



**RECEPTORES PORCINOS
CELULARES.
Aplicación como marcadores
biológicos.**

Gonzalo Paños Adillo
Tesis Doctoral
Córdoba, Julio 2003

INTRODUCCIÓN	5
ANTÍGENOS DE DIFERENCIACIÓN	5
NOMENCLATURA CD.....	6
FUNCIONES DE LOS ANTÍGENOS CD.....	7
ESTRUCTURA DE LOS ANTÍGENOS DE DIFERENCIACIÓN	8
Tipos de anclaje a la membrana	9
Anclaje TM de tipo I.....	9
Anclaje TM tipo II.....	9
Anclaje TM tipo III.....	10
Anclaje a través de glicosil fosfatidil inositol	10
Formas solubles	11
Dominios y superfamilias.....	11
TÉCNICAS EMPLEADAS EN EL ESTUDIO DE LOS ANTÍGENOS CD	12
Anticuerpos monoclonales	12
Citometría de flujo.....	13
Biología molecular	13
APLICACIONES CLÍNICAS DE LOS ANTICUERPOS FRENTE A ANTÍGENOS CD.....	14
Aplicaciones diagnósticas	14
Diagnóstico de enfermedades moleculares.....	14
Determinación de la actividad biológica.....	15
Inmunofenotipaje de leucemias, linfomas e inmunodeficiencias	15
Aplicaciones terapéuticas	15
Inmunosupresión	15
Terapia tumoral	16
INTERÉS DEL CERDO COMO ESPECIE DE ESTUDIO	17
ANTÍGENOS LEUCOCITARIOS PORCINOS	19
APLICACIONES LOS ANTICUERPOS FRENTE A ANTÍGENOS LEUCOCITARIOS PORCINOS	22
OBJETIVOS.....	23
BIBLIOGRAFÍA	24
MATERIAL Y MÉTODOS	27
ANIMALES, ÓRGANOS Y CÉLULAS	27
Animales.....	27
Sangre.....	27
PBMC.....	27
Plaquetas.....	28
Macrófagos alveolares.....	28
Esplenocitos y timocitos.....	28
Esplenocitos de ratón.....	28
Células de mieloma	29
Órganos.....	29
Extracto crudo de cerebro.....	29
ANTICUERPOS Y PROTEÍNAS	30
Anticuerpos monoclonales	30
Proteína recombinante CD29R.....	30
TAMPONES Y SOLUCIONES	31

PRODUCCIÓN DE HIBRIDOMAS	31
Inmunización con PBMC	31
Inmunización con proteína recombinante CD29R	31
Fusión celular	32
ELISA indirecto	32
Clonación de los hibridomas	33
Determinación del isotipo de inmunoglobulina	33
CITOMETRÍAS DE FLUJO	34
Marcaje sencillo	34
En leucocitos	34
En plaquetas	34
En esplenocitos y timocitos	35
En eritrocitos	35
En macrófagos alveolares	35
Marcajes con dos fluorocromos	35
Frente a una batería estándar de anticuerpos contra marcadores leucocitarios porcinos	35
Frente a un anticuerpo contra CD49f humano	36
Citometría intracelular en PBMC	36
Adquisición de células y análisis de los resultados	36
INMUNOPRECIPITACIÓN	37
INMUNOBLOTTING	39
PRODUCCIÓN DE EXUDADO ASCÍTICO	40
PURIFICACIÓN DE ANTICUERPOS MONOCLONALES	41
MARCADO CON BIOTINA	41
ENSAYOS DE MAPEO EPITÓPICO	42
INMUNOHISTOQUÍMICA	42
REFERENCIAS	44
1. OBTENCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE UN ANTICUERPO MONOCLONAL FRENTE A CD5 PORCINO	47
1.1 INTRODUCCIÓN	47
1.2 RESULTADOS	51
1.2.1 Selección y determinación del isotipo del anticuerpo GP2D8	51
1.2.2 Distribución celular	51
1.2.3 Caracterización bioquímica	52
1.2.4 Mapeo epitópico	54
1.3 DISCUSIÓN	55
1.3.1 Distribución celular	55
1.3.2 Caracterización bioquímica	56
1.3.3 Mapeo epitópico	56
1.3.4 Posibles aplicaciones	57
1.3.5 Conclusiones	58
1.4 BIBLIOGRAFÍA	58

2. OBTENCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE DOS ANTICUERPOS MONOCLONALES FRENTE A DOS MIEMBROS DE LA SUBFAMILIA DE LAS β_2 INTEGRINAS PORCINAS.....	63
2.1 INTRODUCCIÓN	63
2.2 RESULTADOS	67
2.2.1 Selección y determinación del isotipo de los anticuerpos GP2B7 y GP3D10	67
2.2.2 Distribución celular	67
2.2.3 Reactividad cruzada.....	68
2.2.4 Caracterización bioquímica	68
2.2.5 Mapeo epitópico	70
2.3 DISCUSIÓN.....	72
2.3.1 Distribución celular y caracterización bioquímica	72
2.3.2 Reactividad cruzada.....	73
2.3.3 Mapeo epitópico	73
2.3.4 Posibles aplicaciones	74
2.3.5 Conclusiones.....	75
2.4 BIBLIOGRAFÍA	76
3. OBTENCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE CUATRO ANTICUERPOS MONOCLONALES FRENTE A LA INTEGRINA β_1 PORCINA (CD29).....	81
3.1 INTRODUCCIÓN	81
3.2 ANTICUERPO MONOCLONAL GP4B4.....	85
3.2.1 Resultados.....	85
3.2.1.1 Selección y determinación del isotipo.....	85
3.2.1.2 Distribución celular	85
3.2.1.3 Reactividad cruzada.....	87
3.2.1.4 Caracterización bioquímica.....	87
3.2.2 Discusión	88
3.2.2.1 Distribución celular y caracterización bioquímica.....	88
3.2.2.2 Reactividad cruzada.....	90
3.3 ANTICUERPOS MONOCLONALES GP1A5, GP1A6 Y GP4A1	91
3.3.1 Resultados.....	91
3.3.1.1 Obtención de anticuerpos monoclonales	91
3.3.1.2 Citometría intracelular en PBMC	92
3.3.1.3 Estudio de la expresión de la β_1 integrina en tejidos porcinos	92
3.3.2 Discusión	103
3.3.2.1 Obtención de los anticuerpos	103
3.3.2.2 Selección de los hibridomas	103
3.3.2.3 Citometría intracelular en PBMC	104
3.3.2.4 Estudio de la expresión de la β_1 integrina en tejidos porcinos	104
3.4 APLICACIONES Y CONCLUSIONES	106
3.4.1 Posibles aplicaciones	106
3.4.2 Conclusiones.....	108
3.5 BIBLIOGRAFÍA	108

4. CARACTERIZACIÓN PARCIAL DE UNA SERIE DE ANTICUERPOS MONOCLONALES FRENTE DIVERSOS ANTÍGENOS PORCINOS NO IDENTIFICADOS	113
4.1 INTRODUCCIÓN	113
4.2 RESULTADOS	113
4.2.1 Selección y determinación del isotipo de los distintos anticuerpos	113
4.2.2 Distribución celular de los antígenos	113
4.2.3 Peso molecular de los antígenos.....	114
4.3 DISCUSIÓN.....	115
4.3.1 Generalidades	115
4.3.2 Anticuerpo GP3F1	116
4.3.3 Anticuerpos GP2D7 y GP4F8	117
4.3.3 Posibles aplicaciones	119
4.3.4 Conclusiones.....	119
4.4 BIBLIOGRAFÍA	119
5. ESTUDIO DE LA EXPRESIÓN DE PRP^C (CD230) EN LEUCOCITOS Y PLAQUETAS PORCINOS MEDIANTE EL EMPLEO DE UN ANTICUERPO MONOCLONAL ESPECÍFICO.....	121
5.1 INTRODUCCIÓN	121
5.2 RESULTADOS	125
5.2.1 Inmunoblotting sobre extracto crudo de cerebro	125
5.2.2 Estudio de la expresión de PrP ^C en leucocitos y plaquetas porcinos.....	126
5.3 DISCUSIÓN.....	126
5.3.1 Reactividad cruzada del anticuerpo 8H4	126
5.3.2 Expresión de PrP ^C en leucocitos y plaquetas porcinos.....	127
5.3.3 Posibles aplicaciones	128
5.3.4 Conclusiones.....	129
5.4 BIBLIOGRAFÍA	129
CONCLUSIONES	133
APÉNDICES	135
A. TAMPONES Y SOLUCIONES	135
A.1 Uso general	135
A.2 Inmunoensayos y citometría de flujo.....	135
A.3 Electroforesis y electrotransferencia.....	136
A.4 Tinción y decoloración de geles de poliacrilamida	136
A.5 Obtención de proteína recombinante	136
B. MEDIOS DE CULTIVO	136
C. PROCEDIMIENTOS BÁSICOS	137
C.1 Congelación de células	137
C.2 Descongelación de células	137
C.3 Preparación de geles de poliacrilamida de gradiente 15%-5%.....	137
C.4 Preparación de geles de poliacrilamida al 10%	138

INTRODUCCIÓN

Antígenos de diferenciación

La membrana citoplasmática de las células que forman los tejidos de los vertebrados está compuesta por una bicapa lipídica en la que se encuentran ancladas gran cantidad de proteínas que son imprescindibles para el buen desarrollo de las funciones de dicha membrana. Entre estas funciones destaca la de mantener la forma y la integridad celular, pero también permitir a la célula la recepción de información del medio que las rodea y responder adecuadamente a dichos estímulos. Estos componentes de la membrana citoplasmática median en la interacción con otros tipos celulares, permitiendo la comunicación de unas células con otras, lo que es de esencial importancia para la coordinación e integración de la respuesta inmune y el crecimiento y diferenciación celular. También pueden desempeñar funciones relacionadas con la locomoción y el metabolismo celular.

Una de los principios fundamentales del sistema inmunitario es el hecho de que la respuesta celular está mediada por procesos de reconocimiento, para los que son imprescindibles diversas moléculas insertadas en la membrana citoplasmática. Estas moléculas tienen, en general, capacidad de difundirse por la superficie celular e interactuar con otras moléculas presentes en el medio que rodea a la célula, sean moléculas solubles o que están unidas a otras células o a la matriz extracelular. A estas moléculas implicadas en los procesos de reconocimiento se les suele dar el nombre de receptores, mientras que las moléculas complementarias se denominan ligandos. Esta clasificación, sin embargo, puede en ocasiones resultar arbitraria, puesto que un receptor puede a veces funcionar como ligando de otro receptor y viceversa.

Este contacto receptor-ligando suele tener lugar de manera específica, dado que intervienen factores de complementariedad molecular y de afinidad físico-química relacionados con el tamaño, la forma y la carga de ambas moléculas. Esta interacción específica conduce normalmente a la transmisión de una determinada señal dentro de la célula o, si ambas moléculas son proteínas de membrana, a la comunicación de una célula con la otra. En el sistema inmunitario de los vertebrados las células que median en los

procesos de reconocimiento son usualmente leucocitos de distintos tipos, que con este fin presentan en su superficie gran cantidad de receptores celulares.

Las proteínas de superficie de las células de un organismo tienen capacidad inmunógena si se ponen en contacto con otro organismo y por ello también se denominan antígenos de superficie. Puesto que dichas proteínas son necesarias para que las distintas poblaciones celulares que conforman un organismo desempeñen las funciones que les son propias, podemos inferir que la superficie de las células refleja su estado de diferenciación y que células que siguen distintas rutas de diferenciación o que desempeñan funciones diferentes tienen distintos fenotipos de superficie. Basándose en esta idea las proteínas de superficie celular también son denominadas antígenos de diferenciación.

