

ARTICULOS ORIGINALES CORTOS

GENERACION DE HIBRIDOMAS SECRETORES DE ANTICUERPOS MONOCLONALES ANTI 5-BROMO DEOXIURIDINA.

Armando Rojas¹ y Jorge Sarracent²

¹*Laboratorio de Hibridomas, Dpto. Biología Molecular, Dirección de Neurociencias, Centro Nacional de Investigaciones Científicas, Apartado 6990, La Habana, Cuba.* ²*Laboratorio de Antígenos Sintéticos, Facultad de Química, Universidad de la Habana.*

Recibido en enero de 1992. Aprobado en julio de 1993

Key words: Monoclonal antibodies, DNA-base analogues, DNA replication, Non-isotopic methods

SUMMARY

Hybridoma clones secreting monoclonal antibodies against the thymidine analogue, 5-bromo deoxyuridine (5BrUdR), were generated by cellular hybridization between the Sp2/0 Ag14 myeloma cells and splenocytes from mice immunized with 5-bromo uridine-keyhole limpet hemocyanin conjugate.

One clone (1F6F3, IgG1, K) was evaluated for its usefulness in the detection of 5-BrUdR incorporation in cell cultures by immunocytochemical techniques.

RESUMEN

Varios hibridomas secretores de anticuerpos monoclonales que reconocen al análogo de la timidina, la 5-bromo deoxiuridina (5BrUdR), se generaron mediante la hibridación de células del mieloma Sp2/0 Ag14 y esplenocitos de ratones inmunizados con el conjugado 5-bromouridina-hemocianina de las lapas.

Uno de los clones (1F6F3, IgG1, K), se evaluó por técnicas inmunocitoquímicas para la detección de la incorporación de 5-BrUdR en cultivos celulares sometidos a pulsos del análogo.

INTRODUCCION

La incorporación de timidina tritiada ³(H-TdR) en la molécula de ácido desoxirribonucleico (ADN) y su detección por las técnicas de autorradiografía o conteo de centelleo líquido ha sido una metodología ampliamente utilizada en las investigaciones biomédicas. Sin embargo, en ocasiones su uso está limitado fundamentalmente por el peligro potencial de las técnicas radiactivas, la disponibilidad de reactivos y equipos, así como el consumo de tiempo que estas técnicas implican.

El análogo de la timidina, 5-bromo deoxiuridina (5-BrUdR), constituye una opción no radiactiva para el marcaje de las moléculas de ADN. Actualmente, la incorporación de 5-BrUdR en el ADN puede ser detectada por dos métodos diferentes: uno citoquímico basado en la reacción diferencial de algunos fluorocromos con el ADN sustituido con 5-BrUdR, y un segundo método, inmunoquímico, utilizando anticuerpos policlonales o monoclonales específicos para el análogo.

Este último método de detección ha sido utilizado exitosamente en estudios de cinética celular en tumores malignos (Kikuyama *et al.*, 1987; 1988) y cultivos celulares (Boswald *et al.*, 1990; Hume, 1990), estudios de reparación del daño en el ADN (Navone y Raza, 1987), ensayos de diferenciación celular (Kaufman y Robert-Nicoud, 1986), así como en diversos estudios básicos en el campo de la citogenética (Natarajan *et al.*, 1986; Latos-Bielenska *et al.*, 1987).

En el presente trabajo se reporta la obtención y caracterización de varios hibridomas de ratón secretores de anticuerpos monoclonales que reconocen el análogo 5-BrUdR.

MATERIALES Y METODOS

Antígeno

Se utilizó como antígeno 5-bromo uridina acoplada a hemocianina de las lapas (KLH, Sigma; E.U.) según el método de Erlanger y Baiser (1964), y con un grado de sustitución de 15 moléculas del hapteno por molécula de KLH, según cálculos basados en determinaciones espectrofotométricas.

