linfocito B

LT : Linfocito T

NK: Natural Killer

PE: Ficoeritrina

PEG: Polietilen glicol

SSC: Side Scatter

TCR: Receptor de células T

TK: Timidina quinasa

1. INTRODUCCIÓN

La producción de anticuerpos monoclonales, ha abierto a grandes pasos las posibilidades de investigación en distintos campos, permitiendo el estudio y la detección de diferentes moléculas y colaborando con el desarrollo de tecnologías nuevas y eficaces en el diagnóstico realizado en el laboratorio. En 1975 Kohler y Milstein fusionaron por primera vez un linfocito normal con una célula mielómica (Hibridoma), logrando así la producción continua de anticuerpos monoespecíficos. (Milstein y Kohler 1975)

Todo el proceso comienza con la inmunización de un ratón o rata con el antígeno seleccionado. Después se extraen los linfocitos esplénicos y se induce su fusión con la célula de mieloma. El hibridoma se cultiva en un medio selectivo denominado HAT (Hipoxantina Adenina Timina), en el cual solo crecerán las células fusionadas. Consecuentemente se escoge el hibridoma que produzca los anticuerpos de la especificidad requerida, para ser clonado y empleado durante todo el procedimiento de obtención de anticuerpos monoclonales. (Milstein et al et al 1991)

Estos anticuerpos pueden ser utilizados con diferentes propósitos investigativos y diagnósticos. Uno de los usos mas frecuentes, es el marcaje de células para la citometría de flujo. Técnica que permite medir simultáneamente múltiples características de una célula. Empleando anticuerpos monoclonales, marcados con sustancias fluorescentes (fluorocromos) se puede hacer: tipificación de leucemias, determinación de subpoblaciones de linfocitos, monitoreo de tratamientos y en general fenotipificación con fines investigativos. (Drouet et al 1993).

Con la realización de este trabajo, se pretende adquirir la experiencia en el laboratorio para purificar y marcar anticuerpos monoclonales. Para llevar a cabo esto se cultivaron los hibridomas en un medio enriquecido, se purificaron los anticuerpos mediante la técnica de cromatografía por filtración en gel y se marcaron, con un derivado del Isotiocianato de Fluoresceína denominado FLUOS. Se probara la eficiencia de los

anticuerpos obtenidos, exponiéndolos a células provenientes de individuos sanos. Esperando identificar la población de células que expresan el marcador. Debido a la importancia que tiene en la citometría el uso de anticuerpos monoclonales, este trabajo permitirá adquirir experiencia en esta área, para en un futuro producir anticuerpos que puedan utilizarse en próximos proyectos investigativos, en la unidad de Citometría de Flujo de la Pontificia Universidad Javeriana.

2. MARCO TEORICO

2.1 ANTICUERPOS MONOCLONALES

El desarrollo en la inmunología de la producción de anticuerpos monoclonales, ha abierto a grandes pasos las posibilidades de investigación en distintos campos, permitiendo así el estudio y la detección de diferentes moléculas y colaborando con el avance de tecnologías nuevas y eficaces para el diagnóstico realizado en el laboratorio.(Milstein et al 1991).

Generalmente, cuando una sustancia extraña penetra o se inyecta en el cuerpo de un vertebrado, uno de los aspectos de la consecuente respuesta inmune, es la secreción de anticuerpos, por parte de las células plasmáticas provenientes de la diferenciación de los LB. En el bazo de cualquier vertebrado, hay hasta un millón de estirpes celulares distintas de linfocitos B, aunque todas ellas derivan de un mismo tronco celular, cada estirpe adquiere la capacidad de fabricar independientemente, un anticuerpo que reconoce un determinante antigénico distinto. Consecuentemente, cuando se inyecta un inmunizante a un animal o simplemente cuando el organismo se defiende de algún proceso infeccioso, se producen anticuerpos contra los diferentes determinantes antigénicos de una misma molécula y anticuerpos que se acoplan mas o menos bien a un mismo determinante. En general se obtiene una mezcla de anticuerpos, de la cual difícilmente podrán separarse unos de otros. Los antisueros convencionales son el resultado de esta mezcla de anticuerpos, por lo cual se denominan: Policlonales. (Milstein 1980)

Si se lograra separar una célula que fabrique un único anticuerpo específico, para que proliferara en cultivo, la progenie de esta célula o clon, sería una fuente de grandes cantidades de anticuerpos idénticos, contra un único determinante antigénico, se trataría

de un anticuerpo Monoclonal. Existen un tipo de tumores malignos del sistema inmune, llamados mielomas. Estas células poseen una gran capacidad de proliferación y producen grandes cantidades de inmunoglobulinas anormales, denominadas proteínas mielómicas, las cuales provienen de una única progenie. Estos anticuerpos son por lo tanto, monoclonales, pero no hay forma de saber contra que antígeno se dirigen, ni como inducir mielomas que produzcan anticuerpos de la especificidad requerida. (Berzofky et al 1989)

En 1975 Kohler y Milstein estudiaban la manera en que las mutaciones modificaban la especificidad de los anticuerpos, con este objetivo, fusionaron inicialmente dos células de mieloma, una de ratón y otra de rata, al analizar la célula híbrida se dieron cuenta que también segregaban a su vez moléculas híbridas, básicamente que estas moléculas eran el resultado de la combinación de las cadenas sintetizadas por ambos progenitores, pero sin que se mezclaran las regiones constantes C y variable V, de cada uno, a partir de este experimento decidieron fusionar un linfocito normal con una célula mielómica. En el primer ensayo que realizaron, utilizaron eritrocitos de oveja como inmunógenos, ya que el anticuerpo contra estas células era fácilmente detectable, después le extrajeron el bazo al ratón inmunizado e indujeron su fusión con células mielómicas provenientes de ratón, la células híbridas se identificaron haciendo uso de un medio selectivo, en donde observaron que algunas de esta segregaban anticuerpos contra los eritrocitos de oveja. De esta manera por primera vez, se lograron desarrollar cultivos continuos de células híbridas, que segregaban un anticuerpo monoclonal de especificidad predefinida. (Kohler y Milstein 1975).

Este fue el comienzo del desarrollo de una técnica de producción de anticuerpos monoespecíficos, que a diferencia de los sueros convencionales es el resultado de un solo clon de LB, que produce anticuerpos contra un solo determinante antigénico, por lo cual son denominados anticuerpos monoclonales. (Pirruccello et al 1990).

Todo el proceso comienza con la inmunización de la fuente de linfocitos B, la cual puede ser un ratón o rata. El objetivo es lograr títulos altos de anticuerpos circulantes, proceso que depende de la naturaleza del antígeno, del animal usado y del protocolo de

inmunización que se emplee. Como inmunógenos se utilizan, receptores purificados, proteínas de membrana, antígenos proteicos producidos por expresión en procariontes o eucariotas y péptidos sintéticos. Generalmente, en este proceso se utilizan adyuvantes, con el propósito de activar la respuesta inmune. Tradicionalmente el adyuvante completo de Freund se utiliza en la primera inmunización, el cual es una emulsión de agua y aceite, en este último se encuentra suspendida la bacteria *Mycobacterium bovis* muerta, también se utiliza el adyuvante incompleto, el cual carece de la suspensión bacteriana y compuestos de aluminio. (Audibert et al 1993).

Posteriormente, mediante inyecciones intraperitoneales en intervalos de dos semanas, se pretende generar una respuesta inmune de alta afinidad. Después se toman muestras de sangre, para determinar si el animal está respondiendo con los anticuerpos de la especificidad requerida y se realiza una inmunización final la cual es usualmente intravenosa, es importante remover el bazo dos o cinco días después de la última inmunización. (Pirruccello et al 1990).

Dentro de la producción de anticuerpos monoclonales, uno de los pasos más cruciales, es la selección de una célula mielóica de fusión adecuada, para el LB, ya que esta brindará la información genética necesaria para continuar el proceso de división celular en cultivo. Las líneas celulares mielóicas provienen de la inducción mediante aceite mineral, de tumores de células plasmáticas, en el ratón. (Potter et al 1962).

El éxito de la técnica depende del desarrollo en cultivo de estas células mielóicas, que crecen en un medio normal pero no en uno selectivo denominado HAT. El fundamento del procedimiento, es crear líneas mielóicas, defectuosas en las enzimas HGPRT (Hipoxantina Guanina Fosforribosil Transferasa) y en la TK (Timidina Quinasa) las cuales son necesarias para la síntesis de DNA por la vía salvaje. Las células normales sintetizan purinas y timidilato a partir de fosforribosil pirofosfato y uridilato respectivamente, este camino es denominado *de novo*, si se le añade al medio un antibiótico denominado aminopterina, se bloquea la síntesis de DNA por medio de esta vía. Las células tratadas con aminopterina sintetizan DNA a partir de otro camino denominado, salvaje, en el cual las purinas se sintetizan a partir de un suplemento

exógeno como la Hipoxantina, usando la enzima HGRPT y el Timilidato, mediante la enzima TK, de esta manera las células tratadas con aminopterina crecen normalmente en medio de cultivo, si este es suplementado con Hipoxantina y Timidina (medio HAT). (Campbell 1991)

Como las líneas mieloides cultivadas son defectuosas en las enzimas HGPRT y TK, no pueden sintetizar el DNA por medio de la vía salvaje, por lo cual no se reproducirán en el medio HAT, basándose en esto se induce la fusión de estas células mieloides con células normales las cuales serán; LB obtenidos de la fuente inmunizada.

De esta manera el linfocito proporciona las enzimas necesarias para que el hibridoma se reproduzca y el mieloma permite que el LB crezca indefinidamente y produzca grandes cantidades de anticuerpos de una sola especificidad. (Abbas *et al* 1994)

La fusión de estas células, se induce mediante el empleo de polímeros de alto peso molecular como el Polietilenglicol (PEG) el cual ata las membranas de las células, formando agregados. La bicapa lipídica interactúa con la célula adyacente, permitiendo que la fusión ocurra mediante la interacción lípido-lípido.

Una vez las células fusionadas crecen en el medio HAT, se deben hacer pruebas para determinar que hibridomas producen los anticuerpos de la especificidad requerida. Estas pruebas deben ser específicas para el anticuerpo de interés, deben ser sensibles y fácilmente reproducibles. Después de 10 a 14 días de fusión, los sobrenadantes de los hibridomas se prueban para determinar la actividad del anticuerpo, usando un inmunoensayo de fase sólida o un ELISA se puede determinar la presencia del anticuerpo. Cuando se ha logrado seleccionar los hibridomas que producen el anticuerpo contra el epítipo requerido, estos se subclonan por dilución en límite, con el propósito de seleccionar un solo hibridoma (clon) productor de los anticuerpos. Los clones se someten de nuevo, a ensayos para determinar la actividad de anticuerpo y los que secreten los títulos más altos de Acs con la especificidad requerida son seleccionados. (Campbell 1991)

Estos se pueden cultivarse para que produzcan grandes cantidades de anticuerpo, posteriormente se almacenan congelándolos. Una de las mayores ventajas de producir hibridomas es que se obtiene una fuente ilimitada de anticuerpos monoclonales, los cuales se pueden utilizar como reactivos en el análisis de marcadores de superficie celular. Los clones de los hibridomas se pueden cultivar o inyectarse en animales para inducir mielomas que segreguen el anticuerpo deseado. (Pirrucello.1990)

Dependiendo del uso final de los anticuerpos obtenidos, es necesario o no purificarlos. Si se pretende usarlos en citometría de flujo, es importante obtener concentraciones óptimas de anticuerpos puros, para que puedan ser marcados, sin interferencias. Para su purificación se emplean técnicas clásicas de purificación de inmunoglobulinas como precipitación con sales, seguido de cromatografía de intercambio iónico o filtración en gel. En el caso de la inmunoglobulina G se utilizan técnicas como la cromatografía de afinidad. La aplicabilidad de los anticuerpos monoclonales es diversa, pero quizás uno de los usos más frecuentes es el de la detección de moléculas de membrana, como en el caso de los marcadores celulares CD de los leucocitos, los cuales permiten subdividirlos en diferentes poblaciones según la expresión de estas proteínas. (Stites et al 1990)

Los anticuerpos monoclonales, tienen amplio uso en citometría de flujo, ya que presentan ventajas como: 1) Un reactivo extremadamente puro, que puede ser producido por recursos antigénicos diferentes. 2) Homogeneidad respecto a afinidad y especificidad. 3) La especificidad del anticuerpo está dirigida contra un solo epítipo. 4) Se pueden producir grandes cantidades de un reactivo bien definido y uniforme lo cual permite estandarización y control de calidad. En general los anticuerpos monoclonales se emplean con fines diagnósticos en el laboratorio, utilizándolos en diferentes reacciones de tipo serológico, o con propósitos terapéuticos, como en el caso de la terapia antitumoral, o en el monitoreo de tratamientos. El desarrollo de la técnica que dio paso a la producción de estos anticuerpos monoespecíficos, ha permitido grandes avances en las diferentes áreas de investigación del campo científico. (Campbell 1991)

2.2 CITOMETRIA DE FLUJO

La citometría de flujo, es una técnica que permite analizar individualmente, células en suspensión dentro de un sistema de flujo laminar, sobre el cual incide un haz de luz proporcionado por un láser.