Como acabamos de ver, los antígenos de diferenciación presentan en general una distribución diferente según las funciones o el grado de diferenciación de cada tipo celular y precisamente por esto el estudio de los antígenos celulares es interesante desde el punto de vista inmunológico. Uno de los principales intereses de la Inmunología es el conocimiento preciso de los componentes del sistema inmune, sus propiedades y funciones y sus interrelaciones a escala molecular, puesto que medida que se van conociendo las funciones de los distintos antígenos de superficie se comprenden las relaciones entre las células que los expresan, fundamentalmente leucocitos. Este conocimiento permite la clasificación, definición funcional e identificación precisa de cada clase de leucocito, puesto que expresa un único repertorio de moléculas de membrana que la diferencia del resto de tipos de leucocitos.

Nomenclatura CD

El estudio de la estructura y función de las moléculas implicadas en el crecimiento y la diferenciación celulares es de capital importancia para la Biología moderna. Muchos de estos marcadores celulares son reconocidos por anticuerpos monoclonales específicos y se ha desarrollado una nomenclatura en la que el término CD (cluster de diferenciación) se refiera a grupos (clusters) de anticuerpos monoclonales que se unen específicamente a una molécula en particular. Este sistema de identificación tiene su origen en el análisis de anticuerpos monoclonales contra antígenos leucocitarios humanos. El desarrollo de la tecnología para la obtención de anticuerpos monoclonales a mediados de los años 70

supuso una revolución en el estudio de los antígenos de diferenciación leucocitarios humanos. Esto condujo a la obtención e identificación de gran cantidad de anticuerpos monoclonales que reconocían antígenos de superficie cuya caracterización, sin embargo, era deficiente debido a la falta de coordinación entre los hallazgos de distintos laboratorios. Pronto quedó claro que la colaboración y la recopilación de información entre los distintos laboratorios eran imprescindibles para un óptimo progreso en este campo.

Con este fin se organizaron los workshops de antígenos de diferenciación leucocitarios humanos, de los que hasta el momento se han celebrado siete. Su función es la identificación, definición funcional y ordenación de las moléculas de la superficie celular de los leucocitos. Para ello se emplean los numerosos anticuerpos monoclonales existentes, con los que se intenta definir la distribución celular y el peso molecular de los antígenos por ellos reconocidos, caracterizarlos funcionalmente y en última instancia purificarlos y clonarlos. Los anticuerpos con similares características se agrupan y se les asigna un determinado CD. La denominación CD se empleaba en origen para designar a los distintos anticuerpos que reconocían el mismo antígenos, pero actualmente se prefiere hablar de anticuerpos anti-CD, reservando el término CD para la molécula que reconocen.

Actualmente, tras el último workshop, cuya conferencia se celebró en Harrogate (Reino Unido) en junio de 2000, hay descritas un total de 394 estructuras asignadas a 247 CD humanos. Los CDw son clusters provisionales que serán objeto de un análisis más detallado en subsiguientes workshops. La conferencia del VIII workshop de antígenos de diferenciación leucocitarios humanos se celebrará en Adelaida (Australia) en 2004

La nomenclatura CD también se emplea para definir moléculas homólogas en distintas especies. Moléculas homólogas son aquellas que han conservado a lo largo de la evolución algunas de las características que las definen, como puede ser su secuencia de aminoácidos, su estructura o su función. Obviamente, pueden existir diferencias entre las distintas especies debido a la divergencia evolutiva.

Funciones de los antígenos CD

Las funciones fisiológicas que desempeñan los antígenos CD son muy variadas (tabla 1) y su determinación suele entrañar cierta dificultad, pudiendo requerir complejos ensayos incluso en el caso de que conozcamos las características bioquímicas de la

molécula en cuestión. La función individual de un antígeno de superficie celular viene generalmente definida por una interacción receptor-ligando, en la que los ligandos pueden ser moléculas solubles, otros antígenos de superficie, componentes de la matriz extracelular e incluso proteínas víricas.

Funciones	CDs representativos
Interacción con moléculas de histocompatibilidad MHC clase I	CD3-TCR, CD8
Interacción con moléculas de histocompatibilidad MHC clase II	CD3-TCR, CD4, CD74
Actividad enzimática	CD10, CD13, CD26, CD73
Receptores de ligandos solubles (inmunoglobulinas)	CD16, CD64
Receptores de ligandos solubles (moléculas de complemento)	CD11c/CD18, CD21, CD35
Receptor de ligandos solubles (Interleucina-2)	CD25
Estructuras de adhesión	CD41/CD61, CD11a/CD18, CD29, CD42a/CD42b
Transducción de señales	CD95, CD77, CD28, CD80, CD20
"Receptores virales"	CD4, CD21, CD54, CD46

Tabla 1. Ejemplos de funciones desempeñadas por algunos antígenos CD.

En muchos casos las funciones biológicas de la membrana citoplasmática no están relacionadas con antígenos CD individuales, sino que dependen de la interacción de múltiples componentes, tanto de la membrana citoplasmática como intra y extracelulares. Desde este punto de vista, se puede considerar cada molécula CD como un módulo estructural y funcional que puede estar presente en distintos tipos celulares e intervenir en distintos circuitos biológicos para desempeñar funciones diversas. Según este modelo, mecanismos moleculares diferentes podrían tener funciones similares.

Estructura de los antígenos de diferenciación

Las proteínas de la superficie de los leucocitos son, en su mayor parte, proteínas integrales transmembrana (TM), lo que quiere decir que atraviesan la bicapa lipídica a

través de una o varias porciones hidrofóbicas de residuos de aminoácidos, aunque también existen otros tipos de asociaciones. Otra de las características estructurales de los antígenos leucocitarios es la presencia en sus secuencias de aminoácidos de segmentos homólogos a los de otras proteínas. Por otra parte, muchos de los antígenos de membrana se caracterizan por la presencia de carbohidratos, que se pueden unir mediante O y N tanto a los lípidos como las proteínas de membrana. De hecho, un número importante de los antígenos CD son glicoproteínas y, puesto que los glúcidos tienen capacidad inmunógena, algunos CD han sido definidos por anticuerpos que reconocen epítopos glucídicos, como por ejemplo CD52, CD60 o CD76. El nivel de glicosilación de las proteínas de membrana puede variar considerablemente según el tipo celular en que se exprese. Así, CD43 muestra heterogeneidad en su estructura glucídica, y por tanto en su peso molecular, según su expresión en distintas subpoblaciones celulares.

Entre las características estructurales de los antígenos leucocitarios de membrana destacan el tipo de anclaje a la membrana y los dominios estructurales presentes en sus secuencias de aminoácidos.

Tipos de anclaje a la membrana

Anclaje TM de tipo I

Este es el tipo más común de anclaje en las proteínas de superficie de las células eucariotas. Como se observa en la figura 1, las proteínas con anclaje tipo I tienen el extremo carboxilo-terminal en el citoplasma y el amino-terminal fuera de la célula, atravesando una sola vez la bicapa lipídica mediante una secuencia hidrofóbica de unos 25 aminoácidos. Algunos receptores que presentan esta disposición son: CD3, CD4, CD19 y CD21.

Anclaje TM tipo II

Las moléculas que se unen a la membrana con este tipo de anclaje atraviesan una sola vez la bicapa lipídica, pero con una orientación inversa a las que tiene anclaje TM tipo I, con el extremo carboxilo-terminal en el exterior de la célula y el amino-terminal en el citoplasma (Fig.1). Entre los antígenos que presentan este tipo de anclaje se encuentran CD10, CD23, CD26 y CD72.

Anclaje TM tipo III

Esta categoría abarca a las moléculas que atraviesan la bicapa lipídica de la membrana varias veces (Fig. 1), presentando con este fin varias regiones hidrofóbicas en su secuencia de aminoácidos. La mayoría de los receptores leucocitarios que presentan este tipo de anclaje atraviesan la membrana cuatro veces y forman parte de la denominada superfamilia TM4, a la que pertenecen, por ejemplo, CD9, CD81 y CD82. Estas moléculas presentan tanto el extremo carboxilo-terminal como el amino-terminal en el interior de la célula. Existen antígenos, como CD20, que atraviesan la membrana cuatro veces pero cuyas secuencias no están relacionadas con las de la superfamilia TM4. También existen proteínas que atraviesan la bicapa lipídica siete veces y que pertenecen a la superfamilia de la rodopsina. Muchos de ellos son receptores para neurotransmisores.

Anclaje a través de glicosil fosfatidil inositol

Este tipo de asociación a la membrana ocurre a través de un fosfolípido de la propia membrana citoplasmática, el glicosil fosfatidil inositol (GPI), que se une covalentemente al extremo carboxilo-terminal de la secuencia proteica del antígeno (Fig. 1). Este tipo de unión es escindido específicamente por la enzima glicosil fosfatidil inositol fosfolipasa C (PI-PLC), aunque algunas moléculas que presentan este tipo de anclaje son resistentes a la acción de esta enzima. El anclaje a través de GPI permite una mayor movilidad lateral de los antígenos de membrana y la posible asociación con componentes intracelulares. En células polarizadas las proteínas con este tipo de anclaje están restringidas al extremo apical. Entre los antígenos CD que presentan este tipo de anclaje destacan CD14, CD24, CD55 y CD73. Existen CD, como CD16 y CD58, en los que existe procesamiento alternativo, pudiendo estar anclados a la membrana mediante GPI o mediante anclaje tipo TM I.

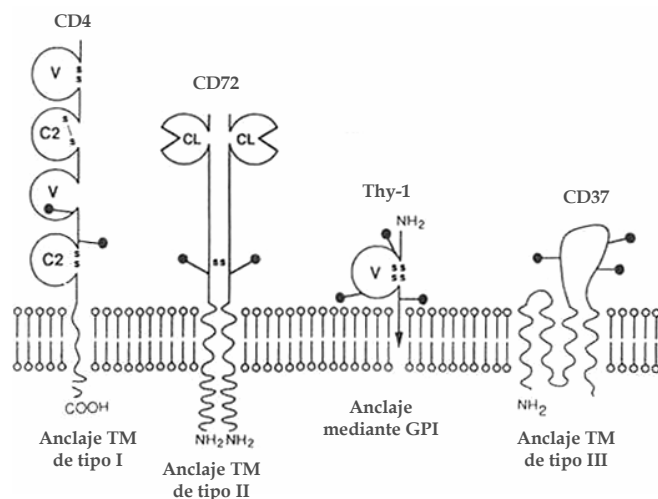


Figura 1. Distintos tipos de anclaje de las moléculas de membrana.

Este tipo de unión es escindido específicamente por la enzima glicosil fosfatidil inositol fosfolipasa C (PI-PLC), aunque algunas moléculas que presentan este tipo de anclaje son resistentes a la acción de esta enzima. El anclaje a través de GPI permite una mayor movilidad lateral de los antígenos de membrana y la posible asociación con componentes intracelulares. En células polarizadas las proteínas con este tipo de anclaje están restringidas al extremo apical. Entre los antígenos CD que presentan este tipo de anclaje destacan CD14, CD24, CD55 y CD73. Existen CD, como CD16 y CD58, en los que existe procesamiento alternativo, pudiendo estar anclados a la membrana mediante GPI o mediante anclaje tipo TM I.

Formas solubles

Algunos receptores de membrana presentan formas solubles. Estas formas pueden ser consecuencia del procesamiento alternativo del ARNm, con modificaciones postraduccionales que conllevan la pérdida del segmento de unión a la membrana, como es el caso de la forma soluble del CD58. En otros casos, las formas solubles tienen su origen en la escisión por proteólisis de los antígenos de membrana, como ocurre con las formas solubles de CD8, CD21, CD23 y CD28. Los receptores anclados por GPI también se pueden escindir por la acción de la enzima PI-PLC y dar lugar a una isoforma soluble. El papel de estas formas solubles no está muy claro, pero podrían intervenir en la transmisión de señales a las células adyacentes.