Dirección actual: Centro de Química Farmacéutica, Apartado Postal 6990, Ciudad Habana Cuba

Inmunización

En el día 0 del esquema de inmunización, los ratones Balb/c recibieron por vía intraperitoneal 50 μ g del complejo 5-bromo uridina/KLH en 0.2 ml de adyuvante completo de Freund, seguido de 2 dosis de reactivación en adyuvante incompleto y por igual vía, los días 15 y 30. Una semana más tarde se ensayó el título de anticuerpos por medio de un ensayo inmunoenzimático de tipo ELISA, y dos semanas después el ratón con mejor título recibió 75 μ g del conjugado 5-bromo uridina/KLH en solución salina tamponada con fosfatos (SSTF, pH 7.4), por vía endovenosa.

Fusión y cultivo de hibridomas

La hibridación celular se realizó de acuerdo al método sugerido por Goding (1985); utilizando la línea Sp2/0 Ag14 como mieloma parental.

La fusión celular se llevó a cabo con una relación de células de mieloma: esplenocitos 1:10, y como agente fusionante polietilén glicol 4000 (PEG 4000, Merck, RFA). El medio de selección fue DMEM (Serva, Suiza) suplementado con 10% de suero de ternero neonato descomplementado (Cuba-Vet), 26 mM de bicarbonato de sodio (Serva), 18 mM de Hepes (Serva, Suiza), 2 mM de L-glutamina (Gibco, E.U.), 1 mM de piruvato de sodio (Gibco, E.U.), 40 μ g/ml de gentamicina (Pharmacin, Bulgaria), 10 mM de hipoxantina (Serva, Suiza), 10^{-7} M de aminopterina (Serva, Suiza) y 1.6×10^{-5} M de timidina (Sigma, E.U.).

Ensayo inmunoenzimático de tipo ELISA

Se recubrieron placas de poliestireno (NUNC, Dinamarca) con 100 μ l de los conjugados 5-bromo uridina/albumina sérica bovina (ASB), citidina/ASB, Timidina/ASB y Uridina/ASB, todos con similar relación molar hapteno/proteína y a una concentración de 1 μ g/ml en tampón carbonato-bicarbonato 0.01 M, pH 9.6. Como control negativo se utilizaron pozos recubiertos con ASB. Para la obtención del conjugado timidina/ASB se utilizó el método descrito por Halloran y Paker (1966) y para el resto según Erlanger y Baiser (1964).

La unión inespecífica se minimizó con suero de conejo al 2% en SSTF. Para el tamizaje de los híbridos generados durante la fusión, las muestras de sobrenadante se diluyeron en SSTF (1:1 vol/vol), e incubaron por 2 h a 37°C.

Posteriormente 100 μ l de conjugado anti-IgG de ratón peroxidasa, se añadieron a cada pocillo y se incubaron por 1 h a 37°C. Después de varios lavados la reacción se reveló con orto-fenilén diamina (Sigma, E.U.) al 0.04% en tampón citrato pH 5.5 y 0.04% (v/v) de H_2O_2 al 30%. La reacción se detuvo con 50 μ l de H_2SO_4 2.5 M y las absorbancias se determinaron a 492 nm en un lector de microELISA (Multiskan, Titertek). La positividad de la muestra se consideró tomando como criterio un valor de absorbancia mayor de 3 veces la del control negativo del ensayo (sobrenadantes de hibridomas secretores de AcM no relacionados). Para el tamizaje de los animales inmunizados las placas se recubrieron con el conjugado 5-bromo uridina/ASB y control de ASB. Todos los pasos posteriores fueron idénticos a los descritos anteriormente.

Clonaje y expansión de los híbridos

Los híbridos seleccionados se clonaron y reclonaron por el método de dilución limitante en medio HT (hipoxantina 10^{-4} M, timidina 1.6×10^{-5} M) en placas de 96 pocillos (NUNC). Los clones seleccionados se expandieron en DMEM suplementado con 10% de suero de ternero neonato inactivado (Cuba-Vet).

Producción de ascitis

Se inocularon 2×10^6 células de los híbridos seleccionados en la cavidad peritoneal de ratones Balb/c, previamente inyectados con 0.5 ml de pristane (Sigma) por igual vía y con 10 días de antelación.

Determinación de los isotipos de los anticuerpos

Se utilizó la técnica de inmunodifusión radial doble de Ouchterlony y Nielsson (1978), con antisueros clasificadores (Miles, E.U.) y sobrenadantes de cultivo 20 veces concentrados por ultrafiltración.