Este análisis es multiparamétrico y dependiendo de la incidencia del láser, se puede obtener información sobre: tamaño relativo de la célula, características internas, como granularidad o complejidad interna y si tiene un fluorocromo unido, se puede determinar la intensidad de fluorescencia.

La historia de la citometría se remonta al los contadores de células. En 1956 W Coulter desarrollo el sistema de recuento celular automático basado en gradientes de impedancia magnética, en 1965 se introduce el uso del espectrofotómetro para cuantificar constituyentes específicos celulares, ya en 1968 Dietrich y Gohde desarrollan el proceso de detección basados en la fluorescencia y en 1960 Van Dilla aplica el LASER(Light amplification by stimulated emission of radiation) como fuente luminosa en citometría de flujo, a partir de este momento se establecen las bases de la citometría moderna. De forma genérica un citómetro se compone, de un sistema hidrodinámico, un sistema óptico y un sistema informático. (Melamed 1990)

El sistema hidrodinámico consta de: un compresor de aire, filtros tanto para el aire que va a realizar la presión como para el buffer en el cual va la muestra, reguladores de presión y un vial de desechos, al cual llegan todas las muestras después de ser analizadas. Mediante un sistema de inyección o aspiración, el compresor introduce la suspensión de células o partículas en el citómetro, alineándolas en su centro para que de una en una sean atravesadas por el rayo láser. (Shapiro 1995)

El sistema óptico se compone de la fuente de luz, y los detectores de dispersión y fluorescencia. Como fuente de luz se utiliza el rayo láser el cual presenta dos ventajas fundamentales sobre otras fuentes: 1) La luz que proporciona es uniforme, es decir toda

la radiación fotónica emitida se encuentra en fase. 2) La luz es monocromática, una sola longitud de onda representa un único color. (Viguer 1995).

Dentro del sistema óptico encontramos elementos como: las lentes colectoras en ángulo recto y de enfoque del láser sobre el haz de flujo, los filtros ópticos de selección, los cuales dejan pasar la luz solo de cierta longitud de onda, los espejos dicróicos, encargados de reflejar la radiación de una determinada frecuencia y transmitir la restante y los fotodetectores capaces de recoger y transformar la luz reflejada en una débil corriente eléctrica. Todo este sistema de lentes y filtros deja pasar la luz de ciertos colores, bloquea otros o dirige la emisión hacia los detectores correspondientes.

Por último el sistema informático, el cual consta de diversos amplificadores de señal, un transformador analógico digital, que convierte los pulsos electrónicos en información digital y un computador que almacena los datos en forma estadística. (Goetzman 1993)

Cuando la muestra es succionada por la jeringa del sistema hidráulico, cada célula fluye a través del LASER dispersando la luz incidente. En este punto pueden ocurrir dos eventos, dependiendo de la presencia o no de sustancias denominadas fluorocromos, las cuales pueden estar unidas a la célula o a sus elementos. En ausencia de fluorocromos, el láser incide sobre la célula y proporciona dos tipos de señales ópticas, en función del ángulo de recolección de la luz dispersada, que realizan dos fotodetectores diferentes. La luz puede ser dispersada de manera frontal en ángulos entre 1° y 10° proporcionando información sobre el tamaño de la célula, a este parámetro se le denomina FSC (Forward Scatter, dispersión frontal). También puede ser dispersada en un ángulo de 90° SSC (Side Scatter, dispersión lateral) lo cual proporciona información sobre la granularidad y complejidad interna de la célula. Estos dos parámetros son la base para la clasificación de las células sanguíneas en diferentes poblaciones, según su granularidad y tamaño. (Melamed 1990)

El segundo evento que puede ocurrir, está relacionado con la presencia de fluorocromos unidos a los elementos celulares, en este caso el fluorocromo absorbe la luz emitida por el láser y reemite la luz con menor energía y a una longitud de onda más larga,

fenómeno denominado fluorescencia. La cantidad de luz o número de fotones emitidos es proporcional a la cantidad de fluorocromo presente en la célula. Ya que generalmente los fluorocromos se utilizan para marcar anticuerpos monoclonales, dirigidos contra un epítipo específico, la fluorescencia que este emita, será directamente proporcional a los sitios de unión que posea la célula, con respecto a los anticuerpos marcados. (Viguer 1995)

2.2.1 Fluorocromos

Los fluorocromos son sustancias químicas que tienen la propiedad de absorber fotones de alta energía procedentes del espectro ultravioleta o del espectro visible, produciendo un fenómeno denominado fluorescencia. Cuando el fluorocromo absorbe fotones, se produce una redistribución de sus electrones corticales, de forma que algunos de ellos cambian de órbita alejándose del núcleo, desplazamiento al cual se le llama excitación. Como esta situación es inestable, los electrones tienden a volver a su posición inicial, emitiendo la energía absorbida en una o varias etapas intermedias. La energía de la radiación liberada depende del desnivel energético existente entre estas etapas intermedias y se manifiesta, por la emisión de una radiación luminosa de longitud de onda distinta. En este proceso se pierde energía, de forma que la cantidad de energía de la radiación emitida, es inversamente proporcional a su longitud de onda. (Ley de Stoke, en Kaplan. 1996).

Dentro del concepto de fluorescencia es importante destacar parámetros como coeficiente de extinción y eficiencia cuántica. El coeficiente de extinción se define como la cantidad de luz absorbida a una longitud de onda determinada. Es importante que la longitud de onda de la absorción máxima, este cercana a la de emisión de la fuente de excitación utilizada. La fluoresceína tiene una absorción máxima a 495 nm muy cercana a los 488 nm del láser de argón, por lo cual es una sustancia muy utilizada en citometría como fluorocromo. Por otro lado la eficiencia cuántica es el número de fotones emitidos por cada fotón absorbido. Puede ser modificada por la polaridad o el pH. (Goding 1993)

Para que un fluorocromo pueda ser utilizado en citometría de flujo, debe cumplir las siguientes condiciones: 1) Ser excitado por la longitud de onda de la radiación procedente de la fuente luminosa. 2) Máxima estabilidad para las condiciones de almacenamiento. 3) Máximo de emisión comprendido entre el espectro de luz visible. 4) La longitud de onda de la luz excitadora de la fluorescencia y de la luz emitida por el fluorocromo deben estar lo suficientemente distantes como para que puedan diferenciarse fácilmente. 5) El fluorocromo debe descomponerse mínimamente con la exposición a la luz. (Viguer.1995)

Existen diferentes tipos de fluorocromos, deben diferenciarse los que son capaces de unirse a otras sustancias para hacerlas fluorescentes de los que poseen capacidad para unirse directamente a componentes celulares. Dentro de los fluorocromos más utilizados para marcar sustancias, está el isotiocinato de fluoresceína (FITC), este posee un alto coeficiente de extinción y gran eficiencia cuántica. Con absorción a los 495 nm (color azul) y emisión a 520 nm (color verde). El FITC presenta ventajas como su estabilidad y facilidad de manejo.

Otro de los fluorocromos ampliamente utilizado es la ficoeritrina (PE), que presenta una excitación máxima a los 495 nm (color azul) y una emisión a los 576nm (color naranja), esta se utiliza con frecuencia en estudios de doble fluorescencia. Para usar mas de un fluorocromo en citometría, es necesario que ambos se exciten a la misma longitud de onda pero emitan a longitudes diferentes. (Beavis 1994)

Actualmente se ha avanzado progresivamente en el diseño de nuevos fluorocromos, ya que su aplicación para estudios de triple o cuádruple fluorescencia ha incrementado su uso. Entre los más usados están los conjugados covalentes de ficoeritrina y cianinas en estos la energía de emisión de la ficoeritrina actúa a su vez como excitadora sobre la molécula ligada de cianina, la cual si no es de esta manera, no podría ser excitada por la longitud de onda del láser de argón. Dentro de este grupo se encuentran la cianoficoeritrina 3 (Cy PE3) y la cianoficoeritrina 5 (Cy PE5). (Festin 1990)

El FITC y la PE se encuentran frecuentemente ligados en forma covalente, a anticuerpos monoclonales, a los cuales se unen sin alterar la capacidad de estos para unirse a sus correspondientes antígenos. Por ello los fluorocromos vinculados a anticuerpos específicos constituyen un medio útil para observar los lugares donde se produce la reacción antígeno- anticuerpo. La utilización de dos anticuerpos marcados con dos fluorocromos diferentes, permite hacer dobles tinciones y analizar poblaciones celulares en donde se producen ambos fenómenos. El modo de unión a los anticuerpos depende del tipo de fluorocromo, por ejemplo el FITC se liga mediante enlace covalente, con los grupos amino y carboxilo de las proteínas, esta unión tiene lugar a pH alcalino 9.5. (Heim et al 1995)

Durante la conjugación de los fluorocromos a los anticuerpos, hay una reacción competitiva de hidrólisis. A altas concentraciones de proteína ($>10\text{mg/ml}$) la conjugación a esta es altamente favorable, alcanzando una eficiencia del 70% de acoplamiento del fluorocromo. A concentraciones de proteína mas bajas ($1-2\text{mg/ml}$) se puede lograr que el fluorocromo se conjugue a esta, pero es necesario añadir mas fluorocromo y remover el exceso de este, ya que puede causar interferencias, uniéndose inespecíficamente a los elementos celulares.

Es importante determinar el cociente fluorocromo/ proteína, con el fin de poder establecer que cantidad de anticuerpo esta marcado. Este cociente debe ser mayor a 1 ya que en caso contrario los anticuerpos no marcados competirán con los marcados por los sitios de unión. (Goding 1976)

Posteriormente el anticuerpo marcado se une a la célula y en el momento en que el fluorocromo sea excitado, emitirá fluorescencia directamente proporcional, a la cantidad de sitios de unión que posea la célula, con respecto al epitopo al cual se encuentra dirigido el anticuerpo monoclonal. Cuando se trata de conjugar un fluorocromo con un anticuerpo deben utilizarse moléculas purificadas de estos últimos, evitando de esta forma la posibilidad de unión a otras proteínas.