Dominios y superfamilias

Las secuencias de aminoácidos de la mayoría de las proteínas de membrana de los leucocitos contienen segmentos que presentan similitudes con los de otras proteínas y que probablemente tienen origen en la evolución divergente a partir de un precursor común. Para definir estas relaciones estructurales entre proteínas se introdujeron los términos “superfamilia”, conjunto de proteínas con un 50% o menos de homología en sus secuencias, y “familia”, para las proteínas con una homología superior al 50%. Esta homología en las secuencias se suele localizar en regiones conservadas concretas que definen un dominio o patrón estructural. Una misma proteína puede presentar simultáneamente dominios característicos de distintas superfamilias.

Dominio o superfamilia	CDs representativos
Proteínas de control del complemento	CD21, CD35, CD46
Receptor de citoquinas	CD25, CD17
Factor de crecimiento epidérmico	CD62
Fibronectina tipo III	CD104
Inmunoglobulina	CD96, CD102
Integrinas	CD11, CD18, CD29, CD49
Lectinas tipo C	CD23, CD69, CD72
Rodopsina	CD88
Receptor scavenger	CD5, CD6
Transducción de señales	CD3, CD5
Tetraspanina	CD9, CD37
Tirosina quinasa	CD25
Fosfotirosina quinasa	CD45
MHC	CD1

Tabla 2. Principales superfamilias con ejemplos de CD pertenecientes a ellas.

Algunas de las superfamilias más representativas que presentan los antígenos de diferenciación leucocitarios humanos, con algunos ejemplos de CD pertenecientes a las mismas, se relacionan en la tabla 2.

Técnicas empleadas en el estudio de los antígenos CD

En primer momento, el interés por el estudio de los antígenos de superficie celular surgió del descubrimiento de los grupos sanguíneos y de los antígenos de histocompatibilidad, así como de los antígenos asociados a tumores, dada su relevancia médica en las transfusiones sanguíneas, el trasplante de órganos y la inmunidad tumoral, respectivamente. El descubrimiento de los antígenos de diferenciación supuso un importante impulso para la Inmunología y su estudio ha tenido importantes repercusiones en la Medicina. La aparición de nuevas técnicas serológicas, bioquímicas y genéticas ha llevado a un importante desarrollo de estos estudios, permitiendo obtener una visión de conjunto de la especificidad de los antígenos de membrana en distintos tipos celulares. También el establecimiento de líneas celulares de distintos linajes ha facilitado el estudio de los antígenos de diferenciación. Estas líneas celulares se pueden considerar paneles celulares estándar para el análisis de los antígenos de diferenciación y su mayor homogeneidad permite su empleo en estudios bioquímicos y genéticos.

Mediante el empleo de todas estas técnicas actualmente se tiene un amplio conocimiento de los antígenos de diferenciación de las especies humana y murina y, en menor medida, de otras especies animales. Entre las distintas técnicas empleadas en estos estudios destacan, por su valiosa contribución, el desarrollo de anticuerpos monoclonales, la citometría de flujo y la biología molecular.

Anticuerpos monoclonales

El desarrollo de las técnicas que permiten la obtención de anticuerpos monoclonales específicos ha sido de capital importancia para la Inmunología en general y para el estudio de los antígenos de diferenciación en particular. Tanto es así, que generalmente la caracterización bioquímica de los receptores celulares comienza por la obtención de anticuerpos monoclonales que reconozcan esas proteínas, con el fin de identificar e incluso rescatar las proteínas de la membrana citoplasmática, facilitando su estudio estructural: peso molecular, existencia de puentes disulfuro, estado de glicosilación, etc. Mediante el

empleo de anticuerpos monoclonales también es posible estudiar y definir la distribución celular y tisular de los antígenos que reconocen. Además de su utilidad en la identificación de antígenos, algunos anticuerpos monoclonales pueden ser de utilidad en el estudio de sus funciones. Así, algunos anticuerpos que reconocen antígenos CD pueden modular o interferir en diferentes funciones biológicas, lo que indicarían la implicación de los antígenos por ellos reconocidos en dichos mecanismos. Este tipo de ensayos funcionales también se emplea en la caracterización e identificación de anticuerpos monoclonales o en el análisis de los epítomos que reconocen.

Citometría de flujo

La citometría de flujo es una técnica de gran interés para la Inmunología que ha facilitado enormemente el análisis de la especificidad de los anticuerpos y ha permitido la clasificación de las subpoblaciones leucocitarias en función de los antígenos que expresan. Sus usos principales son el análisis de la presencia relativa de antígenos en la membrana celular (inmunofenotipaje) y la separación de las células de acuerdo con estas propiedades (sorting), aunque también permite la evaluación de determinadas actividades biológicas de la célula, como son la lisis mediada por complemento, la apoptosis, la fagocitosis, etc. La citometría de flujo tiene multitud de aplicaciones en la Inmunología Clínica.

Biología molecular

Algunas técnicas de la Biología Molecular son de gran interés para el estudio de los antígenos CD. Así, por ejemplo, se puede identificar el gen que codifica para un determinado antígeno mediante el rastreo de genotecas con anticuerpos monoclonales o mediante sondas de ADN generadas a partir de segmentos de la secuencia de aminoácidos del antígeno en cuestión. La clonación de este gen permitiría la identificación y secuenciación del antígeno, contribuyendo a su correcta definición, así como la localización cromosómica de estos genes. Una vez clonado el gen, se puede expresar en líneas celulares con el fin de evaluar las distintas reactividades de los anticuerpos frente al antígeno en cuestión. Otra de las aplicaciones de la Biología Molecular en el estudio de los antígenos de diferenciación sería la generación de animales transgénicos o deficientes en un gen determinado (knock-out), en especial ratones, de gran interés en el estudio funcional de los antígenos CD.

El empleo de estas técnicas en la caracterización de antígenos de diferenciación es una alternativa a la producción de anticuerpos monoclonales, especialmente para el estudio de estos antígenos en las especies domésticas. Mediante hibridación de ADN entre especies se podrían clonar antígenos con homología interespecífica para los que no se dispone de anticuerpos o para los que la asignación a un determinado CD plantea problemas.

Aplicaciones clínicas de los anticuerpos frente a antígenos CD

El desarrollo de gran número de anticuerpos monoclonales frente a distintos antígenos CD ha permitido el empleo de los mismos en gran número de estudios de investigación y su puesta a punto en diversas técnicas inmunológicas. Muchos de estos estudios han sido de gran importancia para la Medicina Clínica, poniendo a su disposición anticuerpos monoclonales para su uso en técnicas diagnósticas y también como herramientas terapéuticas.

En las aplicaciones diagnósticas se emplea el anticuerpo monoclonal para evidenciar “in vitro” la presencia, ausencia o abundancia relativa del antígeno que reconoce específicamente. Sin embargo, el papel del anticuerpo como instrumento terapéutico “in vivo” es más complejo, puesto que se basa en la capacidad que tiene el anticuerpo, bajo las condiciones adecuadas, de actuar como ligando del antígeno que reconoce específicamente, pudiendo así modular o interferir en su funciones. Esto abre un amplio abanico de posibilidades, puesto que teóricamente se podría ejercer casi cualquier efecto sobre la fisiología celular recurriendo a los anticuerpos correctos contra los antígenos correctos. Otro mecanismo de actuación de los anticuerpos con finalidad terapéutica es la eliminación física de las células que expresan el antígeno que reconocen mediante activación del complemento.

Entre las aplicaciones más importantes de los anticuerpos frente a antígenos de diferenciación podemos mencionar:

Aplicaciones diagnósticas

Diagnóstico de enfermedades moleculares

Los anticuerpos monoclonales frente a determinados CD son de gran interés para el diagnóstico de trastornos hereditarios asociados a defectos en la expresión o la función de dichos antígenos de diferenciación. Así, para el diagnóstico del síndrome de Bernard-

Soulier, un trastorno de la coagulación, se recurre al uso de anticuerpos anti-CD42, puesto que este síndrome se caracteriza por una expresión defectuosa de este antígeno de diferenciación. Otro ejemplo es la deficiencia de adhesión leucocitaria, para cuyo diagnóstico se emplean anticuerpos frente a las β_2 integrinas. Una mutación puntual en uno de los dominios funcionales del CD61 es responsable de la trombostenia de Glanzmann, un síndrome hereditario que se caracteriza por fallos en la función de adhesión plaquetaria.

Determinación de la actividad biológica

El estudio de los estados de activación celular en distintos tipos celulares, principalmente leucocitos y plaquetas, es de gran interés tanto en investigación como por sus aplicaciones clínicas. Con este fin se emplean anticuerpos monoclonales frente a determinados antígenos de superficie cuya expresión se ve modificada según el estado de activación de la célula. Así, por ejemplo, el antígeno de histocompatibilidad clase II es un marcador de activación en linfocitos T, células NK y macrófagos, la expresión de CD26 en la superficie de los linfocitos T aumenta cuando dichas células están activadas y CD25 es un marcador específico de linfocitos T activados. Para el estudio de la activación plaquetaria se emplean habitualmente anticuerpos anti-CD62p y anti-CD63.

Inmunofenotipaje de leucemias, linfomas e inmunodeficiencias

Para el estudio de leucemias y linfomas se emplean algunos anticuerpos monoclonales que reconocen antígenos presentes en determinadas subpoblaciones leucocitarias y que son una gran ayuda en el diagnóstico, identificación y evaluación de estos trastornos neoplásicos. Entre los principales antígenos estudiados se encuentran: CD1, CD9, CD10, CD14, CD30, CD43, CD45, CD61, CD71, CD72, CD73 y CD85. En determinadas inmunodeficiencias humanas se ha comprobado que existe una deficiencia en la expresión del CD73, mientras que el estudio de la expresión del CD4 tiene interés tanto en el diagnóstico del SIDA como en su evaluación. Anticuerpos frente a CD95 podrían ser de interés en el diagnóstico de diversas enfermedades autoinmunes

Aplicaciones terapéuticas

Inmunosupresión

Una de las principales aplicaciones terapéuticas de los anticuerpos monoclonales ha sido su empleo como inmunosupresores. En el trasplante de órganos se ha recurrido a distintos anticuerpos anti-CD para inhibir el rechazo. Así, por ejemplo, OKT3, un

anticuerpo contra CD3, se emplea para interferir en el rechazo mediado por células T. Su principal ventaja es que no elimina las células T, que siguen circulando pero sin capacidad de atacar los tejidos del órgano trasplantado. Aunque se ha probado en modelos animales la actividad inmunosupresora de anticuerpos frente a CD4, CD25, CD11a/CD18 y otros antígenos de superficie, muy pocos tienen aplicación clínica. Entre los anticuerpos que se usan en la terapia antirrechazo cabe destacar los anti-CD25, cuya actividad se dirige específicamente contra linfocitos T activados.

Los trasplantes de médula ósea representan un caso especial, puesto que en ellos el mayor problema no es el rechazo del tejido trasplantado, sino el ataque de las células inmunes trasplantadas contra los tejidos del receptor (reacción “graft versus host”). Para evitarlo se ha recurrido a diversas tácticas que implican el uso de anticuerpos monoclonales, como la eliminación de las células T del inóculo antes del trasplante o el tratamiento del receptor con anticuerpos con el fin de inhibir la función de las células T. Esta segunda estrategia tiene la ventaja de que permite inhibir tanto el rechazo como la reacción “graft versus host”. Con este fin se ha empleado el anticuerpo CAMPATH-1, dirigido contra CD52.

Terapia tumoral

El control y la erradicación de tumores mediante el uso de anticuerpos tienen una historia mucho más larga que los anticuerpos monoclonales y la nomenclatura CD. Aunque se ha demostrado en modelos animales el éxito de este tipo de tratamientos, hasta ahora su empleo en la especie humana no ha tenido resultados demasiado buenos. Sin embargo, el desarrollo y los ensayos clínicos de nuevos agentes terapéuticos permite augurar un auge de la terapia tumoral con anticuerpos monoclonales.