Inmunocitoquímica

Uno de los tres clones seleccionados, 1F6F3 (IgG1, K), fue evaluado por su utilidad en ensayos inmunocitoquímicos. A tal efecto se obtuvieron astrocitos de cultivos primarios de mesencéfalo de fetos de ratas Wistar con una edad gestacional de 14 días, según el procedimiento descrito por Hertz *et al.* (1985). Los cultivos fueron sometidos a un pulso de 30 min con 5 BrUdR a una concentración final de 10 μ M. Una vez transcurrido el tiempo señalado las células se colectaron, lavaron tres veces con SSTF y fijaron con metanol:ácido acético 3:1. La suspensión celular se goteó sobre láminas portaobjetos húmedas y se secó al aire.

La tinción inmunocitoquímica se realizó por el método de la inmunoperoxidasa indirecta de acuerdo al protocolo descrito por Schuttle *et al.* (1987). Como control negativo se utilizó un anticuerpo monoclonal no relacionado y con igual isotipo.

Ensayo de inhibición competitiva

Se determinó el porcentaje de inhibición por timidina de la capacidad de unión del anticuerpo monoclonal 1F6F3 sobre ADN marcado con 5 BrUdR. El ensayo se realizó de acuerdo a la metodología descrita por Sano *et al.* (1988).

Cálculo de la constante de afinidad

Se calculó la constante de afinidad del anticuerpo monoclonal 1F6F3 según el método descrito por Friguet *et al.* (1985).

RESULTADOS Y DISCUSION

De un total de 576 pocillos sembrados en medio HAT, 472 mostraron crecimiento celular lo cual representa un 81.9% de eficiencia de fusión. El primer tamizaje mostró que el 15% de los híbridos evaluados fueron positivos para el conjugado 5-bromo uridina/ASB, pero al ser evaluados contra el resto de los conjugados (citidina/ASB, timidina/ASB y uridina/ASB) sólo el 2% de los sobrenadantes mantuvieron la especificidad inicial.

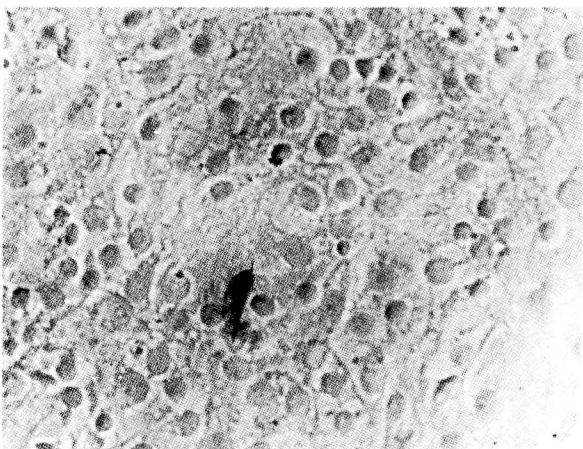
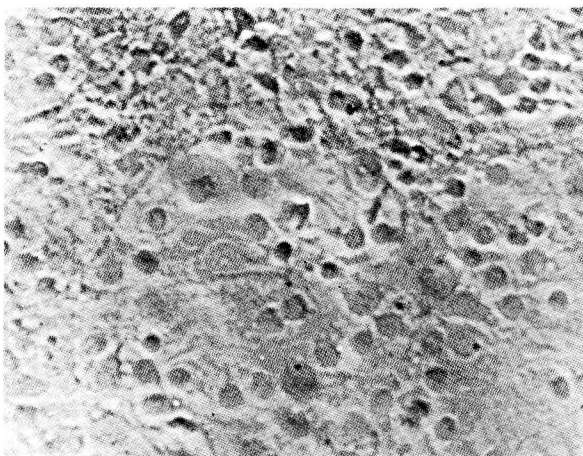
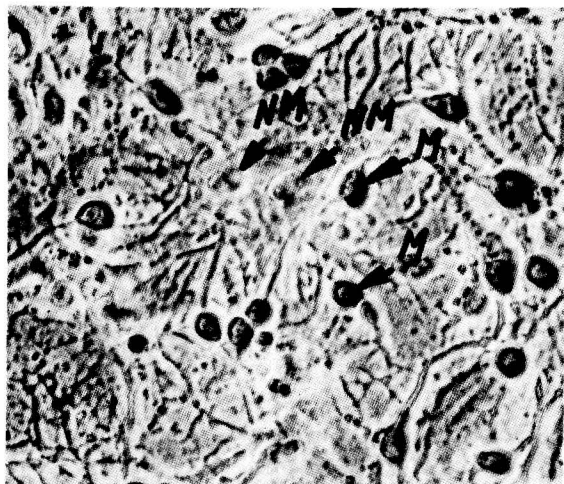