2.2.2 Aplicaciones de la citometría de flujo

La posibilidad de estudiar células en suspensión, de forma individualizada y multiparamétrica, hace de la citometría de flujo una herramienta de gran utilidad en diferentes áreas como: citología, inmunología, hematología y anatomía patológica, tanto en el ámbito de diagnóstico como en el de investigación. Las aplicaciones más frecuentes son: 1) cuantificación de DNA y ciclo celular. 2) Determinación de la viabilidad celular. 3) Evaluación de la activación celular 4) Fenotipificación de células usando anticuerpos monoclonales, lo cual ha contribuido a diferenciar células de características morfológicas similares. Ha contribuido al diagnóstico (marcadores de superficie de células tumorales) pronóstico y seguimiento de tratamientos. (Druet et al. 1993)

Uno de los usos más frecuentes de la citometría de flujo, es la tipificación de marcadores de membrana o CD,s de los linfocitos. Este análisis requiere el uso de anticuerpos monoclonales ligados a fluorocromos, mediante esta técnica se han abierto perspectivas rápidas y efectivas para el diagnóstico y pronóstico de enfermedades neoplásicas. Tradicionalmente las Leucemias se distinguían por criterios morfológicos, incluyendo el uso de tinciones especiales. Actualmente el uso de la citometría se ha convertido en un método rápido y cuantitativo para el diagnóstico de estas. (Darnell et al. 1997).

Mediante el uso de paneles de anticuerpos monoclonales, (ligados a fluorocromos) dirigidos contra diferentes CD's de estas células neoplásicas, se puede identificar el linaje del cual provienen. De esta manera se puede diferenciar el tipo de leucemia (de la línea mieloide o linfoide) ,estado de maduración de estas células malignas, detección de clonalidad, heterogeneidad, características aberrantes y cuantificación de células hematopoyéticas. (Rothe et al 1996).

Otra de las aplicaciones de la citometría, es el monitoreo de tratamientos, como en el caso de la infección por HIV , en donde se realiza el conteo del número absoluto de linfocitos CD4+. La evolución clínica del SIDA se correlaciona no sólo con el porcentaje de poblaciones linfocitarias como con la cuantificación de la expresión del HIV. La expresión del virus se puede evaluar por citometría de flujo, identificando la

expresión del RNA viral o de proteínas virales específicas. Existen otras aplicaciones de la citometría, como en el manejo de pacientes con trasplante de médula ósea, las muestras son analizadas antes del trasplante con el fin de identificar cualquier tipo de leucemia, igualmente se analizan muestras pos-trasplante con el fin de identificar tempranamente rechazo del trasplante. En trasplante de órganos, se analizan las poblaciones de LT con el fin de monitorear episodios de rechazo, confirmar infecciones virales y monitorear la efectividad de la terapia. (Goetzman 1993)

El desarrollo de nuevos instrumentos, reactivos y métodos, continua expandiendo el número de aplicaciones de la citometría de flujo. De esta manera esta técnica se convierte en un instrumento de la ciencia, que facilita el diagnóstico y abre perspectivas en la investigación aplicada a diferentes áreas.

2.3 MARCADORES LINFOIDES

Los linfocitos T expresan diferentes marcadores de membrana los cuales los dividen en subpoblaciones y de acuerdo con los marcadores que expresan se puede identificar su estado de maduración o activación. Estas proteínas de membrana son denominadas CD's (Clusters of differentiation) termino que se utiliza para referirse a una molécula reconocida por un grupo de anticuerpos monoclonales. La población linfoide formada por los LB, LT y un subgrupo denominado NK es tipificada según la expresión o no de estos marcadores. (Knapp et al 1989)

Los LT se originan de un precursor común en la médula ósea, o célula pluripotencial, la cual se caracteriza por la expresión de HLA-DR+ y CD34+. Posteriormente se generan los linfocito T tempranos o protimocitos, los cuales expresan los marcadores CD2+, CD7+ y CD3+ que en general son proteínas de membrana que identifican el linaje de las células T. Después de adquirir los marcadores de linaje, los protimocitos, migran al timo. Durante la maduración tímica, el LT adquiere el receptor TCR y otros marcadores como el CD5+, CD1+, el marcador de linfocitos T ayudadores CD4+ o de LT citotóxicos CD8+ (Shapiro 1990). Cuando los LT dejan el timo y entran circular en el torrente sanguíneo son denominados células vírgenes, debido a que aún no se han encontrado ni han respondido a su antígeno específico. Los linfocitos T vírgenes se

caracterizan por expresar el marcador CD45RA+ y la selectina CD62L+, la cual tiene un receptor en los nódulos linfoides, sitio al cual se dirige preferencialmente esta subpoblación, para encontrarse con el antígeno correspondiente. Si en los nódulos el LT virgen no se activa vuelve a circulación a través del conducto torácico (Abbas *et al*1994).

Cuando los linfocitos T son activados expresan un marcador de menor peso molecular que el CD45RA, este es denominado CD45RO+. Así mismo disminuyen en su totalidad la expresión de la selectina CD62L. La progenie de cada célula T activada se diferencia a células efectoras y de memoria. Este fenotipo de linfocitos no se dirige a los nódulos linfoides sino hacia los sitios de inflamación, los cuales son los sitios de entrada más frecuentes del antígeno. Las células T efectoras y de memoria muestran un patrón de recirculación diferente al de los LT vírgenes.

Estas subpoblaciones linfocitarias (vírgenes, activados y de memoria) se diferencian según la expresión de otros marcadores de membrana. En el caso de los LT citotóxicos CD8+, la población de vírgenes, expresan niveles altos de CD28+ y CD27+, tienen baja expresión de CD49d+, CD49e+, CD29+, CD11a+, CD18+, CD58+ (familia de integrinas) y tienen en gran cantidad la selectina CD62L+ y CD45RA+. Cuando el LT se activa disminuye la expresión del marcador CD28+. Los LT efectores fenotípicamente se caracterizan por tener los marcadores de la familia de las integrinas, todo lo contrario a los LT vírgenes, además carecen de marcador CD28 al igual que del marcador CD27, en esta células efectoras se encuentran ausentes estas moléculas coestimuladoras para el crecimiento y la producción de citoquinas. La ausencia del CD28 implica que esta subpoblación de LT es incapaz de interactuar con la APC para inducir la expansión clonal. Funcionalmente los LT efectores poseen la cualidad de producir perforina, granzima B y ligando FAS, sin coestimulación *in vitro*, característica que los diferencia de los linfocitos T vírgenes, los cuales no se activan sin coestimulación. Los LT citotóxicos CD8+ de memoria, tienen también alta expresión de la familia de las integrinas, son RO+ y solo parte de este subgrupo expresa el marcador CD28, también expresan niveles elevados de ligando FAS y producen citotoxinas *in vitro*, pero con previa estimulación (Hamann 1992).

Dentro de la población linfoide se encuentran las células NK, estas representan un grupo fenotípicamente heterogéneo de linfocitos no T y no B. Funcionalmente las células NK son un grupo primitivo de linfocitos, que constituyen la primera línea de defensa del organismo, frente a patógenos de origen viral o células tumorales. Las NK se originan de un precursor hematopoyético en la médula ósea, donde maduran y después pasan a circulación. La mayoría de ellas se caracterizan por la expresión del receptor CD2+ y del marcador de linaje linfoide CD7+. Las células NK no expresan el marcador CD5 o el receptor TCR, al igual que carecen de la expresión del marcador de linfocitos T ayudadores CD4. Las NK maduras, expresan en bajas densidades el marcador CD8+, la molécula de adhesión CD56+, el receptor CD16+ y el antígeno asociado a NK CD57+, estos últimos tres son empleados para reconocerlas (Lanier *et al* 1998).

Por otro lado, encontramos la población formada por los linfocitos B, estos se originan en la médula ósea en donde pasan por las primeras fases de diferenciación. El precursor de células B más temprano, expresa HLA-DR+, el CD19+, antígeno de todas las células B y el CD34+. Subsecuentemente los linfocitos B expresan otros marcadores denominados de linaje, como CD24+, CD72+ y CD73+. Los precursores tempranos de células B también expresan el marcador CD22+. La adquisición del marcador común de leucemia linfoblástica aguda, CD10+ es otra de las características de los precursores tempranos de médula ósea. Posteriormente los linfocitos B tempranos, adquieren la expresión de la inmunoglobulina de superficie IgM. Después de adquirir la inmunoglobulina de superficie, los linfocitos B de la médula ósea, pierden la expresión del CD10 y adquieren la expresión de los marcadores de membrana CD20+, CD22+, CD40+, CD74+ y CDw78+. Estos linfocitos B vírgenes migran a circulación, en donde regulan la expresión de ciertos marcadores de linfocitos B maduros como: CD37+, CD39+, CD75+, CD76+. (Hannet *et al* 1992)

El segundo estadio en la diferenciación de las células B, ocurre después de la activación producida por la estimulación antigénica. Este proceso involucra, afinidad antígeno anticuerpo, cambio de clase de las inmunoglobulinas, la producción de linfocitos B de

memoria y la diferenciación de los LB a células plasmáticas. En sangre periférica los linfocitos B activados se pueden identificar por la expresión el marcador CD23+ y CD77+. Una vez los linfocitos B son activados, se dirigen a los tejidos linfoides secundarios y se diferencia a linfocitos B foliculares. Los antígenos CD19+, CD20+, CD37+, CD40+, CD45+, CD72+, CD74+ y CDw75+ son expresados a través del folículo linfoide, incluyendo la zona del manto, la zona marginal y la zona folicular central. El ultimo estadio de la respuesta inmune de los linfocitos B, es su diferenciación a célula plasmática. En esta fase el linfocito B pierde la mayoría de sus marcadores de linaje, incluyendo el antígeno HLA-DR y su inmunoglobulina de superficie. Las células plasmáticas, expresan el marcador CD38+ y el CD45+.

La identificación de estos marcadores de membrana, mediante anticuerpos monoclonales, permite fenotipificar las diferentes poblaciones linfoides y así mismo relacionarlas con procesos patológicos, colaborando con el diagnostico y seguimiento de enfermedades. De esta manera se extienden las perspectivas a nivel investigativo y se proyectan nuevas aplicaciones a nivel clínico.

(Hofman et al 1980)

3. OBJETIVOS

GENERAL

Purificar y marcar anticuerpos monoclonales .

OBJETIVOS ESPECIFICOS

- Amplificar los hibridomas productores de los anticuerpos monoclonales.
- Purificar los anticuerpos monoclonales.
- Marcar los anticuerpos monoclonales con fluorocromos.
- Identificar la población de células que expresan el marcador empleando los anticuerpos purificados y citometría.

4. JUSTIFICACIÓN

La producción de anticuerpos monoclonales, permite ampliar las perspectivas en los diferentes campos de investigación. El empleo de anticuerpos monoespecíficos en la citometría de flujo, tiene aplicaciones como: fines diagnósticos, determinación de subgrupos de linfocitos, tipificación de leucemias, terapia antitumoral, inmunosupresión, control de fertilidad. Otro de los usos más frecuente en esta área, es la tipificación de marcadores de membrana o CD's de los linfocitos.

Mediante la realización de este trabajo, se pretende adquirir la experiencia, en el área de purificación y marcaje de anticuerpos monoclonales. La producción de estos, implica dos fases, la fase inicial de inmunización del animal e hibridación de células y la segunda fase que involucra la purificación de los anticuerpos producidos por el hibridoma y su empleo eficiente en reacciones serológicas. El desarrollo de toda una técnica de purificación y marcaje en el laboratorio, permitirá acercarse en un futuro, a la producción de anticuerpos monoclonales de la especificidad que se requieran y así mismo emplearlos con fines diagnósticos e investigativos, planteando nuevos horizontes para la unidad de citometría de flujo de la Pontificia Universidad Javeriana. Así mismo mediante la realización de este trabajo, se obtendrá un anticuerpo monoclonal, que podrá ser utilizado en citometría de flujo, para diversa aplicaciones, como practicas docentes .