El reactivo más estudiado en la terapia tumoral es un anticuerpo anti-CD20 que se emplea en el tratamiento de linfomas de células B. Su aplicación clínica está muy extendida, pero sólo es efectivo en el tratamiento de linfomas CD20 positivos. Anticuerpos contra otros marcadores de linfocitos B como CD19 y CD22 han mostrado resultados prometedores en ensayos preclínicos y clínicos.

Interés del cerdo como especie de estudio

La Inmunología Veterinaria tiene como fin la mejora de la salud animal. Por tanto, sus estudios y aplicaciones se han dirigido principalmente a la definición de los agentes patógenos, el estudio de la patogénesis y de los mecanismos de resistencia y también a la prevención y el tratamiento de las enfermedades de los animales domésticos. Para estos estudios es precisa la obtención de reactivos, vacunas y herramientas de diagnóstico apropiados para las distintas especies domésticas, lo que hace necesario el conocimiento del sistema inmune de las distintas especies, teniendo en cuenta las diferencias interespecíficas, y en especial de los antígenos de diferenciación animales, por su importancia en los procesos de reconocimiento inmunológico.

El interés de la especie porcina como objeto de estudio se encuentra, en primer lugar, en su importancia económica en tanto que especie de abasto, puesto que constituye una de las principales fuentes de la alimentación mundial, suponiendo en torno a un 40% de toda la carne que se produce en el mundo. Valgan como ejemplos dos datos: en 2001 se sacrificaron en la Unión Europea más de 200 millones de cerdos para consumo humano (36 millones en España) y en diciembre de ese mismo año el número de cabezas en la UE rondaba los 122 millones (23 millones en España). Debido a esta importancia económica de la cría del cerdo, el estudio del sistema inmune porcino ha estado tradicionalmente enfocado al análisis de la respuesta a los agentes infecciosos y a la obtención de vacunas, dada la importancia de las pérdidas económicas que la incidencia de dichas patologías causa. Se estima que las enfermedades infecciosas y parasitarias suponen en los países desarrollados una disminución del 17% en la facturación del sector ganadero. En la tabla 3 se recogen algunas de las principales enfermedades infecciosas que afectan a esta especie y las medidas de lucha indicadas.

Además del interés económico de su ganadería, el cerdo ha sido a lo largo de los años una de las especies más frecuentemente usadas como modelo experimental de la especie humana, dadas las semejanzas anatómicas y fisiológicas entre ambas especies, así como por la disponibilidad de animales de experimentación. Muchos de estos estudios han tenido importantes aplicaciones en la Medicina, puesto que el cerdo se ha usado como modelo en estudios sobre alcoholismo, alotrasplantes, diabetes, hipertensión, choque séptico, enfermedad renal, etc. La posibilidad de obtener cerdos libres de gérmenes

proporciona un excelente modelo que permite diferenciar las respuestas inmunes innatas de las resultantes de estímulos antigénicos externos.

PATOLOGÍA	AGENTE CAUSAL	MEDIDAS DE LUCHA
Peste porcina africana	Virus PPA	No existen vacunas Medidas sanitarias
Peste porcina clásica	Pestivirus	Vacunación con vacunas atenuadas en zonas enzoóticas Medidas sanitarias
Enfermedad de Aujeszky	Alfavirus (familia Herpesviridae)	Vacunación (vacunas atenuadas, con virus vivo modificado o deficientes en genes) Medidas sanitarias
Síndrome reproductivo y respiratorio porcino	Arterivirus	Vacunación (vacunas atenuadas) Medidas sanitarias
Parvovirus	Parvovirus	Vacunación (vacunas inactivadas) Medidas sanitarias
Gastroenteritis transmisible	Coronavirus	Vacunación (con vacunas atenuadas o inactivadas). Inmunidad pasiva (lechones) Medidas sanitarias
Síndrome de desgaste multisistémico postdestete	Circovirus	No existen vacunas Medidas sanitarias
Neumonía enzoótica	Mycoplasma hyopneumoniae	Antibióterapia (macrólidos) Vacunación (vacunas inactivadas) y quimioprofilaxis Medidas sanitarias
Pleuroneumonía	Actinobacillus pleuropneumoniae	Antibióterapia Vacunación (con serotipo predominante en la zona) y quimioprofilaxis Medidas sanitarias
Rinitis atrófica	Pasteurella multocida Bordetella bronchiseptica	Antibióterapia (poco eficaz) Vacunación y quimioprofilaxis Medidas sanitarias
Salmonelosis	Salmonella spp	Antibióterapia Vacunación (bacterinas) Medidas sanitarias
Colibacilosis	Escherichia coli	Antibióterapia (aminoglucósidos y sulfamidas) Vacunación de las madres (bacterinas) Medidas sanitarias
Estreptococias	Streptococcus spp Enterococcus spp	Antibióterapia (β -lactámicos) Vacunación (autovacunas) Medidas sanitarias
Disentería	Serpulina hyodysenteriae	Antibióterapia Vacunación (vacunas poco efectivas) Medidas sanitarias
Mal rojo	Erysipelothrix rhusiopathiae	Antibióterapia (penicilinas) Vacunación (vacunas muertas y atenuadas) Medidas sanitarias

Tabla 3. Principales enfermedades infecciosas que afectan a la especie porcina.

En los últimos años el interés por el estudio de la Inmunología Porcina se ha visto estimulado por la posibilidad de usar a la especie porcina como donante de órganos para el trasplante a pacientes humanos, el denominado xenotrasplante. Aunque los primates no humanos presentan más semejanzas con la especie humana, su relativa escasez y los gastos e inconvenientes éticos que suponen su cría en cautividad para este tipo de estudios han inclinado la balanza a favor de la especie porcina, y en concreto a los denominados cerdos en miniatura, cuyos órganos son de un tamaño muy similar al de los órganos humanos. Aunque las perspectivas de los xenotrasplantes son muchas e interesantes, los estudios en este campo se han encontrado con obstáculos que han retrasado su definitiva puesta en práctica, como puede ser el problema del rechazo hiperagudo y los riesgos de infección por retrovirus endógenos.

A la hora de estudiar el sistema inmune porcino hay que tener en cuentas las peculiaridades anatómicas y fisiológicas del mismo que lo distinguen de otras especies animales. Entre las peculiaridades anatómicas hay que hablar en primer lugar de la estructura invertida de los nódulos linfáticos, con el córtex en el centro y la médula en la periferia. El tráfico de los linfocitos a través de los nódulos es también distinto al de otras especies. Otro aspecto interesante del sistema inmune porcino es la abundancia de macrófagos intravasculares en el pulmón. En el cerdo, al contrario que en la especie humana y el ratón, hay un número importante de linfocitos T periféricos (cerca de un 20%) que expresan simultáneamente los marcadores CD4 y CD8. También el número de células T nulas es mayor que en otras especies. Otra característica de los linfocitos T porcinos es que expresan el antígeno mayor de histocompatibilidad clase II, mientras que en la especie humana y el ratón sólo se expresa en los linfocitos T activados.

Antígenos leucocitarios porcinos

El progreso de la Inmunología Porcina en los últimos años se ha debido en gran medida al desarrollo de anticuerpos monoclonales contra antígenos leucocitarios porcinos, que han permitido la identificación de componentes celulares implicados en la respuesta inmune, así como estudiar sus funciones, tanto en condiciones normales como patológicas. Los primeros anticuerpos monoclonales frente a marcadores leucocitarios porcinos se desarrollaron en 1984 por Pescovitz y colaboradores. En los años siguientes se obtuvieron

gran número de anticuerpos monoclonales, lo que hizo necesaria la celebración periódica de workshops internacionales sobre antígenos de diferenciación porcinos con el fin de clasificar y estandarizar los distintos anticuerpos producidos. Hasta el momento se han celebrado tres workshops con sus respectivas conferencias, en 1992, 1995 y 1998.

El fin de estos workshops es establecer una nomenclatura CD similar a la utilizada para los antígenos humanos. Un antígeno porcino se considera homólogo de uno humano y es denominado con el mismo CD si cumple dos condiciones: los anticuerpos que lo reconocen tienen un patrón de reactividad similar al de los que reconocen al correspondiente CD humano y el peso molecular para el antígeno porcino es similar al del homólogo humano. Si sólo se cumple la primera de las condiciones, al correspondiente número CD se antepone el prefijo w, para indicar la provisionalidad de la asignación. Si un cluster de anticuerpos presentan un patrón de reactividad característico que no se corresponde con ningún CD humano conocido, se designa SWC (Swine Workshop Cluster) seguido de un número. Los distintos epítomos de un antígeno de diferenciación se designan mediante una letra tras el correspondiente número CD o SWC.

En la tabla 4 se detallan los antígenos de diferenciación porcinos descritos hasta la fecha y los anticuerpos que los reconocen. Tras el último workshop hay definidos un total 38 antígenos de diferenciación porcinos (29 CD y 9 SWC), frente a los cuales se dispone de anticuerpos monoclonales que son de gran utilidad para el estudio de la Inmunología Porcina. En la tabla 5 se puede observar la evolución del número de receptores caracterizados a lo largo de los sucesivos workshops.

No todos los anticuerpos monoclonales frente a antígenos leucocitarios porcinos están recogidos en la tabla 4. Existen muchos otros que no han sido estudiados en los workshops y que reconocen estos u otros receptores. En algunos casos se trata de anticuerpos caracterizados en otras especies con reacción cruzada en cerdo.

CD/SWC	Anticuerpo prototipo	Otros anticuerpos
wCD1	76-7-4	
CD2a	MSA4	MAC80, MAC83, PG168A, 1038h-8-31, PGBL6A, PGBL23A, RPA-2.10, 1038H-5-37
CD3a	BB23-8E6	FY2A11
CD3b	FY2C1	FY1A3
CD3c	FY1H2	
wCD3	STH164	
CD4a	74-12-4	b38c6, 10.2H2, PT90A, STH293, MIL17
CD5a	b53b7	PG71A, PG75A, PG99A, PG114A, PG116A, 1H6/8, BB6-9G12
wCD6	a38b2	PG90A, MIL8
wCD8a	76-2-11	PT36B, PT81B, STH101, UCP1H122, MIL12, PPT20, PPT21
wCD8b	11/295/33	11/122/28, PG93A
wCD8c	PG164A	STH106, SwNL-554.1, PPT23
wCD8d	PPT22	
wCD8e	UCP1H122	
CD11R1	MIL4	TMG 6-5
CD11R2	S-Hc13	
CD11R3	2F4/11	BL3F1, 1030H-3-16, C25
CD14	My4	TÜK4, biG10, biG13, MIL2, CAM36A
CD16	G7	
CD18a	PNK-I	MHM23, H20A, MUC76A
wCD21	IAH-CC51	BB6-11C9, C35, B-ly4
CD25	K231.3B2	
wCD25		PGBL25A, 6E2/12
wCD29		UCP1D2, FW4-101
wCD40		G28.5
wCD44a	Z063	PORC24A, H22A
wCD44	MAC325	BAG40A, BAT31A, 25-32
CD45	K252.1E4	MAC323, 2A5
CD45RA	STH267	FG2F9, 6E3/7, MIL13, PG167A, PG77A, PG96A, PGB78A, 3C3/9, NHT 101
CD45RC	3a56	MAC326, -a2, MIL5, MIL15
wCD46	6D8/8	1C5, 2C11, JM6C11
wCD47		MEM-122, CIKM, MIL18
wCD49d		L25
wCD50		HP2/19
CD61		JM2E5
wCD92		VIM15
wCD93		VIMD2
CD163	2A10/11	
wCD163		SwNL-517.2
SWC1	11/8/1	K263.3D7, MUC13A, PT15A, PT80A, PT91A, PT37A, 11/305/44, 335-2, 76-6-7
SWC2	b30c7	PG124A, STH055
SWC3a	74-22-15	6F3, DH59B
SWC3		BL1H7
SWC4	MAC319	MAC318, PG83A
SWC5	b37c10	PG92A
SWC6	MAC320	
SWC7	IAH-CC55	2F6/8, 2A10/8
SWC8	MIL3	MUC20A, JM7B6
SWC9	PM18-7	C4

Tabla 4. Antígenos descritos en el III Workshop Internacional de Antígenos de Diferenciación Leucocitarios Porcinos y anticuerpos que los reconocen.