Fig. 1. A. Tinción de inmunoperoxidasa en células de cultivo primario de mesencéfalo de rata (microscopía de contraste de fase). M: núcleo marcado, NM: núcleo no marcado. B. Control negativo de inmunoperoxidasa, utilizando como anticuerpo primario un anticuerpo monoclonal del mismo isotipo, pero de especificidad diferente (anti-HBsAg). C. Control negativo utilizando cultivos no sometidos al pulso de 5-BrUdR.

Estos valores están muy cercanos a los reportados por otros autores (Gratzner, 1982). Cuatro de estos fueron clonados y reclonados dando origen a 4 clones de hibridomas, dos con isotipo IgG1, uno IgG2a y uno IgG2b.

El anticuerpo monoclonal 1F6F3 (IgG1), secretado por el clon de igual código mostrando excelente crecimiento *in vitro* e *in vivo*, así como un adecuado nivel de producción (aproximadamente 5 mg/ml de líquido ascítico), fue caracterizado para su uso en técnicas inmunocitoquímicas. Con tal objetivo se utilizó anticuerpo purificado por cromatografía de afinidad en proteína A-Sepharosa, método que resultó rápido y altamente eficiente en la obtención de preparaciones con un grado de pureza superior al 90%. La concentración óptima se estableció en los 10 $\mu\text{g/ml}$ para las tinciones de inmunoperoxidasa. Se lograron buenos resultados en cultivos celulares sometidos a pulsos de 5-BrUdR (concentración final 10 μM) de sólo 30 min (figura 1).

La figura 2 muestra las curvas de inhibición competitiva para la timidina y el propio análogo. La reactividad cruzada es del 0.1%, de acuerdo a los datos obtenidos, evidenciándose su alta especificidad. Además, la alta afinidad del anticuerpo monoclonal ($K_a = 5 \times 10^{-10}$ M) unido al bajo porcentaje de reactividad cruzada hacen de este anticuerpo una útil herramienta útil para el desarrollo de métodos para la detección de ADN marcado con el análogo 5 BrUdR. Recientemente, Huang *et al.* (1991) reportaron un método inmunológico muy sencillo para determinar niveles de proliferación celular utilizando un anticuerpo monoclonal (Dakkopats, Dinamarca) con similar especificidad del reportado en este trabajo.

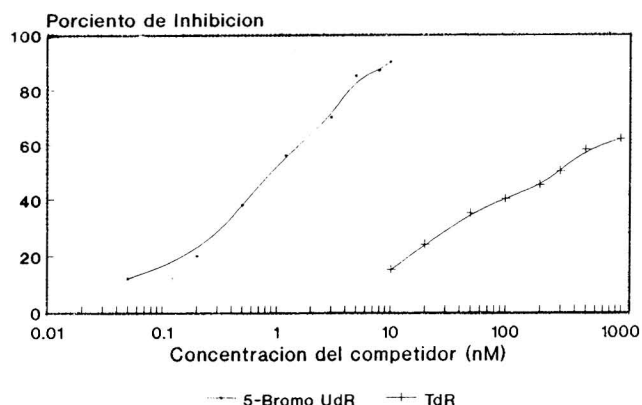


Fig. 2. Curvas de inhibición competitiva para el anticuerpo monoclonal 1F6F3 con los competidores 5-BrUdR y Timidina.