5. METODOLOGÍA

5.1 AMPLIFICACION DE LOS HIBRIDOMAS

Se amplificaron hibridomas productores de anticuerpos monoclonales utilizando un medio D-MEM base con HEPES 0.99mM, Bicarbonato de sodio 0.95 mM, se filtró con una membrana de 0.22um, estéril y se suplemento con Penicilina 50000U/L, Estreptomicina 50ug/L, Amino ácidos no esenciales 2mM, Suero bovino fetal 15% y Glutamina 2mM. (Sigma). Se cultivaron en cajas pequeñas de mantenimiento de cultivo celular, posteriormente se realizo pase a cultivo en cajas de 75ml ajustando la densidad celular a 1000000/ml, se mantuvieron 6 cajas de 75ml durante 2 meses, realizando pases periódicos cada tres días y ajustando siempre a 1000000/ml. Posteriormente se recogieron los sobrenadantes producidos por los hibridomas. El momento adecuado para recoger el sobrenadante, era cuando este tenía un color amarillo.

5.2 PURIFICACION DE LOS ANTICUEROS

5.2.1 Precipitación

Los sobrenadantes recogidos de los hibridomas se purificaron con el fin de obtener óptimas concentraciones de IgM sin contaminación. Para lo cual inicialmente se realizó precipitación con sulfato de amonio. Se empleó sulfato de amonio al 34.2%. Con el cual se precipitaron 200ml del sobrenadante de cultivo. EL precipitado obtenido se disolvió en PBS al 1% con azida de sodio al 0.1%. Posteriormente se realizó diálisis con membranas de 12Kd como límite de exclusión, utilizando como buffer una solución de bicarbonato de sodio (NaHCO₃) 200mM y EDTA 5mM. Con el fin de comprobar la eliminación del sulfato de amonio, se realizó una prueba cualitativa para detectar la presencia de esta sal, para lo cual se agregó Cloruro de Bario al 10% a la solución de diálisis. (Harlow 1988).

5.2.2 Cuantificación de proteína.

Al dializado obtenido se le realizó turbidimetría para determinar la concentración de IgM recuperada, para esto se empleo el kit SERA-PAK de bayer de referencia 6823, usando como reactivos un antisuero de cabra específico para IgM e IgG, un calibrador de azida sódica de 1g/L y un diluyente de cloruro de sodio de 9g/l y Azida de sodio de 1g/l . También se cuantificó el porcentaje de proteína total presente en el dializado, por el método de Bradford. Para esto se utilizó el reactivo de Bradford, NaCl 1.5 M y estándares concentrados de hasta 1mg/ml de proteína. Este proceso se repitió después de la cromatografía, cuantificando los niveles proteicos de las fracciones obtenidas.

5.2.3 Cromatografía de filtración en gel.

Para obtener un precipitado puro de IgM considerando el alto peso molecular de esta proteína, se realizó la técnica de cromatografía por filtración en gel. Para esto se utilizó una columna de 90 cm de largo empaquetada con Sephadex G200 (límite de exclusión de 300.000-500.000 daltons) Se utilizó como buffer, PBS con Azida de sodio al 0.1%. Se recogieron las fracciones y se leyeron las absorbancias a 280nm.

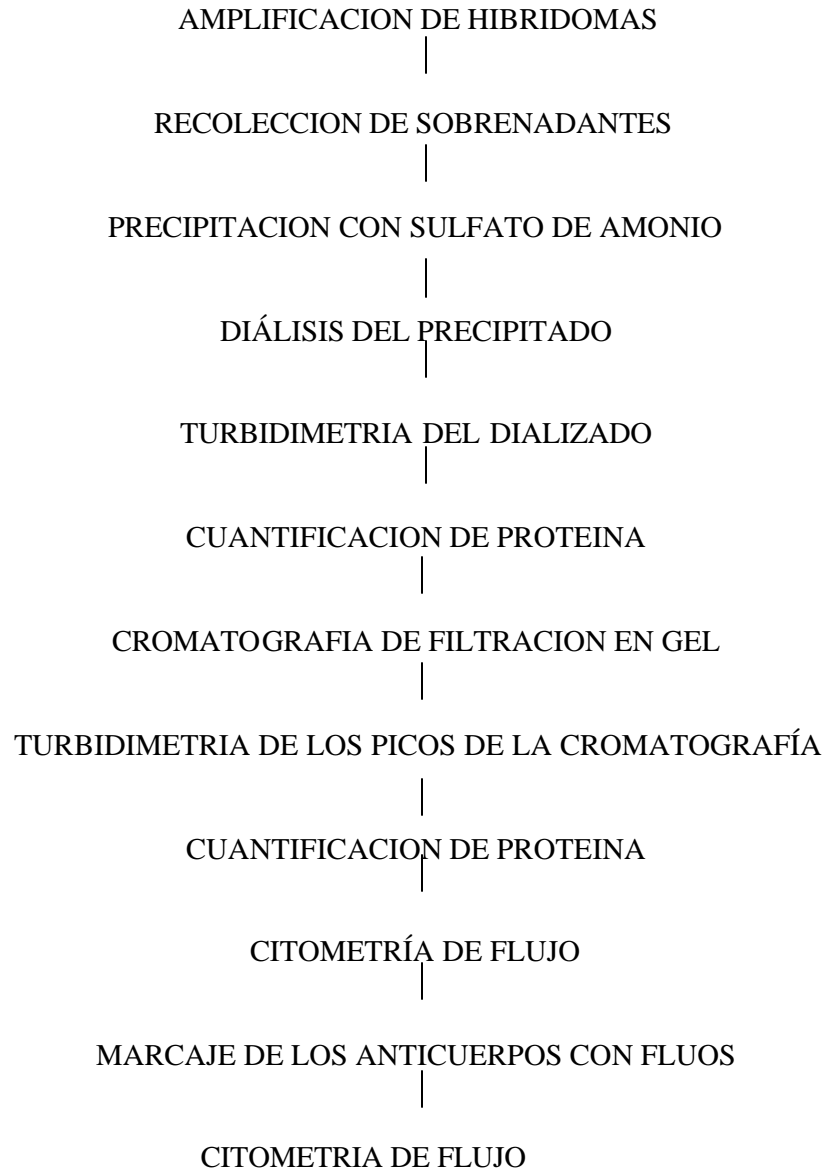
5.3 MARCAJE

Después de purificar los anticuerpos, se marcaron con un fluorocromo derivado del Isotiocianato de Fluoresceína, denominado Carboxifluoresceína-N-Hidroxisuccinamida. (Fluos) . Se emplearon 0.001gr de Fluos en 0.0005ml de DMS y 300ul de cada fracción en 700ul de Bicarbonato al 0.1M pH 7.9, se agregaron 20ul de Fluos a las fracciones. Posteriormente se realizó una cromatografía con columnas de 5cm, empaquetadas con sephadex G-25, utilizando como buffer PBS al 0.05M pH 7.3 con NaCl al 0.9%. Por último se leyeron las absorbancias de las fracciones recolectadas a 280nm y 495nm y se determinó la relación Fluos /Proteína.

5.4 ENSAYOS DE CITOMETRÍA DE FLUJO EMPLEANDO EL ANTICUERPO MARCADO

Se realizó un marcaje utilizando el anticuerpo con Fluos , para ello se utilizaron 50ul de sangre total, concentración de 1ul, 3ul y 5ul del anticuerpo marcado, 500ul de Solución de lisis Beckton and Dickinson 1/10 y PBS 1% con Azida de sodio al 0.1%. Posteriormente se realizó un marcaje, con anticuerpos anti CD8, CD56, CD19, CD25, CD3, CD5, CD69, CD4, CD38, CD22 marcados con Phycoeritrina Beckton and Dickinson y 1ul del anticuerpo marcado con fluos.

5.5 DIAGRAMA DE METODOLOGIA PROPUESTA



6. RESULTADOS

6.1. AMPLIFICACION DE HIBRIDOMAS

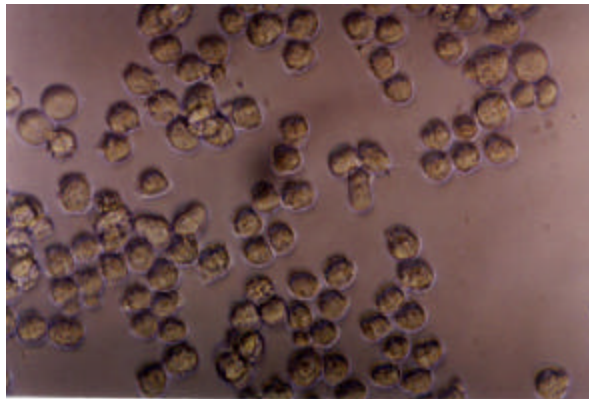
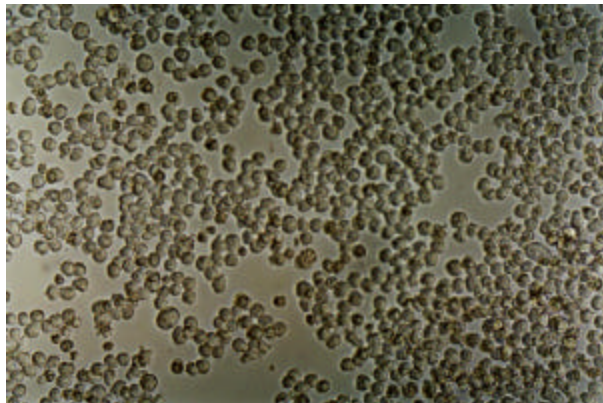


Figura 1. Amplificación de Hibridomas

Con el propósito de obtener optimas cantidades del anticuerpo, se amplificaron los hibridomas(Figura 1). Para esto, crecieron en un medio de cultivo enriquecido, durante dos meses. Se utilizaron 6 cajas de 75ml para su amplificación, cuando el sobrenadante tomaba una coloración amarilla, como resultado del cambio de Ph que se genera en el medio de cultivo, debido al metabolismo celular, este e ra recolectado con el

propósito de formar un pool con todos los sobrenadantes de las cajas de cultivo del hibridoma. Se recogieron 200ml de sobrenadante.

6.1. 1. Presencia del anticuerpo en el sobrenadante del cultivo.

Con el propósito de demostrar la presencia del anticuerpo en los sobrenadantes de cultivo, se realizó citometría de flujo. (Figura 2.)

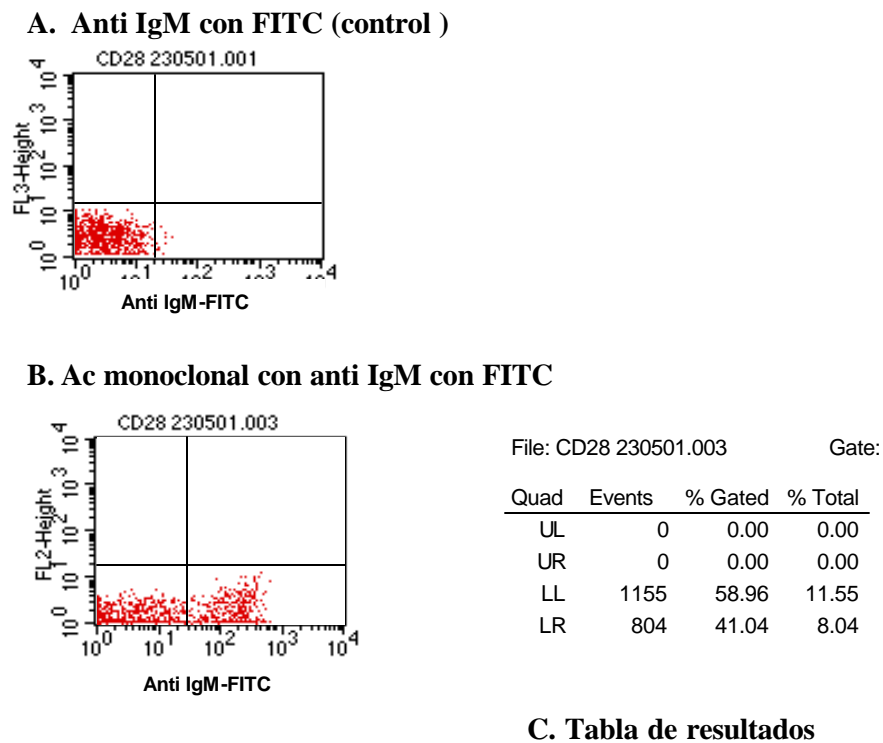


Figura 2. Presencia del anticuerpo en el sobrenadante del cultivo.