	I Workshop (1992)		II Workshop (1995)		III Workshop (1998)	
	Nueva definición	Total	Nueva definición	Total	Nueva definición	Total
CD	11	11	5	16	13	29
SWC	7	7	2	9	0	9
Total	18	18	7	25	13	38

Tabla 5. Evolución del número de antígenos caracterizados en los sucesivos workshops porcinos.

Aplicaciones los anticuerpos frente a antígenos leucocitarios porcinos

Las aplicaciones de los anticuerpos frente a antígenos leucocitarios porcinos son muy diversas. Entre ellas cabe destacar su empleo en la detección de antígenos cuya expresión depende del estado de diferenciación o de activación de la célula. Uno de los objetivos principales de la producción de anticuerpos monoclonales frente a leucocitos porcinos es su interés en la definición de subpoblaciones leucocitarias porcinas. Algunos de estos anticuerpos se han empleado en el estudio de diversas patologías porcinas, como el síndrome de desgaste multisistémico postdestete (PMWS), el síndrome respiratorio y reproductivo (PRRS) o la infección por *Streptococcus suis* tipo2.

El empleo de anticuerpos monoclonales en diversos estudios inmunológicos en la especie porcina ha puesto en evidencia determinadas particularidades que diferencian el sistema inmune del cerdo del de otras especies. La principal de estas peculiaridades es la existencia de una subpoblación de linfocitos T CD4/CD8 doble positivos que no tiene homología en otras especies. También es interesante la distinta distribución celular de los homólogos porcinos del CD11b y CD11c humanos, que ha llevado a la adopción de una nomenclatura propia para los distintos CD11 de la especie porcina. Otra diferencia entre el cerdo y la especie humana es la expresión de CD46 en los eritrocitos y plaquetas porcinos, poblaciones en las que dicho marcador no se expresa en la especie humana.

En los últimos años se ha desarrollado un interés por la especie porcina en cirugía experimental y especialmente como posible donante de órganos para el trasplante a humanos, lo que ha servido de estímulo para la producción de anticuerpos monoclonales

capaces de reconocer a las principales moléculas implicadas en los procesos de rechazo y tolerancia de esos órganos. Algunos de estos anticuerpos podrían ser de utilidad para modular la respuesta inmune y, por tanto, prevenir los rechazos.

Dos son pues las principales demandas de estos reactivos: el mejor conocimiento del sistema inmune porcino como forma de mejora de la sanidad de la especie porcina, con los consiguientes beneficios económicos; y la obtención de reactivos específicos del sistema inmune porcino para su empleo en diferentes ensayos en los que el cerdo es un modelo para la sanidad humana.

A pesar del gran progreso de la Inmunología Porcina en estos últimos años, el número de antígenos leucocitarios caracterizados en esta especie sigue siendo muy inferior a los caracterizados en la especie humana, por lo que sigue existiendo demanda de anticuerpos monoclonales que definan nuevos antígenos o que ayuden a la completa caracterización de los ya definidos, sobre todo si tenemos en cuenta que el número de laboratorios dedicados a la producción de estos reactivos se ha estancado en los últimos años.

Esta demanda justifica el fin de este trabajo, que es la obtención y caracterización de anticuerpos monoclonales frente a antígenos leucocitarios porcinos. Se persigue la obtención de herramientas para su empleo en estudios en el campo de la Inmunología Porcina, con el fin de describir nuevos receptores leucocitarios porcinos y de estudiar sus posibles aplicaciones prácticas en el campo de la Sanidad Animal.

Objetivos

Este estudio tiene como fin contribuir al conocimiento de los antígenos de diferenciación porcinos mediante el desarrollo de anticuerpos monoclonales y la posterior caracterización de los antígenos que reconocen, haciendo especial hincapié en las posibles aplicaciones de estos y otros anticuerpos frente a antígenos de diferenciación porcinos.

Por tanto, en la realización de este trabajo se plantearon los siguientes objetivos:

1. Obtención de una batería de anticuerpos monoclonales frente a distintos antígenos leucocitarios porcinos.
2. Análisis y caracterización de los diferentes antígenos reconocidos por estos anticuerpos monoclonales, mediante técnicas bioquímicas e inmunológicas.

3. Asignación de los antígenos caracterizados a su correspondiente CD homólogo porcino, con referencia a las propiedades y características de los antígenos CD humanos.

4. Estudiar las posibles aplicaciones de los anticuerpos obtenidos, así como de otros que se estimen de interés, principalmente en sus aspectos clínicos, de investigación y como herramientas de estudio de determinados estados patológicos porcinos.

Bibliografía

- Adelsman MA, Shimizu Y, 1998. Adhesión molecules. En Roitt IM, Delves PJ Encyclopedia of Immunology, Academic Press, Oxford, RU.
- Barclay AN, Brown MH, Law SKA, McKnight AJ, Tomlinson MG, Van der Merwe PA, 1997. The Leucocyte Antigen Facts Book, Academic Press, Oxford, RU.
- Bishop S, de Jong M, Gray D, 2001. Opportunities for incorporating genetic elements into the management of farm animal diseases: policy issues. Commission on Genetic Resources for Food and Agriculture.
- Bullido R, Doménech N, Gómez DM, Alonso F, Ezquerro A, Domínguez J, 1999. Monoclonal antibodies 2F6/8 and 2A10/8 recognise a porcine antigen (SWC7) expressed on B-cells and activated T-cells. J. Immunol. Methods 222: 1-11.
- Chamorro S, Revilla C, Álvarez B, López L, Ezquerro A, Domínguez J, 2000. Phenotypic characterization of monocyte subpopulations in the pig. Immunobiology 202: 82-93.
- Charley B, Wilkie BN, 1994. Why Study the Immunology of Domestic Animals? The Immunologist 2/3: 103-105.
- Domínguez J, Álvarez B, Alonso F, Thacker E, Haverson K, McCullough K, Summerfield A, Ezquerro A, 2001. Workshop studies on monoclonal antibodies in the myeloid panel with CD11 specificity. Vet Immunol Immunopathol 80: 111-119.
- Fujiwara, H., Ueda, M., Fukuoka, M., Yasuda, K., Imai, K., Takakura, K., Kanzaki, H., Suginami, H., Mori, T., Maeda, M., 1994. A new monoclonal antibody (POG-1) detects a differentiation antigen of porcine granulosa and thecal cells and indicates heterogeneity of thecal-stromal cells. Endocrinology, 134: 1132-1138.
- Haverson K, Saalmuller A, Álvarez B, Alonso F, Bailey M, Bianchi AT, Boersma WJ, Chen Z, Davis WC, Domínguez J, Engelhardt H, Ezquerro A, Grosmaire LS, Hamilton MJ, Hollemweguer E, Huang CA, Khanna KV, Kuebart G, Lackovic G, Ledbetter JA, Lee R, Llanes D, Lunney JK, McCullough KC, Molitor T, Nielsen J, Niewold TA, Pescovitz MD, de la Lastra JM, Rehakova Z, Salmon H, Schnitzlein WM, Seebach J, Simon A, Sinkora J, Sinkora M, Stokes CR, Summerfield A, Sver L, Thacker E, Valpotic I, Yang H, Zuckermann FA, Zwart R, 2001. Overview of the Third International Workshop on Swine Leukocyte Differentiation Antigens. Vet Immunol Immunopathol 80: 5-23.
- Hildreth JE, Holt V, August JT, Pescovitz MD, 1989. Monoclonal antibodies against porcine LFA-1: species cross-reactivity and functional effects of beta-subunit-specific antibodies. Mol Immunol 26: 883-95.

- Kishimoto T, Kikutani H, von dem Borne AEG, Goyert SM et al. (Eds), 1997. Leucocyte Typing VI. Garland Publishing. New York & London.
- Lunney JK, Walker K, Goldman T, Aasted B, Bianchi A, Binns R, Licence S, Bischof R, Brandon M, Blecha F, 1994. Overview of the First International Workshop to Define Swine Leukocyte Cluster of Differentiation (CD) Antigens. *Vet Immunol Immunopathol* 43: 193-206.
- Lunney JK, Fossum C, Alm GV, Steinbach F, Watrang E, 2002. Veterinary immunology: opportunities and challenges. *Trends Immunol* 23: 4-6.
- Mason D, André P, Bensussan A, Buckley C, Civin C et al. (Eds), 2002. Leucocyte Typing VII. Oxford University Press. New York.
- Pastoret PP, Griebel P, Bazin H, Govaerts A, 1998. Immunology of the pig. En *Handbook of vertebrate immunology*, Academic Press, Oxford, RU.
- Rettig WJ, 1998. Antigens, Cell surface. En Roitt IM, Delves PJ (Eds) *Encyclopedia of Immunology*, Academic Press, Oxford, RU.
- Saalmüller A, Reddehase MJ, Buhring HJ, Jonjic S, Koszinowski UH, 1987. Simultaneous expression of CD4 and CD8 antigens by a substantial proportion of resting porcine T lymphocytes. *Eur J Immunol*, 17: 1297-1301.
- Saalmüller A, 1996. Characterization of swine leukocyte differentiation antigens. *Immunol Today* 17: 352-354.
- Sachs DH, 1994. The pig as a potential xenograft donor. *Vet Immunol Immunopathol*, 43: 185-191.
- Salles MW, Pérez Casal J, Willson P, Middleton DM, 2002. Changes in the leukocyte subpopulations of the palatine tonsillar crypt epithelium of pigs in response to *Streptococcus suis* type 2 infection. *Vet Immunol Immunopathol*, 87: 51-63.
- Segales J, Alonso F, Rosell C, Pastor J, Chianini F, Campos E, Lopez_Fuertes L, Quintana J, Rodríguez Arriola G, Calsamiglia M, Pujols J, Domínguez J, Domingo M, 2001. Changes in peripheral blood leukocyte populations in pigs with natural postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS). *Vet Immunol Immunopathol*, 81: 37-44.
- Shimizu M, Yamada S, Kawashima K, Ohashi S, Shimizu S, Ogawa T, 1996. Changes of lymphocyte subpopulations in pigs infected with porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus. *Vet Immunol Immunopathol*, 50: 19-27.
- Stockinger H, Majdic O, Knapp W, 1998. CD antigens. En Roitt IM, Delves PJ (Eds) *Encyclopedia of Immunology*, Academic Press, Oxford, RU.
- Van den Berg CW, Perez de la Lastra JM, Llanes D, Morgan BP, 1997. Purification and characterization of the pig analogue of human membrane cofactor protein (CD46/MCP). *J Immunol* 158(4): 1703.
- Zola H, 2001. Human leukocyte differentiation antigens as therapeutic targets: the CD molecules and CD antibodies. *Expert Opin Biol Ther* 1:3 375-383.

MATERIAL Y MÉTODOS

Animales, órganos y células

Animales

Como donantes de sangre y órganos se emplearon cerdos Landrace de aproximadamente 5-6 meses de edad sacrificados en el matadero. Las muestras de órganos para inmunohistoquímica provenían de un cerdo de raza Yucatán Minipig de aproximadamente 10 meses de edad sacrificado en matadero y que no presentaba síntomas clínicos ni lesiones macroscópicas de enfermedades infecciosas o parasitarias.