REFERENCIAS

- BOSWALD, M.; S. HARASIN and B. MAURER-SCHULTZE (1990). Tracer dose and availability of thymidine and bromodeoxyuridine: applications of bromodeoxyuridine cell kinetics. *Cell Tissue Kinet.* 23:169-181.
- ERLANGER, B.F. and S.M. BAISER (1964). Antibodies specific for ribonucleosides and ribonucleotides and their reaction with DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 52:68-72.
- FRIGUERT, B.; A.F. CHAFFOTTE; L.D. CHANIANCE and M.E. GOLDBERG (1985). Measurement of the true affinity constant in solution of antigen-antibody complexes by enzyme-linked immunosorbent assay. *J. Immunol. Methods* 77:305-319.
- GODING, J.W. (ed) (1985). Fusion procedures. In: *Monoclonal Antibodies. Principles and Practice*. Academic Press, San Diego, 72-80.
- GRATZNER, H.G. (1982). Monoclonal antibody to 5 bromo and 5 iodo deoxyuridine. A new reagent for detection of DNA replication. *Science.* 218:474-476.
- HALLORAN, M.J. and C.W. PAKER (1966). The preparation of nucleotide-protein conjugates: Carbodiimides as coupling agents. *J. Immunol.* 96:373-378.
- HERTZ, J.; B.H.J. JUURLINK; E. HERTZ; H. FOSMAK and A. SCHOUSBOE (1985). Preparation of primary cultures of mouse (rat) astrocytes. In: *A Dissection and Tissue Culture Manual for the Nervous System*. B. Harbery A. Shalar (Eds) Alan R. Liss, New York, 80-84.
- HUME, W.J. (1990). A reproducible technique combining tritiated thymidine autoradiography and immuno detection of bromo deoxyuridine for double labelling studies of cell proliferation in paraffin section of tissues. *Cell Tissue Kinet.* 23:161-168.
- HUONG, P.L.; A.H.J. KOLK; T.A. EGGELTE; C.P.H.J. VERSTIJNEN; H. GILIS and J.T. HENDRIKS (1991). Measurement of antigen specific lymphocyte proliferation using 5-bromo deoxyuridine incorporation. *J. Immunol. Methods.* 140:243-248.
- KAUFMAN, S.L. and M. ROBERT-NICOUD (1986). DNA replication and differentiation in rat myoblasts studied with monoclonal antibodies against 5-bromodeoxyuridine, actin and α -2 macroglobulin. *Cytometry.* 6:570-577.
- KIKUYAMA, S.; T. KUBOTA; M. WATANABE; Y. ISABE; T. FUKUTOMI; K. ISHIBIKI and O. ABE (1987). Cell kinetics of human tumor xenografts using anti-bromodeoxyuridine monoclonal antibody. *Jpn. J. Surg.* 17:28-34.
- KIKUYAMA, S.; T. KUBOTA; M. WATANABE, Y. K. ISHIBIKI and O. ABE (1988). Cell kinetics of human carcinomas using bromodeoxyuridine. *Cell Tissue Kinet.* 21:15-20.
- LATOS-BIELENSKA A., H. HAMEISTER and W. VOGEL (1987). Detection of bromodeoxyuridine incorporation in mammalian chromosomes. *Human Genet.* 76:293-295.
- NATARAJAN, A.T.; A.H.M. ROTTEVEEL; J. VAN PIETERSON and M.G. SCHILIERMAN (1986). Influences of incorporated 5-bromodeoxyuridine on the frequencies of spontaneous and induced sister chromatid exchanges detected with monoclonal antibody. *Mutat. Res.* 63:51- 55.
- NAVONE A. and A. RAZAN (1987). The detection of DNA repair in Bromodeoxyuridine versus Thymidine containing DNA of individual cells. *Anticancer Res.* 7:13-16.
- OUCHTERLONY, O. and L. A. NIELSSON (1978). Immunodiffusion and immunoelectrophoresis. En: *Handbook of Experimental Immunology*. pp 196, Ed D.M. Weir, Blackwell Scientific Publications, Oxford.
- SANO, H.; M. IMOKAWA and R. SANGER (1988). Detection of heavy methylation in human repetitive DNA subsets by monoclonal antibody against 5-methylcytosine. *Biochim. Biophys. Acta.* 951:157-165.
- SCHUTLE, B.; M.M.J. REYDERS; F.T. BOSMAN and G.H. BLIJHMAN (1987). Effect of tissue fixation on anti-bromodeoxyuridine immunohistochemistry. *J. Histochem. Cytochem.* 35:1343-1345.