Para demostrar la presencia de la inmunoglobulina M, en el sobrenadante de los hibridomas, se realizó un ensayo de citometría de flujo. Para esto se tomó sangre total de un adulto sano y se incubó con el sobrenadante de los hibridomas, posteriormente se añadió un anticuerpo secundario marcado con FITC, en este caso anti-IgM, con el fin de evidenciar la reacción antígeno anticuerpo. Se seleccionó la población linfocítica mediante el programa de adquisición en el citómetro, y se cuantificó el porcentaje de

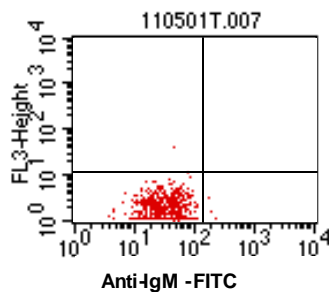
células que expresaban el marcador contra el cual esta dirigido el monoclonal. En la figura 2, se puede observar en el panel B, como en el cuadrante inferior derecho (LR), el 41% de la población seleccionada, expresa el marcador contra el cual se encuentra dirigido el anticuerpo presente en el sobrenadante del cultivo. Así mismo se observa que el 8% de la población total, expresan este marcador. La tabla de resultados se muestra en el panel C. El panel A es el control del anticuerpo secundario anti IgM, utilizado en el marcaje.

6.2. PURIFICACIÓN DEL ANTICUERPO

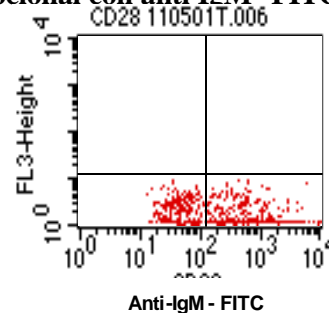
6.2.1. Presencia del anticuerpo en la solución dializada.

Después de realizar la precipitación y la diálisis, se realizó citometría de flujo, con el propósito de comprobar que el anticuerpo no se había perdido en todo el proceso de purificación. (Figura 3)

A. anti IgM- FITC (Control)



B. Ac monoclonal con anti IgM- FITC



File: CD28 110501T.006 Gate:

Quad	Events	% Gated	% Total
UL	0	0.00	0.00
UR	0	0.00	0.00
LL	581	41.98	5.81
LR	803	58.02	8.03

C. Tabla de resultados

Figura 3. Presencia del anticuerpo en la solución dializada.

Teniendo en cuenta que en el proceso de precipitación y diálisis se pretendía obtener óptima concentración de inmunoglobulina M, se realizó un ensayo de citometría de flujo con el precipitado, con el fin de comprobar la presencia del anticuerpo monoclonal. Para esto, se tomó sangre total de un adulto sano y se incubó con el precipitado obtenido, posteriormente se añadió un anticuerpo secundario marcado con FITC, anti IgM, con el fin de evidenciar la reacción antígeno- anticuerpo. Posteriormente se seleccionó la población linfocítica en el citómetro, mediante el programa de adquisición y se identificó el porcentaje de la población que expresaba el marcador contra el cual se encuentra dirigido el anticuerpo monoclonal. Los resultados de este marcaje se pueden identificar en la figura 3, en el cuadrante inferior derecho (LR) de el panel B, se observa que el 8% de la población celular total expresa el marcador. Así mismo que el 58% de la población seleccionada, expresa este marcador. De esta manera se comprobó que el anticuerpo estaba presente en la solución, dializada. El panel A representa el control del anticuerpo secundario anti IgM utilizado en el marcaje.

6.2.2. Cuantificación de proteína en el precipitado.

Se cuantificó la proteína total presente en el dializado, por el método de Bradford obteniendo una concentración de 169 mg/ml. Al cuantificar los niveles de IgM en el sobrenadante dializado de los hibridomas se obtuvo una concentración de 3.15 mg/ml de IgM, a partir de esta información se puede establecer que el 1.8% de la proteína total, es inmunoglobulina M y que se necesita continuar con el proceso de purificación para poder obtener buenas concentraciones del anticuerpo monoclonal.

6.2.3. Cromatografía.

Teniendo en cuenta el alto peso molecular de la IgM, se realizó una cromatografía de filtración en gel, con el propósito de obtener concentraciones óptimas del anticuerpo. Para esto se tomaron 6ml del precipitado obtenido y se dejaron correr en una columna de Sephadex G-200, la muestra corrió durante 72 horas, tiempo en el cual se colectaron las diferentes fracciones. En la cromatografía realizada al precipitado (Figura 4), se

obtuvieron 44 fracciones de 2ml cada una, el pico de la IgM comenzó a salir a partir de la fracción numero 26 y termino en la numero 33. Observándose un pico máximo en las fracciones 28 y 29 (puntos rojos) de las cuales se formo un pool, este se alícuoto para posteriores análisis.

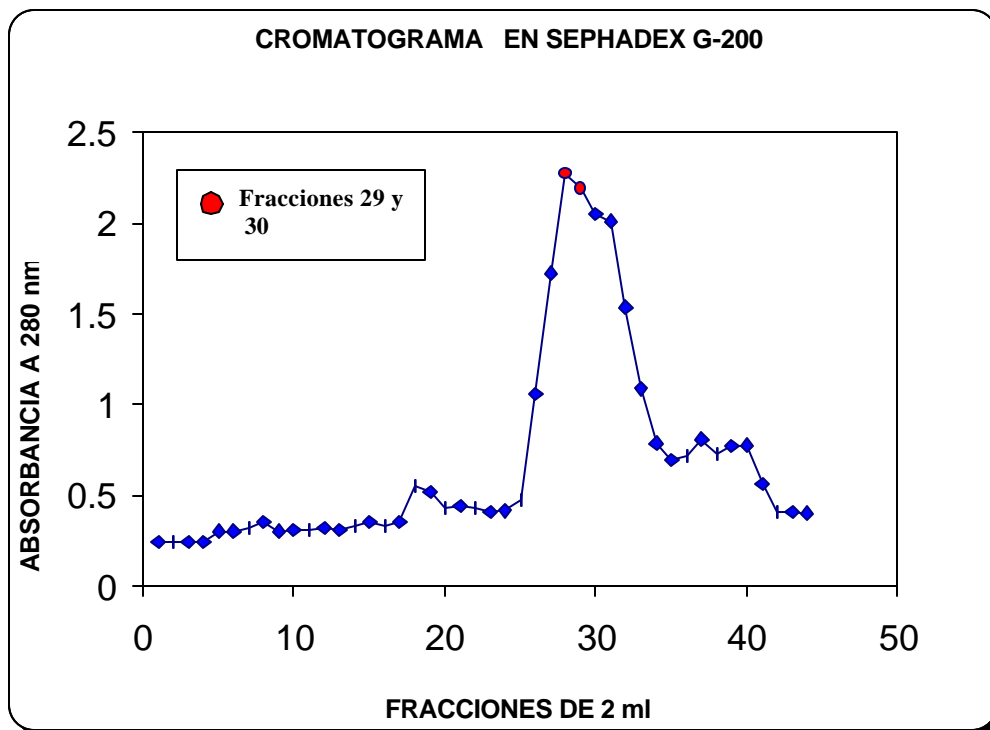


Figura 4. Cromatograma de purificación de la IgM.

6.2.4. Cuantificación de proteína de las fracciones obtenidas en la cromatografía

Se cuantificaron los niveles de proteína total, la concentración obtenida en el pool de (fracciones 28 y 29) fue de 2.5 mg/ml. En la cuantificación de los niveles de IgM, realizada a las fracciones se obtuvieron valores de 2.0mg/ml de IgM. Con esta información se puede establecer que el 80% de la proteína presente en las fracciones es IgM.

6.3. MARCAJE

Se marcaron las fracciones de los picos obtenidos en la cromatografía de filtración en gel, con FLUOS concentrado, esto con el propósito de obtener un anticuerpo monoclonal marcado con un fluorocromo y así poder evidenciar los sitios en donde se produzca la reacción antígeno anticuerpo. Para realizar esto, se alcalinizó el pool formado de las fracciones 29 y 30 y se incubó con FLUOS, posteriormente se realizó una cromatografía de filtración en gel con sephadex G- 25. Este anticuerpo marcado se empleará para realizar ensayos de citometría de flujo e identificar la población que expresa el marcador contra el cual está dirigido el monoclonal. En la cromatografía realizada para el marcaje, se obtuvieron 16 fracciones de 500ul cada una. Se leyeron las absorbancias de las fracciones a 280nm, obteniendo el pico máximo de anticuerpo en la fracción número 4, con una absorbancia mayor a 3 (Figura 5). Igualmente se leyó 495nm, en donde las fracciones 3, 4 y 5 presentaron pico de fluorocromo con absorbancias mayores a 3. (Figura 6). Posteriormente se determinó la relación Fluos/proteína.

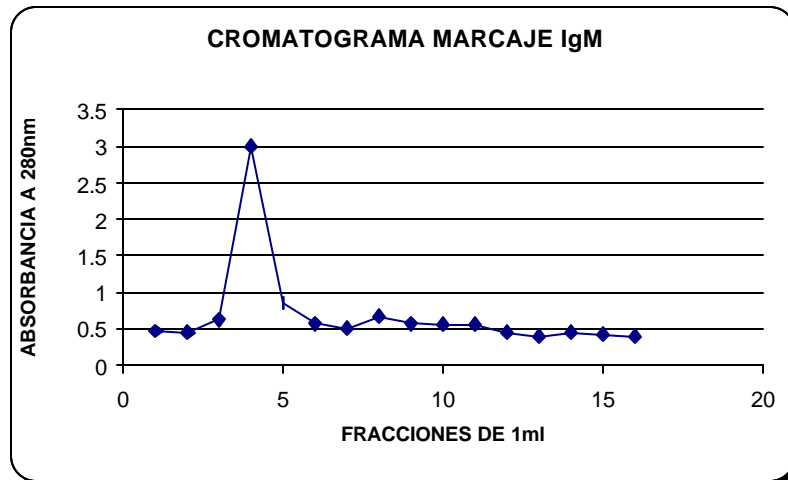


Figura 5. Cromatograma del marcaje de IgM.