Para los estudios de reacción cruzada se obtuvo sangre de individuos sanos de las especies caprina, ovina, bovina y humana.

Los ratones empleados para generación de hibridomas y la producción de fluido ascítico fueron hembras de la estirpe BALB/c, de unas 6 semanas de edad.

Sangre

La sangre de cerdo se obtuvo en el momento del sacrificio. Se recogió en frascos sobre un 20% del volumen final de una solución de citrato trisódico (Panreac) al 4% en agua destilada como anticoagulante.

La sangre de vaca se obtuvo de individuos sacrificados en el matadero, de un modo similar al descrito para la sangre de cerdo.

La sangre de oveja y cabra se extrajo de animales del Centro de Fomento Pecuario (Diputación Provincial de Córdoba) por punción de la vena yugular y se recogió en tubos tipo Vacutainer (Becton Dickinson) de 4,5 ml con citrato sódico 0,129 M y silicona en una proporción 1/10.

La sangre humana se extrajo de voluntarios por punción venosa y se recogió en tubos tipo Vacutainer de 4,5 ml con citrato sódico 0,129 M y silicona en una proporción 1/10.

PBMC

La sangre se depositó en tubos de 50 ml sobre 12-15 ml de una solución de ficoll-amidotrizoato sódico de densidad 1,08 gr/cm³ (apéndice A.1) y centrifugada a 3.000 rpm

durante 30 minutos en centrífuga Heraeus-Sepatech Megafuge 1.0 (Heraeus Instruments). Seguidamente se recogió con una pipeta Pasteur el halo situado en la interfase entre el ficoll y el plasma, donde se encuentran los leucocitos mononucleares (PBMC). Se lavaron los leucocitos tres veces centrifugando a 1.500 rpm durante 8 minutos, reservando el sobrenadante. En aquellos casos en que después del primer lavado se observaron eritrocitos residuales, se trataron con solución de lisis (apéndice A.1) durante 5 minutos a temperatura ambiente. Tras centrifugar de nuevo, los leucocitos se resuspendieron en 1 ml de PBS (apéndice A.1) y se contaron en el hemocitómetro de Neubauer, usando solución de eosina (apéndice A.1) para determinar la viabilidad de los PBMC obtenidos.

Plaquetas

Las plaquetas se obtuvieron centrifugando el sobrenadante obtenido del lavado de los PBMC a 3.000 rpm durante 8 minutos. Se resuspendieron en 1 ml de PBS y se contaron en el hemocitómetro de Neubauer.

Macrófagos alveolares

Los macrófagos alveolares se recogieron por lavado broncoalveolar, siguiendo el protocolo descrito por Carrascosa y colaboradores (1982).

Esplenocitos y timocitos

Los esplenocitos y timocitos se obtuvieron mediante perfusión de bazo y timo porcino, respectivamente, con PBS.

Esplenocitos de ratón

Se emplearon ratones de la cepa BALB/c de aproximadamente tres meses de edad al final del proceso de inmunización que se sacrificaron por dislocación cervical. Una vez empapados en etanol (Panreac), se les practicó una abertura en la región abdominal y se les extrajo el bazo. Este se depositó en medio HY (apéndice B), con el que se perfundió repetidamente para liberar los esplenocitos. Posteriormente se presionó el órgano con un émbolo de jeringa estéril hasta disgregar el órgano. Tras retirar los restos de estroma la suspensión celular se centrifugó a 1.000 rpm durante 5 minutos. Los esplenocitos se volvieron a lavar con medio HY y finalmente se resuspendieron en 1 ml de dicho medio.

Células de mieloma

La línea de células utilizadas para la fusión fue la Sp2/O-Ag14 (Shulman et al., 1978). Las células, conservadas en nitrógeno líquido, fueron descongeladas 10 días antes de realizar la fusión como se describe en el apéndice C.2 y cultivadas hasta alcanzar el estado de confluencia.

Órganos

Las muestras de órganos utilizadas en los estudios inmunohistoquímicos procedían del archivo del Servicio de Diagnóstico del Departamento de Anatomía y Anatomía Patológica Comparadas de la Universidad de Córdoba. En nuestros estudios se emplearon muestras de ganglio linfático, bazo, médula ósea, timo, glándula salivar palatina, intestino delgado, piel y pulmón.

Los cerebros de cerdo utilizados para la obtención de extracto crudo de cerebro procedían de animales sanos sacrificados en el matadero. Los cerebros de caprino fueron facilitados por el Departamento de Anatomía y Anatomía Patológica Comparadas de la Facultad de Veterinaria de la Universidad de Córdoba y procedían de cabras de la sala de necropsias que no presentaban lesiones encefálicas. Los órganos se recogieron en tampón fosfato (apéndice A.1) para su posterior procesamiento.

Extracto crudo de cerebro

El cerebro debidamente troceado se recogió en cuatro veces su peso de tampón fosfato con PMSF (Sigma) a concentración 2 mM como inhibidor de proteasas y se sometió a un proceso de homogeneización por medios mecánicos. La papilla resultante se filtró a través de una gasa con el fin de eliminar los grandes fragmentos de tejido conjuntivo. El filtrado obtenido se repartió en varios tubos Falcon y se centrifugó a 4.000 rpm durante 5 minutos en megacentrífuga Beckman J2-21 (Beckman). Se recogió el sobrenadante en tubos Falcon y se centrifugó a 7.000 rpm durante 10 minutos. Este proceso (recogida del sobrenadante en tubos Falcon y posterior centrifugación) se repitió dos veces más, centrifugando durante 30 minutos a 19.000 rpm cada vez. El sobrenadante producto de la última centrifugación se recogió nuevamente en tubos Falcon (35 ml por tubo) y se procedió a su congelación a -80°C hasta su uso.

Anticuerpos y proteínas

Anticuerpos monoclonales

Los anticuerpos frente a marcadores leucocitarios porcinos utilizados en las citometrías con dos flurocromos vienen recogidos en la tabla 6. También se empleó un anticuerpo comercial frente a CD49f humano (Pharmingen) con reacción cruzada con cerdo.

CD	AcMo	Referencias
CD3	BB23-8E	Pescovitz et al. 1998a
CD4	74-12-4	Pescovitz et al. 1984; 1994
CD5	1H6/8	Pescovitz et al., 1998b
CD8	76-2-11	Pescovitz et al. 1984; Saalmüller et al. 1994a
CD18	BA3H2	Álvarez et al. 2000a
SWC3	BA1C11	Álvarez et al. 2000b
α -cadenas ligeras porcinas	K139 3E1	Denham et al. 1998

Tabla 6. Anticuerpos monoclonales empleados en las citometrías con dos flurocromos.

Proteína recombinante CD29R

La proteína recombinante CD29R se obtuvo a partir de un cultivo de bacterias de la estirpe BL21 (DE3) de *E. coli* transformadas con una secuencia nucleotídica de 700 pares de bases homóloga a una región del dominio extracelular de la integrina β_1 humana que contiene el dominio de unión al ligando (Jiménez Marín, 2002). Las bacterias transformadas se cultivaron a 37°C en medio LB con kanamicina (apéndice A.5) hasta alcanzar una densidad óptica adecuada (0,6 a 600 nm), añadiendo entonces IPTG (Boehringer) hasta una concentración 1 mM como inductor de la expresión de la proteína recombinante. El cultivo se mantuvo a 37°C y en agitación durante 4 horas y tras ello, se centrifugó a 4°C durante 20 minutos a 6.000 rpm en megacentrífuga Beckman J2-21, se eliminó el sobrenadante y se resuspendió en 5 ml/g de tampón de lisis de urea a pH 8 (apéndice A.5). Se dejó incubar de 60 a 90 minutos a temperatura ambiente mezclando cuidadosamente y se añadió lisozima (Roche) hasta una concentración de 1 mg/ml, incubando 30 minutos a 0°C hasta completar la lisis celular, que se evidenció porque el cultivo se volvió traslúcido. Se pasó el lisado por una aguja fina para acabar de romper las

células y se centrifugó a 10.000 rpm para eliminar los restos celulares, conservando el sobrenadante a 4°C hasta la purificación.

Para purificar la proteína recombinante se aprovechó la afinidad de la cola de histidina de la misma por los iones Ni^{2+} de la resina Ni-NTA (Quiagen) contenida en una columna de afinidad. Para ello, 1 ml de esta resina equilibrada con tampón de lisis de urea a pH 8 se incubó con 4 ml de sobrenadante en agitación suave durante 60 minutos a temperatura ambiente y se dispuso en una columna de 1,6 cm de diámetro. Los distintos lavados de la columna se llevaron a cabo con tampones de lavado de pH decreciente (apéndice A.5) y la elución se hizo con un tampón a pH 4,5. Se recogieron distintas fracciones de elución cuyo contenido aproximado en proteína recombinante se estimó midiendo sus absorbancias a 280 nm en un espectrofotómetro SmartSpec 3000 (Bio-Rad).

Tampones y soluciones

Véase apéndice A.

Producción de hibridomas

Inmunización con PBMC

Unos 10^7 leucocitos de cerdo (PBMC) por ratón se inyectaron intraperitonealmente a dos hembras de ratones de la estirpe BALB/c de unas 6 semanas de edad en tres ocasiones, en días 0, 30 y 45. Una semana después se hizo una última inyección y tres días más tarde se llevó a cabo la fusión.

Inmunización con proteína recombinante CD29R

Los ratones se inmunizaron mediante inyección intraperitoneal de aproximadamente 10 μg de la proteína recombinante CD29R en los días 0, 30 y 45. Una semana después se hizo una última inyección y tres días más tarde se llevó a cabo la fusión. En la primera inmunización la proteína recombinante se administró homogeneizada con adyuvante completo de Freund (Difco), mientras que en todas las demás inmunizaciones se homogeneizó con adyuvante incompleto de Freund (Difco).

Fusión celular

Los esplenocitos procedentes del bazo del ratón inmunizado se añadieron a las células de mieloma en tubo de centrífuga de 50 ml en una proporción de 2 esplenocitos por cada célula de mieloma, completando el tubo con medio HY y centrifugando las células a 1.000 rpm durante 5 minutos. Previamente se prepararon 2,5 ml de una solución al 80% (w/v) de polietilenglicol (PEG) 4000 (Merck) disuelto en medio en medio HY y calentado a 65°C. Esta solución fue esterilizada por filtración y se tomó 1 ml de la misma, al que se añadieron 0,4 ml de DMSO (Merck), y se mantuvo a 37°C hasta su uso. Esta solución se depositó gota a gota sobre los esplenocitos y las células de mieloma, procurando que las gotas disgregaran el pellet. Seguidamente se agitó el tubo suavemente para terminar de resuspender las células y se dejaron reposar 2 minutos. A continuación se añadió sobre las células el medio HY como sigue: 2 ml durante 2 minutos, 8 ml durante 2 minutos y, finalmente, 40 ml durante 5 minutos. Tras dejar reposar las células 10 minutos se centrifugaron a 1.000 rpm durante 5 minutos, se resuspendieron de nuevo en medio HY y se volvieron a centrifugar. Finalmente las células se resuspendieron en el volumen adecuado de medio suplementado (apéndice B) para depositar entre 100.000 y 200.000 células por pocillo de una placa de cultivo p96 (Greiner) con un volumen de 100 µl por pocillo. Al día siguiente se añadieron 100 µl por pocillo de medio selectivo HAT (apéndice B). Una semana más tarde se sustituyó todo el medio de cultivo por medio selectivo HAT.

ELISA indirecto

Mediante este procedimiento se detectaron los clones positivos frente al inmunógeno empleado en la fusión de que procedían, eliminando los que resultaron negativos.

En una placa microtest p96 (Greiner) se añadieron 100 µl por pocillo de una suspensión celular que contenía aproximadamente 10^6 PBMC/ml. Se centrifugó la placa a 3.000 rpm durante 10 minutos y se añadieron 100 µl por pocillo de glutaraldehído grado II (Sigma) al 0,5% en PBS. Tras incubar 15 minutos a temperatura ambiente las placas se lavaron dos veces con PBS y se llenaron los pocillos con 100 µl de solución de bloqueo (apéndice A.2) incubando al menos media hora a temperatura ambiente.

Si los clones a testar provenían de la fusión llevada a cabo con el ratón inmunizado con CD29R, se depositaron unos 500 ng por pocillo de la proteína recombinante CD29R diluida en PBS y se dejó incubar a 4°C toda la noche, tras lo cual se llenaron los pocillos con 100 µl de solución de bloqueo incubando al menos media hora a temperatura ambiente.

Tras bloquear los sitios de unión inespecíficos se retiró el líquido de los pocillos y se lavaron dos veces con PBS. Se añadieron entonces 100 µl por pocillo de sobrenadante de los hibridomas o PBS como control negativo y se dejaron incubar durante una hora a 37°C. Como control positivo se empleó el suero diluido de la sangre del ratón inmunizado. Tras la incubación con los sobrenadantes se lavó la placa dos veces con PBST (apéndice A.1) y se añadieron 50 µl por pocillo de una solución 1/300 de anticuerpo anti-inmunoglobulina de ratón conjugado con peroxidasa (Sigma) en PBS y se incubó durante una hora a 37°C.

Tras volver a lavar dos veces con PBST se añadieron 100 µl por pocillo de una solución reveladora de ELISA (apéndice A.2). Transcurridos de 5 a 20 minutos se detuvo la reacción añadiendo 100 µl de NaF (Panreac) 0,5M en PBS y se evaluó la reacción midiendo la absorbancia a 415 nm en un espectrofotómetro Microplate Reader Model 550 (Bio-Rad).

Clonación de los hibridomas

La clonación de los hibridomas seleccionados se efectuó por el método de la dilución límite. Este procedimiento tiene como fin que cada hibridoma seleccionado proceda de la una sola célula y que todas las células que lo conforman sean idénticas entre sí. Para ello se contaron las células de una suspensión de hibridomas en hemocitómetro y se efectuaron las diluciones necesarias para alcanzar una concentración celular de entre 1.000 y 5.000 células por ml. De esta suspensión se tomó un volumen de 10 ml que se repartieron en una placa de cultivo p96, depositando 100 µl por pocillo (entre 1 y 5 células).

Determinación del isotipo de inmunoglobulina

En una placa microtest p96 se depositaron 20 µl por pocillo de una solución 1/100 en PBS de los anticuerpos frente a los diferentes isotipos murinos (Sigma) y se incubó toda la noche a 4°C. Se añadieron entonces 200 µl por pocillo de solución de bloqueo y se incubó al menos media hora a temperatura ambiente. Se efectuaron dos lavados con PBS y

se añadieron 100 µl por pocillo de sobrenadante de los hibridomas, o PBS como control negativo, por cada anticuerpo anti-isotipo. Tras incubar una hora a 37°C los pocillos se lavaron dos veces con PBS. Se añadieron entonces 50 µl por pocillo de una solución 1/300 de anticuerpo anti-inmunoglobulina de ratón conjugado con peroxidasa y la reacción fue revelada por el mismo procedimiento empleado para el ELISA.

Citometrías de flujo

Marcaje sencillo

En leucocitos

En un tubo de 5 ml Falcon[®] (Becton Dickinson) se depositaron 100 µl de sangre sobre los que se añadieron 100 µl de sobrenadante de los hibridomas o PBS como control negativo, y se incubó 20 minutos a 4°C. Transcurrido este tiempo se hizo un lavado con FacsFlow[®] (Becton Dickinson) centrifugando a 2.000 rpm durante 5 minutos. Posteriormente las células fueron resuspendidas en 50 µl de una solución 1/500 de anticuerpo anti-inmunoglobulina de ratón conjugado con FITC (Sigma), incubando 20 minutos a 4°C al abrigo de la luz. Se añadieron entonces 2 ml de Facs Lysing Solution[®] (Becton Dickinson) y se incubó durante 10 minutos al abrigo de la luz. Pasado este tiempo se procedió a hacer dos lavados con FacsFlow[®] y se añadieron 0,5-1 ml de solución fijadora (apéndice A.2). Las muestras que no se analizaron inmediatamente se conservaron a 4°C y en la oscuridad.

En plaquetas

En un tubo de 5 ml Falcon[®] se depositaron 100 µl de FacsFlow a los que se añadieron 5 µl de sangre. Posteriormente se añadieron 100 µl de sobrenadante de los hibridomas o PBS como control negativo, y se incubó 20 minutos a 4°C. Transcurrido este tiempo se hizo un lavado con FacsFlow[®] centrifugando a 3.000 rpm durante 6 minutos. Posteriormente las células fueron resuspendidas en 50 µl de una solución 1/500 de anticuerpo anti-inmunoglobulina de ratón conjugado con FITC (Sigma), incubando 20 minutos a 4°C al abrigo de la luz. Pasado este tiempo se procedió a hacer un lavado con FacsFlow[®] y se añadieron 0,5-1 ml de solución fijadora. Las muestras que no se analizaron inmediatamente se conservaron a 4°C y al abrigo de la luz.

En esplenocitos y timocitos

En un tubo de 5 ml Falcon[®] se depositaron 100 µl de una suspensión conteniendo 5×10^6 células/ml, añadiendo 100 µl de sobrenadante de los hibridomas o PBS como control negativo. Se incubó 20 minutos a 4°C y el resto del protocolo fue en todo igual al empleado para las plaquetas, con la salvedad de que los lavados se llevaron a cabo a 2.000 rpm.

En eritrocitos

El protocolo empleado fue igual al de citometría en plaquetas, llevando a cabo los lavados a 2.000 rpm.

En macrófagos alveolares

Se depositaron 75 µl por pocillo de sobrenadante de cultivo en placas de 96 pocillos de fondo en V (Costar), añadiendo 5×10^5 macrófagos por pocillo en 25 µl de FacsFlow[®] e incubando 30 minutos a 4°C. Tras tres lavados en FacsFlow[®], centrifugando tres minutos a 1.500 rpm, las células se incubaron con una solución de fragmentos F(ab')₂ de conejo anti-inmunoglobulinas de ratón conjugados con isotiocianato de fluoresceína a dilución 1/50 en FacsFlow[®] con un 5% de suero de cerdo, durante 30 minutos a 4°C al abrigo de la luz. Tras el marcaje se lavaron los macrófagos tres veces en las condiciones antes indicadas y se resuspendieron en solución fijadora, manteniéndose a 4°C y en oscuridad hasta su análisis en el citómetro.

Marcajes con dos fluorocromos

Frente a una batería estándar de anticuerpos contra marcadores leucocitarios porcinos

Se depositaron 75 µl por pocillo de sobrenadante de cultivo en placas de 96 pocillos de fondo en V, añadiendo 5×10^5 PBMC por pocillo en 25 µl de FacsFlow[®] e incubando 30 minutos a 4°C. Tras tres lavados en FacsFlow[®], centrifugando tres minutos a 1.500 rpm, las células se incubaron con una solución de fragmentos F(ab')₂ de conejo anti-inmunoglobulinas de ratón conjugados con isotiocianato de fluoresceína a dilución 1/50 en FacsFlow[®] con un 5% de suero de cerdo, durante 30 minutos a 4°C al abrigo de la luz. Se volvieron a lavar las células y se incubaron durante 10 minutos con FacsFlow[®] con un 5% de suero normal de ratón (25 µl por pocillo), con objeto de bloquear los sitios de unión residuales del RAM-FITC. Se añadieron directamente 25 µl por pocillo de los anticuerpos monoclonales marcados con biotina (tabla 6), incubando 20 minutos a 4°C y en oscuridad.

Tras lavar tres veces se añadió la ficoeritrina conjugada con estreptavidina (SA-PE, Southern Biotechnology) a dilución 1/1.000 en FacsFlow[®] para revelar los anticuerpos marcados con biotina y se incubaron 20 minutos. Las células se lavaron y se resuspendieron en solución fijadora, conservando a 4°C hasta su análisis. Como controles negativos se utilizaron anticuerpos monoclonales irrelevantes sin conjugar y conjugados con biotina.

Frente a un anticuerpo contra CD49f humano

En un tubo de 5 ml Falcon[®] se depositaron 100 µl de sangre de cerdo sobre los que se añadieron 100 µl de sobrenadante del clon GP4B4 o PBS como control negativo, y se incubó 20 minutos a 4°C. Transcurrido este tiempo se hizo un lavado con FacsFlow[®] centrifugando a 2.000 rpm durante 5 minutos. Posteriormente las células fueron resuspendidas en 50 µl de una solución 1/20 de anticuerpo anti-inmunoglobulina de ratón conjugado con PI (Sigma), incubando 20 minutos a 4°C al abrigo de la luz. Se volvió a lavar y se añadieron 5 µl del anticuerpo comercial frente a CD49f humano o PBS como control negativo, incubando 20 minutos en oscuridad. Se añadieron entonces 2 ml de Facs Lysing Solution[®] y se incubó durante 10 minutos al abrigo de la luz. Pasado este tiempo se procedió a hacer 2 lavados con FacsFlow[®] y se añadieron 0,5-1 ml de solución fijadora. Las muestras que no se analizaron inmediatamente se conservaron a 4°C y en la oscuridad.

Citometría intracelular en PBMC

Para detectar la expresión de antígenos intracelulares en PBMC, las suspensiones celulares se trataron durante 10 minutos a temperatura ambiente con solución permeabilizadora 2 (Becton Dickinson). Tras la permeabilización se lavaron dos veces las células con FacsFlow[®] y se tiñeron mediante el protocolo de citometría usado para los macrófagos alveolares.

Adquisición de células y análisis de los resultados

Las suspensiones celulares teñidas con los distintos anticuerpos monoclonales se analizaron en los citómetros de flujo FacSort[®] y FacScan[®] (Becton Dickinson) equipados con el software CellQuest[®]. Se adquirieron 10.000 o 20.000 eventos (dependiendo de las muestras) en 256 canales de resolución. Previamente a la adquisición de los datos definitivos se fijaron unas condiciones óptimas utilizando suspensiones celulares control sin teñir y también controles irrelevantes.

El análisis de los datos recogidos fue realizado con los programas Paint-A-Gate Pro[®] y WinMDI[®]. La expresión relativa de los antígenos celulares fue interpretada mediante los valores de intensidad media de fluorescencia, definida como el valor promedio de la intensidad de fluorescencia recogida en los canales de los fotodetectores (mean channel). Por otro lado también se recogió el porcentaje de células que expresan el antígeno frente al número total de células adquiridas o previamente seleccionadas por su diferente comportamiento en el citograma (dot-plot).

Inmunoprecipitación

La inmunoprecipitación se realizó mediante métodos no radioactivos consistentes en el marcaje con biotina de las proteínas de la superficie de las células (Cole et al., 1987; Meier et al., 1992). Las proteínas de superficie de 20×10^6 PBMC/ml o de 100×10^6 plaquetas/ml se marcaron añadiendo 0,4 mg de sulfobiotina NHS (Pierce & Warriner) por ml de suspensión y se incubaron a 4°C durante 15 minutos, agitando suavemente cada 5 minutos. Posteriormente las células se centrifugaron durante 6 minutos (a 1.500 rpm los PBMC y a 3.000 rpm las plaquetas) y se lavaron tres veces con PBS para retirar al sulfobiotina no unida.