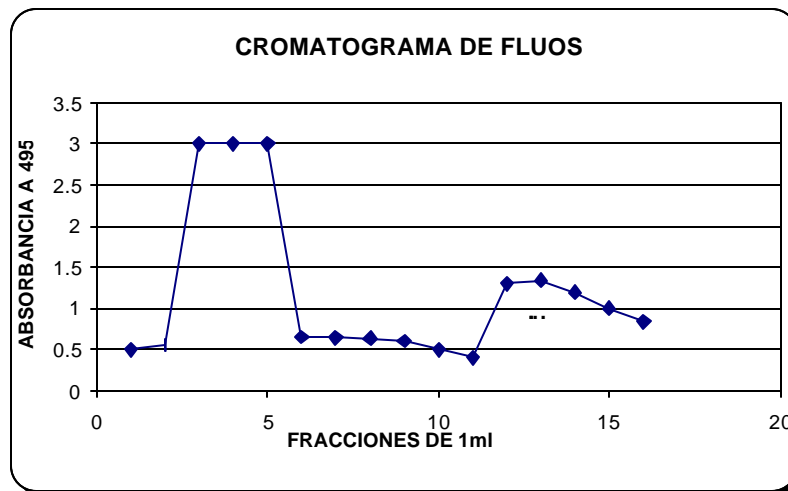


Figura 6. Cromatograma de Fluos

6.3.1 RELACIÓN FLUOS / PROTEÍNA

Al leer las absorbancias de las fracciones de la cromatografía, a 280nm y 495nm se puede determinar la relación FLUOS/ Proteína, la cual esta dada por la siguiente formula:

$$F/P = \frac{3.053 \times \text{Extinción a 495nm}}{\text{Extinción 280nm} - 0.255 \times \text{Extinción a 495nm}}$$

Se calculó la relación Fluos proteína en las fracciones numero 3 a 5 del anticuerpo purificado.

$$\text{Fracción numero 3} \quad \frac{3.053 \times 3}{0.623 - 0.255 \times 3} = 8.30$$

$$\text{Fracción numero 4} \quad \frac{3.053 \times 3}{3 - 0.255 \times 3} = 1.11$$

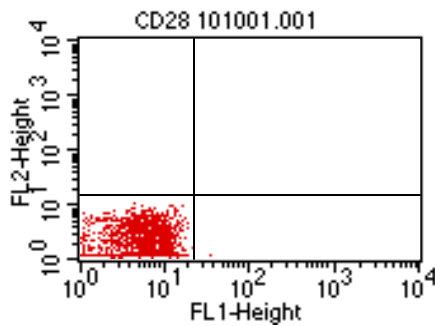
$$\text{Fracción numero 5} \quad \frac{3.055 \times 3}{0.856 - 0.255 \times 3} = 5.083$$

Debido a que la relación de FLUOS proteína en la fracción numero 4 es la más adecuada, una molécula de fluorocromo por una molécula de anticuerpo, se escogió esta fracción para los marcajes posteriores.

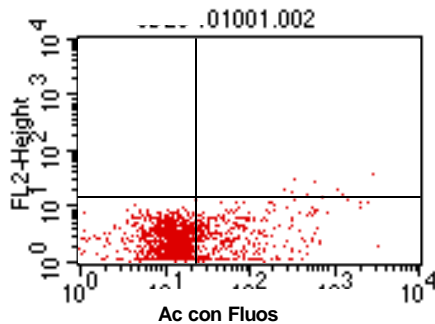
6.4. ESTANDARIZACIÓN DEL ANTICUERPO MARCADO CON FLUOS.

Debido a que el propósito del marcaje, es poder utilizar el anticuerpo en posteriores ensayos de citometría de flujo, era necesario conocer la cantidad que se necesita del anticuerpo marcado, para realizar estos ensayos. Añadir en exceso el anticuerpo, puede producir interferencias en las lecturas realizada en el citómetro. Con el fin de estandarizar el volumen a emplear, se realizo un ensayo de citometría de flujo, variando la cantidad del anticuerpo marcado con FLUOS. Para esto se tomo sangre total de un adulto sano y se incubo con el anticuerpo marcado, empleando la fracción numero 4 en este proceso. Se añadieron 1 y 3 ul del monoclonal con Fluos, obteniendo que el volumen optimo a emplear es 1ul.

A. Control de células solas



B. Anticuerpo con FLUOS 1ul

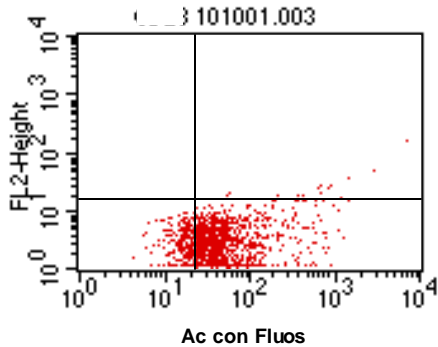


File: CD28 101001.002

Gate: G1

Quad	Events	% Gated	% Total
UL	0	0.00	0.00
UR	16	0.57	0.20
LL	2089	74.87	25.67
LR	685	24.55	8.42

C. Anticuerpo con FLUOS 3ul



File: CD28 101001.003

Gate: G1

Quad	Events	% Gated	% Total
UL	0	0.00	0.00
UR	26	0.94	0.39
LL	544	19.72	8.24
LR	2189	79.34	33.17

D. Tabla de Datos

Figura 7. Estandarización del anticuerpo marcado con Fluos

En la figura 7, en el panel B, se observa como con 1ul del anticuerpo marcado con fluos, se diferencian dos poblaciones. En el cuadrante inferior derecho (LR) y en el cuadrante superior derecho (UR), se encuentra la población que expresa el marcador, 25.12% de la población linfocida seleccionada. En el panel C, se observa como con 3ul de anticuerpo, se desplaza casi toda la población hacia la derecha, el 80.28% de la población seleccionada es positiva para la expresión del marcador. El panel A representa el control realizado a la población de células empleado en el marcaje. Teniendo en cuenta los resultados de citometría anteriores, se consideró que con 1ul del anticuerpo se obtiene un marcaje efectivo.

6.5. EXPRESIÓN DEL MARCADOR EN LA POBLACIÓN LINFOIDE CD3+ y CD3-.

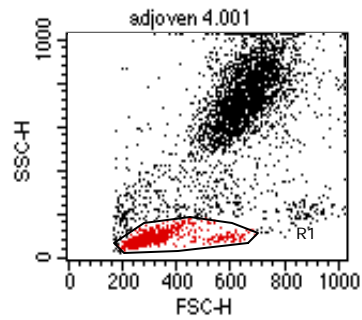
Posteriormente se realizó marcaje, utilizando 1ul del anticuerpo con Fluos. Debido a que se tenían indicios sobre la especificidad del anticuerpo que producía el hibridoma, se realizaron ensayos dirigidos a comprobar esta información. Se creía que el hibridoma era productor de anticuerpos anti CD28, este marcador se expresa en los linfocitos T CD3+ y en los linfocitos T CD8+ o CD4+. Teniendo en cuenta esta información, se realizó un marcaje con el anticuerpo purificado marcado con fluos y anti CD8 y anti CD3 con ficoeritrina. Para esto se tomo sangre

total de un adulto sano y se incubo con anti CD3 marcado con Estreptavidina Per c-p, anti CD8 con Ficoeritrina y el anticuerpo marcado con FLUOS, simultáneamente, se utilizo como control sangre total a la cual no se le añadió ningún anticuerpo. Se selecciono la población de linfocitos, en el citómetro, mediante el programa de adquisición y posteriormente se selecciono la ventana de los linfocitos CD3+ y CD3-, ventana sobre la cual se realizaron los análisis para la expresión del marcador CD8 y el marcador contra el cual estaba dirigido el monoclonal.

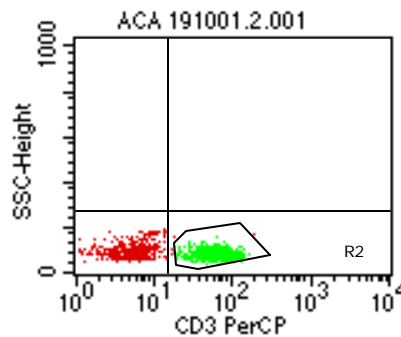
6.5.1 Expresión del marcador en la población CD3+.

En el panel A, se observa la distribución de las células sanguíneas según su tamaño y granularidad, igualmente se observa la población de linfocitos seleccionada para los análisis del marcaje, en el panel B se observa la población de linfocitos CD3+, sobre esta ventana se realizo el análisis para el marcador CD8 y el marcador contra el cual esta dirigido el monoclonal marcado con FLUOS.

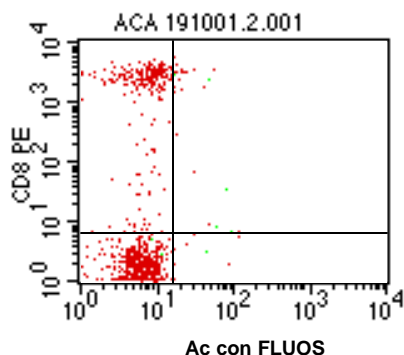
A. Población de linfocitos



B. Población de linfocitos CD3+



C. Expresión del marcador en la población CD3+ y CD8+



File: ACA 191001.2.001 Sample ID:
 Quad Location: 16, 6

Quad	Events	% Gated	% Total	X Mean
UL	1069	32.82	10.27	7.95
UR	99	3.04	0.95	214.50
LL	2057	63.16	19.76	6.31
LR	32	0.98	0.31	35.96

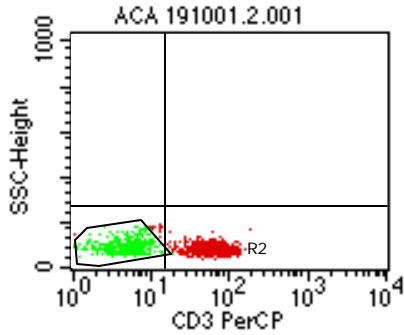
D. Tabla de Datos

Figura 8. Expresión del marcador en la población CD3+.

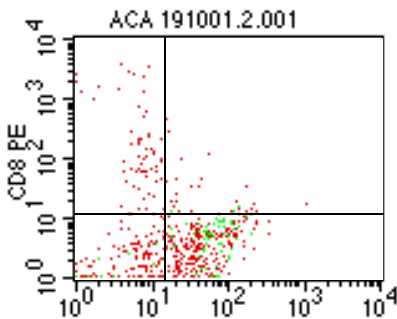
En la figura 8, en el panel B, se observa la población que expresa el marcador CD3 en el cuadrante inferior derecho (LR) (color verde). Tomando como referencia a población CD3+ de la grafica anterior, se identificó la población que coexpresaba los marcador CD8, CD3 y el marcador contra el cual se encuentra dirigido el anticuerpo marcado con FLUOS. En el panel C se puede observar, que la población que coexpresa los 3 marcadores es el 3.04% de la población seleccionada. Así mismo se observa que de las células CD3+ el 4.02% expresan el marcador en estudio. Teniendo en cuenta que la literatura reporta que todas las células CD3+ son CD28+(June et al 1994) se establece que el anticuerpo no esta dirigido contra el marcador CD28 de los linfocitos.

6.5.2 Expresión del marcador en la población CD3-

A. Población de linfocitos CD3-



B. Expresión del marcador en la población CD3- y CD8+



File: ACA 191001.2.001

Sample ID:

Quad Location: 15, 11

Quad	Events	% Gated	% Total	X Mean
UL	283	14.75	2.72	7.64
UR	146	7.61	1.40	144.53
LL	471	24.54	4.52	6.24
LR	1019	53.10	9.79	59.75

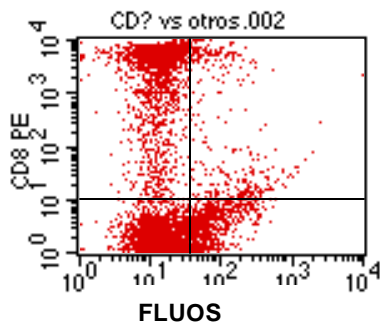
C. Tabla de contenido

Figura 9. Expresión del marcador en la población CD3-

En la figura 9, se observa la expresión del marcador en estudio en la población CD3-. En el cuadrante inferior izquierdo (LL) de el panel A, se identifica la población celular que no expresa el marcador CD3. Tomando como referencia esta grafica, se realizaron los análisis para la coexpresión de el marcadores CD8 y el marcador en estudio. En el panel B, en el cuadrante superior derecho, podemos identificar la población CD3-CD8+ y positiva para el marcador del anticuerpo purificado, la cual representa el 7.61% de la población lin foide y el 1.4% de la población total de células.

6.6 ENSAYOS DE CITOMETRÍA DE FLUJO, PARA DEFINIR EN QUE POBLACION MARCA EL ANTICUERPO PURIFICADO.

Después de identificar que el marcador contra el cual esta dirigido el anticuerpo purificado, se expresa en las células CD3 negativas, y no en las células CD3+ CD8+ como se esperaría en el caso de ser un anti CD28, se realizó un marcaje con anticuerpos dirigidos contra diferentes marcadores de las poblaciones linfoides. Para llevar acabo este ensayo, se tomo sangre total de un adulto sano y se incubo con el anticuerpo marcado con FLUOS y con anticuerpos dirigidos contra diferentes marcadores de los linfocitos cada uno por separado, se utilizaron anti CD8, anti CD4, anti CD3, anti CD19, anti CD22, anti CD25, anti CD69, anti CD38, anti CD56 y anti CD5 marcados con ficoeritrina. Posteriormente se selecciono la población linfoide en el citómetro, mediante el programa de adquisición y se identifico la población que coexpresaba el marcador contra el cual esta dirigido el anticuerpo monoclonal con FLUOS y el anticuerpo marcado con ficoeritrina. De esta manera se estableció en que población linfoide se expresa la proteína contra la cual esta dirigida el monoclonal purificado.



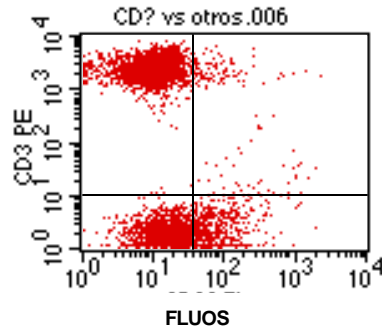
Acquisition Date: 25-Oct-1

Quad	Events	% Gated	% Total
UL	1966	37.27	9.05
UR	325	6.16	1.50
LL	2222	42.12	10.22
LR	762	14.45	3.51

Figura 10. Anti CD8+ y FLUOS.

En la figura 10, se observa en el cuadrante superior derecho (UR), que el 6.16% de la población seleccionada, expresa el marcador CD8 y el marcador contra el cual se encuentra dirigido el anticuerpo purificado. También se puede establecer que de la

población CD8+, el 14.8% de las células, expresan el marcador contra el cual esta dirigido el anticuerpo purificado.

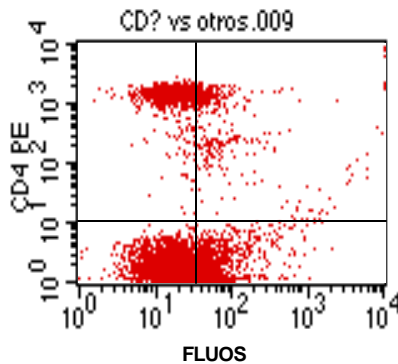


Acquisition Date: 25-Oct-1

Quad	Events	% Gated	% Total
UL	3168	60.03	17.90
UR	130	2.46	0.73
LL	1408	26.68	7.96
LR	571	10.82	3.23

Figura 11. Anti CD3 y FLUOS

En la figura 11, se observa en el cuadrante superior derecho que el 2.46% de la población seleccionada expresa el marcador CD3 y el marcador contra el cuál se encuentra dirigido el anticuerpo marcado con Fluos. Se puede decir que de las células CD3+ el 3.9% expresan el marcador contra el cual esta dirigido el anticuerpo purificado.



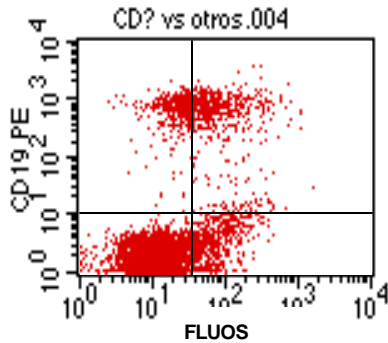
Acquisition Date: 25-Oct-1

Quad	Events	% Gatec	% Tota
UL	1313	24.75	7.75
UR	351	6.62	2.07
LL	2668	50.29	15.75
LR	973	18.34	5.75

Figura 12. Anti CD4 y FLUOS

En la figura 11, se puede observar en el cuadrante superior derecho (UR), que el 6.62% de la población seleccionada expresa el marcador CD4 y el marcador contra el cual se encuentra dirigido el anticuerpo purificado. Por lo cual se puede establecer que de los

linfocitos CD4+ el 30% expresan el marcador contra el cual se encuentra dirigido el monoclonal marcado con Fluos.

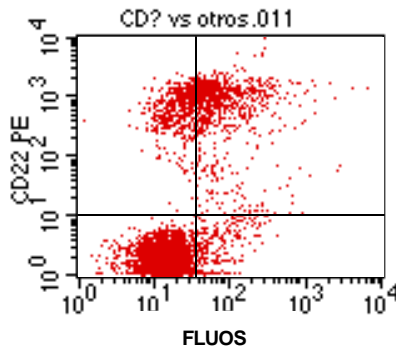


Acquisition Date: 25-Oct-1

Quad	Events	% Gated	% Total
UL	451	8.64	1.71
UR	578	11.08	2.19
LL	3648	69.91	13.83
LR	541	10.37	2.05

Figura 13. Anti CD19 y FLUOS

En la figura 13, se observa en el cuadrante superior derecho (UR), que el 11.08% de la población seleccionada, expresa el marcador CD19 y el marcador contra el cual se encuentra dirigido el anticuerpo purificado. Se puede establecer que de la población de linfocitos CD19+, el 56% expresa el marcador contra el cual se encuentra dirigido el anticuerpo purificado.



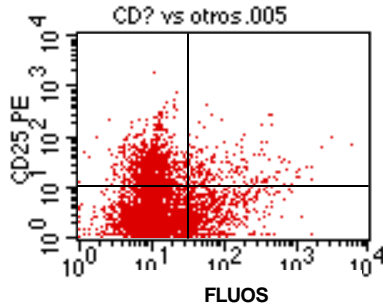
Acquisition Date: 25-Oct-1

Quad	Events	% Gated	% Total
UL	550	10.56	3.06
UR	898	17.25	4.99
LL	3521	67.62	19.56
LR	238	4.57	1.32

Figura 14. Anti CD22 y FLUOS

En la figura numero 14, se observa en el cuadrante superior derecho que el 17.25 de la población seleccionada, expresa el marcador CD22 y el marcador contra el cual se encuentra dirigido el anticuerpo marcado con FLUOS. Se puede establecer que de la

población CD22+ , el 62% de las células expresan el marcador contra el cual esta dirigido el anticuerpo purificado.

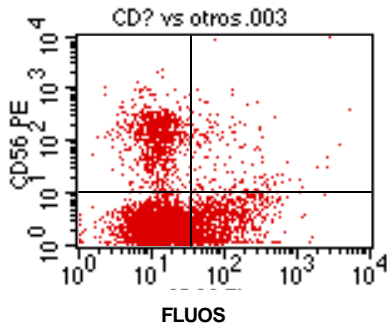


Acquisition Date: 25-Oct-1

Quad	Events	% Gated	% Total
UL	945	17.82	5.19
UR	174	3.28	0.96
LL	3582	67.55	19.67
LR	602	11.35	3.31

Figura 15. Anti CD25 y FLUOS

En la figura 15, se observa en el cuadrante superior derecho, que el 3.28 de la población seleccionada, expresan el marcador CD25 y el marcador contra el cual esta dirigido el anticuerpo marcado con FLUOS. Se puede establecer que de los linfocitos CD25+ el 15% expresan el marcador contra el cual esta dirigido el anticuerpo purificado.

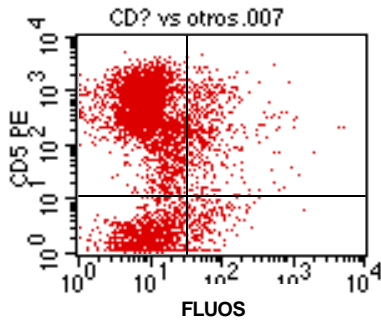


Acquisition Date: 25-Oct-1

Quad	Events	% Gated	% Total
UL	912	17.43	4.87
UR	156	2.98	0.83
LL	3233	61.80	17.28
LR	930	17.78	4.97

Figura 16. Anti CD56 y FLUOS

En la figura 16, se observa en el cuadrante superior derecho que el 2.98 de la población seleccionada, expresa el marcador CD56 y el marcador detectado por el anticuerpo purificado. Así mismo se puede establecer que de la población CD56+ el 14% expresan el marcador contra el cual se encuentra dirigido el anticuerpo purificado.

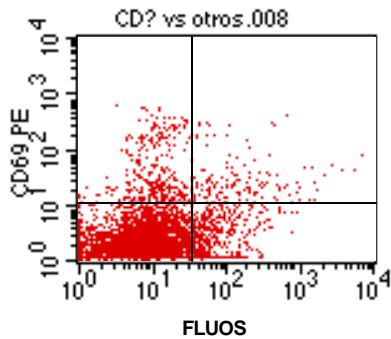


Acquisition Date: 25-Oct-1

Quad	Events	% Gated	% Total
UL	3455	65.16	18.42
UR	439	8.28	2.34
LL	1227	23.14	6.54
LR	181	3.41	0.97

Figura 17. Anti CD5 y FLUOS

En la figura 17 se observa en el cuadrante superior derecho que el 8.28 % de la población de la población linfoide, expresan el marcador CD5 y el marcador contra el cual se encuentra dirigido el anticuerpo purificado. También se puede decir que de la población CD5+ el 11.2% expresan el marcador contra el cual se encuentra dirigido el anticuerpo purificado.

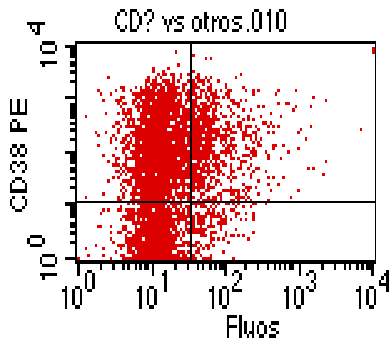


Acquisition Date: 25-Oct-1

Quad	Events	% Gated	% Total
UL	356	7.21	2.24
UR	145	2.94	0.91
LL	4002	81.04	25.22
LR	435	8.81	2.74

Figura 18. Anti CD69 y FLUOS

En la figura 18, se observa en el cuadrante superior derecho, como el 2.94% de la población total de células y el 0.91% de la población seleccionada, expresan el marcador CD69 y el marcador contra el cual esta dirigido el anticuerpo.



Acquisition Date: 25-Oct-1

Quad	Events	% Gated	% Total
UL	2757	52.91	14.93
UR	816	15.66	4.42
LL	1464	28.09	7.93
LR	174	3.34	0.94

Figura 19. Anti CD38 y FLUOS

En la figura 19, se observa como en el cuadrante superior derecho el 15.66% de la población linfoide, expresan el marcador CD38 y el marcador contra el cual se encuentra dirigido el anticuerpo purificado. Así mismo se puede decir que de la población de células CD38+ el 22% expresan el marcador contra el cual se encuentra dirigido en anticuerpo purificado.

7. DISCUSIÓN

La especificidad de un antisuero monoclonal, es el resultado de la activación de un clon de linfocitos, contra un solo determinante antigénico, razón por la cual se diferencian de los antisueros policlonales convencionales; en donde la especificidad esta dada por la activación de un sin numero de clones, contra los diferentes determinantes antigénicos de una misma molécula. (Milstein *et al* 1991)

El desarrollo de la técnica de la producción de anticuerpos monoclonales, representa un gran avance en la ciencia y la tecnología, su empleo como reactivos, en diferentes reacciones serológicas , expandió a gran escala las posibilidades a nivel investigativo y diagnostico. Los antisueros de anticuerpos monoclonales, presentan ventajas por ser altamente específicos y tener pocas probabilidades de presentar reacción cruzada. El empleo de monoclonales en la citometría de flujo, ha permitido avanzar en el campo diagnóstico, en el monitoreo de tratamientos y en la investigación de las diferentes poblaciones sanguíneas. (Drouet *et al* 1993)

Con en el desarrollo de este trabajo se logró purificar y marcar un anticuerpo monoclonal, el cual se utilizó en el marcaje de la población linfoide. Mediante la técnica de cromatografía por filtración en gel, se logro una eficiencia del 80% en el proceso de purificación del anticuerpo monoclonal, ya que se partió de una concentración proteica total de 169mg/ml y se logro una concentración de 2.5mg/ml, obteniendo concentraciones de 2.0mg/ml del anticuerpo. Es claro que la cromatografía acompañada de técnicas complementarias como la precipitación con sulfato de amonio, representa una buena opción para purificar un anticuerpo de alto peso molecular como lo es la IgM. Se comprobó que para obtener un anticuerpo eficiente para ser utilizado en citometría, es necesario tener concentraciones de mínimo 1mg/ml, del anticuerpo, igualmente que la relación de Fluos / Proteína debe estar entre 1 y 2 como lo reporta la

literatura (Goding 1976), con el propósito de evitar las interferencias que pueda causar el fluorocromo que no se haya unido o el anticuerpo sin marcar.

El hibridoma se obtuvo del Instituto de Inmunología del Hospital San Juan de Dios, se tenía información acerca de que el hibridoma producía, anticuerpos monoclonales anti CD28.

El CD28 es una glicoproteína homodimérica cuya función es coestimular el proceso de activación de los linfocitos T (June 1990). En el hombre una pequeña porción de linfocitos inmaduros CD3-, son CD28+. Durante la maduración en el timo, hay una baja expresión del CD28 en la superficie de muchos timocitos doble positivos CD4, CD8+, cuando los timocitos maduran, la expresión del CD28 se incrementa en los LT, CD4+ o CD8+ vírgenes, que posean el marcador CD3. (June *et al* 1994)

Debido a que el CD28 se coexpresa con el marcador CD3, se realizaron ensayos de citometría de flujo, sobre la población CD3+, para aclarar la especificidad del anticuerpo purificado.

En el marcaje realizado sobre la población CD3+, el porcentaje de células que expresaban el marcador contra el cual está dirigido el anticuerpo era del 4.02%, resultado que no se correlaciona con la información obtenida de la literatura, la cual refiere que todas las células CD3+ expresan el marcador CD28. Igualmente se realizó un marcaje sobre la población CD3-, para este caso el porcentaje de células que expresaba el marcador fue de el 60.71%, estableciendo de esta manera, que el anticuerpo producido por el hibridoma, se expresa más en las células CD3- que en las células CD3+, razón por la cual se elimina la posibilidad de que se un monoclonal dirigido contra la glicoproteína de membrana CD28.

Con el propósito de identificar la población linfoide, que expresa el marcador contra el cual se encuentra dirigido el anticuerpo purificado, se realizaron ensayos de citometría de flujo, con anticuerpos monoclonales dirigidos contra diferentes marcadores de la población linfoide.

Se encontró que el marcador contra el cual está dirigido el anticuerpo monoclonal, se expresa en el 44% de la población linfocítica total. También se logró establecer que está dirigido contra un marcador común para la población de linfocitos T, tanto CD4+ como CD8+; igualmente que se expresa en la población de linfocitos B, ya que mediante el marcaje con anti CD19 y CD22,

Se demostró que el 60% de las células que expresan estos marcadores coexpresan el marcador en estudio. Establecer la especificidad del anticuerpo, es una tarea que requerirá de posteriores estudios, ya que en este trabajo solo se pudo establecer indicios sobre la población linfocítica que expresa este marcador y por lo tanto contribuir con esta información en el proceso de identificación de la especificidad del anticuerpo.

Con este trabajo, se logró purificar un anticuerpo monoclonal, que pudo ser empleado eficientemente en ensayos de citometría de flujo. Este es el paso a seguir, después de la inmunización e hibridación exitosa de las células; el manejo en cultivo de los hibridomas, y el desarrollo de un óptimo proceso de purificación, constituyen una parte importante, dentro de la producción de anticuerpos monoclonales en el laboratorio.

De esta manera se abren perspectivas en el campo investigativo, ya que al adquirir la experiencia en el área de purificación y marcaje de monoclonales, se hizo una aproximación a la producción de los mismos, para en futuro desarrollar anticuerpos mono-específicos, dirigidos contra los determinantes antigénicos que se requieran en la unidad de citometría de flujo.

También se abren perspectivas en el área docente, ya que este anticuerpo puede ser utilizado en ensayos inmunológicos que requieran fluorescencia, en citometría de flujo y en reacciones serológicas en general, además se aproxima la posibilidad de poder producir los reactivos que se necesiten para las prácticas de laboratorio de la universidad.

Debido a los múltiples usos de los anticuerpos monoclonales y a la importancia que tienen estos dentro del contexto de la unidad de citometría de flujo, poder producir en

un futuro anticuerpos monoespecificos, dirigidos contra marcadores de especificidad predeterminada, permitirá expandir los horizontes en el área investigativa y diagnóstica.

8. BIBLIOGRAFÍA

- ABBAS A, LICHTMAN A, POBER J. 1994. Cellular and Molecular Immunology. 2nd ed. W.B Saunder Company.. cap 11.
- ALBEROLA J, TAKAKI S, KERNER J, PERLMUTTER R. 1997. **Differential signaling by lymphocyte antigen receptors.** *Annu. Rev. Immunol.* 1997.15 :125-154.
- AUDIBERT, F. M, LIESE L,D. 1993 **Adjuvants: current status, clinical perspectives and future prospects.** *Immunol Today* .14, 281-284.
- BEAVIS, A. J. PENNLIN, K. J.1994. **Simultaneous measurement of five cell surface antigens by five colour immunofluorescence.** *Cytometry* .15:371-376
- BERZOFKY J, EPSTEIN S, BERKOWER I. 1989. Antigen – Antibody interactions and monoclonal antibodies. Fundamental immunology. New York. William E. Paul. ed. Pag 315-323.
- CAMPBELL A. M.1991.Monoclonal antibody and immunosensor technology. Elsevier ed. Cap1.
- DARNELL, J ; FOON, K . 1997. **Recent advances in flow cytometry: applications to the diagnosis of hematologic malignancy.** *Blood.* 90:2863-2879.
- DROUET M, LEES O.1993. **Clinical applications of flow cytometry in hematology and immunology.** *Bio Cell.*78. 73-78

- FESTIN R, BJORKLAND A, TOTTERMAN TH. 1990. **Single laser flow cytometry detection of lymphocytes binding three antibodies labelled with fluorescein, phycoerythrin and a novel tandem fluorochrome conjugated.** *J Immunol methods*.126. 69-78.
- GERMAIN, R.N, MARGULIES D. H. 1993. **The biochemistry and cell biology of antigen processing and presentation.** *Annu. Rev. Immunol.* 8 303-333.
- GODING J,W.1976.**Counjugation of antibodies with fluorochromes: Modification to the standart methods .** *J Immunol Methods*. 13, 215-226.
- GOETZMAN E. 1993. **flow cytometry: Basic concepts and clinical applications in immunodiagnosics.** *Clinical Laboratory Science*.6:3.
- HAMANN D, BAARS P, HOOIBRINK B, KERKHOF S, KLEIN M AND VAN. R.1997. **Phenotypic and functional separation of memory and effector human CD8+ T cells.** *Journal of experimental medicine*.186:1407.
- HANNET I, ERKELLER-YUKSEL F, LYDYARD P, DENEYS V, DEBRUYERE M. 1992. **Developmental and maturation changes in human blood lymphocytes subpopulations .** *Immunology today*. 13, 215-218.
- HARLOW E, LANE D.1988. **Antibodies a laboratory manual .**New York: Cold spring Harbor Laboratory.
- HEIM R, CUBITT, A. TSIEN, R. 1995. **Improve green fluorescence.** *Nature*. 373:663-664
- HEYMAN B. 2000. **Regulation of antibody response via antibodies, complement, and Fc receptors** *Annual Review of Immunology*.18 : 709-737.

- HOFFMAN RA, KUNG PC, HANSEN WP, GOLSTEIN G.1980. **Simple and rapid measurement of human T lymphocytes and their subclasses in peripheral blood.** *Proct Natl Acad Sci.* 77, 4914-4917.
- JUNE C, LEDBETTER J, LINSLEY P AND THOMPSON. C.1990. **Role of the CD28 receptor in T cell activation.** *Immunology Today.* 11:211.
- JUNE H.C, BLUESTONE A. J, NADLER M. L AND THOMPSON B. C.1994.**The B7 and CD28 receptor families.** *Immunology Today.* 15:321.
- KAPLAN. L., PESCE . A. 1996. Clinical chemistry, theory analysis correlation. 3 ed . Mosby. Cap 13.
- KNAPP W, RIEBER P, DORKEN B, SCHMIDT RE, STEIN H, BORNE AE. 1989. **Towards a better definition of human leucocytes surface molecules.** *Immunology Today.* 10, 253-258.
- MILSTEIN C. AND KOHLER G.1975 **Continues cultures of fused cells secreting antibodies of predefined specificity.** *Nature.* 256:495.
- MILSTEIN C, WINTER G.1991. **Man made antibodies.** *Nature.* 349:293-299.
- MELAMED M R, LINDMO T, MENDELSON M L. 1990. flow Ccytometry and cell sorting. 2nd ed Wiley-Liss. New York.
- LANIER, L. 1998. **NK Cell receptors.** *Annual Review of Immunology* 16:359-393
- PIRRUCCELLO S, JOHNSON D. 1990. **Reagents for flow cytometry: Monoclonal antibodies and hematopoietic cell antigens.** *Flow Cytometry.* 56-74.

- PODACK, E. R, HENGARTNER H, LICHTENHELD M, G.1991. A **central role of perforin in cytotoxicity?** *Annual Review of Immunology*.9:129-157
- POTTER M, BOYCE CR. 1962. **Induction of plasma cell neoplasm in strain BALB/c mice with mineral oil adjuvants.** *Nature*. 193. 1086-1087.
- REINISH,C, LITMAN.L, 1989. **Evolutionary immunobiology.** *Immunology today*. 10:281-289.
- ROTHE G, SCHMITZ G.1996.**Consensus protocol for the flow cytometric immunophenotyping of hematopoietic malignancies.** *Leukemia*. 10:877-895.
- SHAPIRO HM. 1990. **Cell membrane potential analysis .** *Methods cell biol*. 33: 25-35.
- SHAPIRO, HM. 1995.Practical flow cytometry.3rd ed. Wiley-Liss. New York.
- STEPHANI L, BOTTOMLY KIM, BOTTOMLY CONSTANT. 1997. **Induction of TH1 and TH2 CD4+ T cell responses: The alternative approaches.** *Annu. Rev. Immunol*. 1997.15 :297-322.
- VIGUER J; GARCIA R 1995.; Laboratorio y atlas de citología. España: Mc GrawHill- interamericana. pag 226-240
- WILLIAMS A. F, BARCLAY, N. 1988. **The immunoglobulin superfamily – domains for cell surface recognition.** *Annu. Rev. Immunol* .5 : 381-405.