Las células así marcadas se resuspendieron en la mitad de su volumen inicial en tampón de lisis celular (apéndice A.1) al que se añadió PMSF hasta una concentración 2 mM y se dejaron en agitación a 4°C durante 1 hora en oscuridad. Posteriormente el lisado celular se centrifugó a 12.000 rpm durante 20 minutos, recuperándose el sobrenadante, que se pudo conservar a 4°C, en tubo de cristal y protegido de la luz durante semanas.

Para el proceso de preinmunoprecipitación, 75 µl de suspensión de proteína G-sefarosa (Amersham Pharmacia Biotech), preparada según las condiciones del fabricante, se añadieron por ml de lisado, dejando en agitación a 4°C durante toda la noche. Posteriormente se retiró la proteína G centrifugando 5 minutos a 2.000 rpm y se recogió el sobrenadante.

Se pusieron en contacto 500 µl de lisado con 1 ml de sobrenadante de hibridoma o PBS como control negativo, dejando en agitación a 4°C durante dos horas a temperatura ambiente y al abrigo de la luz.

Simultáneamente se recubrió la proteína G con un anticuerpo anti-IgG o anti-IgM de ratón desarrollado en conejo (Pierce) para aumentar su capacidad de unión. Se partió de 50 µl de proteína G por muestra, a los que se añadió igual volumen de una dilución 1/10 de anti-isotipo en tampón de lisis celular, dejando agitar dos horas a temperatura ambiente. Transcurrido ese tiempo la proteína G se recuperó centrifugando a 2.000 rpm durante 5 minutos y se resuspendió en el volumen inicial de tampón de lisis celular.

A cada muestra de complejo antígeno-anticuerpo se añadieron 50 µl de proteína G recubierta y se dejaron en agitación durante una hora a temperatura ambiente y al abrigo de la luz. Las muestras se lavaron añadiendo tampón de lisis celular y centrifugando a 2.000 rpm durante 5 minutos, desechándose el sobrenadante y recuperándose la proteína G. Esta operación se repitió tres veces. Tras el último lavado las muestras se resuspendieron en un volumen aproximado de 50 µl, se añadieron 50 µl de tampón de tratamiento de muestras (apéndice A.3) y se hirvieron durante 5 minutos.

La electroforesis se realizó en geles de poliacrilamida de gradiente 5-15% de 1,5 mm de grosor (apéndice C.3). Un volumen aproximado de 100 µl por muestra se cargaron en cada pocillo del gel, junto a 7 µl de patrón de pesos moleculares marcados con biotina (Bio-Rad). El gel se sumergió en un tanque de electroforesis con tampón puente (apéndice A.3) y fue conectado a un amperaje de 8 a 35 mA por gel.

Una vez transcurrida la electroforesis, el gel fue incubado en tampón de transferencia (apéndice A.3) durante 20 minutos a temperatura ambiente. Por otro lado, una membrana de PVDF Inmobilon P (Millipore), de las mismas dimensiones que el gel y previamente activada con metanol (Panreac), fue incubada en tampón de transferencia durante 20 minutos. La transferencia se llevó a cabo en un dispositivo semiseco Modelo (Millipore). El gel fue colocado sobre la membrana de PVDF y entre 8 trozos de papel Whatman 3MM (Whatman), 4 por encima y 4 por debajo, también previamente empapados en tampón de transferencia. Se hizo rodar una varilla de vidrio sobre este “sándwich” de transferencia para eliminar las burbujas que pudieran existir y el aparato se conectó a la fuente de alimentación, a un amperaje de 2,5 multiplicado por la superficie del gel en cm², durante 50 minutos.

La membrana de PVDF fue incubada en solución de bloqueo durante una hora, en agitación suave y al abrigo de la luz. Posteriormente, la membrana se incubó con una

solución de Streptavidina-HRP (Amersham Pharmacia Biotech) 1/500 en PBS durante una hora en agitación suave y al abrigo de la luz. Seguidamente se lavó tres veces con PBST y se reveló en cuarto oscuro mediante el sistema de detección ECL[®] (Amersham Pharmacia Biotech), de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La membrana se expuso entonces a una placa radiográfica (Kodak) durante un tiempo que pudo oscilar de 15 segundos a varios minutos e, inmediatamente, se procedió al revelado de la placa.

Inmunoblotting

Las muestras sometidas a inmunoblotting fueron de tres tipos, dependiendo del anticuerpo monoclonal en estudio; lisados celulares de plaquetas o PBMC, extractos crudos de cerebro o la proteína recombinante CD29R.

Para la obtención de los lisados se resuspendieron 10×10^7 PBMC o 20×10^8 plaquetas en tampón de lisis celular, dejando en agitación a 4°C durante una hora. Posteriormente el lisado celular se centrifugó a 12.000 rpm durante 20 minutos, recuperándose el sobrenadante, que se pudo conservar a 4°C, en tubo de cristal durante semanas.

La proteína recombinante CD29R y los extractos crudos de cerebro se sometieron a electroforesis SDS-PAGE en geles de poliacrilamida del 10% (apéndice C.4) en condiciones reductoras, cargando aproximadamente 1 µg de la proteína recombinante o de 1 a 15 µl de los extractos de cerebro por pocillo en 20-50 µl de tampón de tratamiento, junto a 10 µl de los patrones de pesos moleculares (Sigma). La electroforesis propiamente dicha se llevó a cabo en tampón puente, aplicando un amperaje constante de 18 a 20 mA por gel.

La electroforesis de los lisados celulares se realizó en geles de poliacrilamida de gradiente 5-15% de 1,5 mm de grosor. Un volumen aproximado de 100 µl (previamente diluidas en tapón de tratamiento de muestras) por muestra se cargaron en cada pocillo del gel, junto a 7 µl de patrón de pesos moleculares marcados con biotina. El gel se sumergió en un tanque de electroforesis con tampón puente y fue conectado a un amperaje de 8 a 35 mA por gel.

Una vez transcurrida la electroforesis se llevó a cabo la transferencia del gel del modo ya descrito para la inmunoprecipitación. Tras la transferencia se cortó la tira

correspondiente a los patrones de peso molecular y tantas tiras como anticuerpos a estudiar. La tira de los pesos moleculares fue contrastada en una solución de negro amido (apéndice A.3) durante 5-10 minutos a temperatura ambiente, posteriormente desteñida con una solución decolorante (apéndice A.4), lavada con agua destilada y dejada secar. El resto de tiras, debidamente identificadas, se incubaron en solución de bloqueo durante una hora a temperatura ambiente en agitación suave. Los geles se tiñeron con una solución de tinción (apéndice A.4) durante varias horas y posteriormente se destiñeron con solución decolorante.

Tras el bloqueo de los sitios unión inespecíficos cada tira se incubó con el sobrenadante de su correspondiente hibridoma a 4°C durante toda la noche y en agitación suave. Se lavaron tres veces con PBST y se añadió el anticuerpo secundario, un anticuerpo anti-IgG de ratón conjugado con fosfatasa alcalina (Sigma), a dilución 1/10.000 y se dejó incubar una hora a temperatura ambiente en agitación suave. Se lavó tres veces con PBST y se añadió la solución de revelado: 33 µl de solución BCIP (apéndice A.2) y 66 µl de solución NBT (apéndice A.2) diluidos en 10 ml de tampón fosfatasa alcalina (apéndice A.2) incubando un tiempo variable y deteniendo la reacción con agua destilada.

Producción de exudado ascítico

Para llevar a cabo determinados ensayos fueron necesarios la purificación y marcado con biotina de los anticuerpos monoclonales GP2B7, GP2D8 y GP3D10, para lo que previamente fue precisa la producción de exudado ascítico para obtener una concentración suficiente de inmunoglobulinas.

Se emplearon ratones BALB/c a los que se les inyectaron por vía intraperitoneal 0,5 ml de pristano (Sigma). Dos semanas más tarde se le inyectaron por la misma vía a cada ratón de 10^6 a 10^7 células de hibridoma. Pasadas de una a dos semanas se procedió al sacrificio de los ratones por dislocación cervical y se obtuvo la totalidad del fluido ascítico. Se centrifugó a 12.000 rpm durante 5 minutos para retirar los restos celulares y se conservó a -20°C hasta su purificación.

Este y todos los procedimientos llevados a cabo con ratones a lo largo de este trabajo se realizaron de acuerdo con la normativa europea de manejo de animales de

experimentación, siendo los animales tratados en todo momento por personal cualificado y autorizado para este fin.

Purificación de anticuerpos monoclonales

Para la purificación de los anticuerpos mencionados se siguió el protocolo de purificación en columnas de alta sal, indicado para anticuerpos de isotipo IgG₁, cuya afinidad por la proteína A es baja.

Se partió de exudado ascítico que se diluyó tres veces en PBS, añadiendo luego NaCl hasta alcanzar una concentración 3,3 M. Se ajustó el pH añadiendo 1/10 del volumen total de una solución de borato sódico 1 M a pH 8,9. El exudado así diluido se pasó a través de una columna de proteína A que seguidamente se lavó con 10 volúmenes de una solución NaCl 3,0 M, borato sódico 50 mM a pH 8,9 y con 10 volúmenes de una solución NaCl 3,0 M, borato sódico 10 mM a pH 8,9. Se eluyó la columna con glicina 100 mM a pH 3, recogiendo de 12 a 15 fracciones de un volumen aproximado de 1 ml, cuyo pH se ajustó a la neutralidad mediante la adición de 20-50 µl de Tris 1 M a pH 8. El contenido aproximado en inmunoglobulinas de estas fracciones se estimó midiendo sus absorbancias a 280 nm en el espectrofotómetro. Las fracciones se recogieron en un “pool” y se concentraron por vacío en bolsas de diálisis Collodion Bags (Sartorius) hasta un volumen aproximado de 1 ml.

Marcado con biotina

El marcado de los anticuerpos monoclonales purificados se llevó a cabo con sulfobiotina NHS, partiendo de una cantidad inicial de al menos 0,5 mg/ml de inmunoglobulina. La cantidad de anticuerpo a marcar se llevó hasta un volumen de 1 ml añadiendo PBS y se le ajustó el pH a 8,5 con una solución de bicarbonato sódico 50 mM. A continuación se añadieron 0,32 mg de sulfobiotina por cada 20 mg de anticuerpo y se incubó en oscuridad durante 2 horas a 4°C.

Para eliminar la sulfobiotina no fijada se recurrió a lavados con tampón fosfato 0,1 M a pH 7, utilizando con este fin concentradores de centrifuga Macrosep™ (Pall Filtron). Se llevaron a cabo cuatro lavados de una hora cada uno a 3.000 rpm.

El volumen final de la solución de anticuerpo fue de aproximadamente 0,5 ml y se conservó a -20°C hasta el momento de su uso.

Ensayos de mapeo epitópico

Para los ensayos de mapeo epitópico se recurrió a la citometría de flujo, testando nuestros anticuerpos frente a otros que reconocían los mismos marcadores leucocitarios porcinos que ellos.

Se depositaron 75 μl por pocillo de sobrenadante de cultivo en placas de 96 pocillos de fondo en V, añadiendo 5×10^5 PBMC por pocillo en 25 μl de FacsFlow[®] e incubando 30 minutos a 4°C . Se añadieron directamente 25 μl por pocillo de los anticuerpos monoclonales marcados con biotina, incubando 20 minutos a 4°C y en oscuridad. Tras lavar tres veces se añadió la ficoeritrina conjugada con estreptavidina a dilución 1/1.000 en FacsFlow[®] para revelar los anticuerpos marcados con biotina y se incubaron 20 minutos. Las células se lavaron y se resuspendieron en solución fijadora, conservando a 4°C hasta su análisis en el citómetro de flujo. Como controles negativos se utilizaron anticuerpos monoclonales irrelevantes sin conjugar y conjugados con biotina.

Inmunohistoquímica

Los órganos a estudiar se trocearon en piezas de aproximadamente 1 cm de grosor que se fijaron por inmersión durante un mínimo de 24 horas en formaldehído tamponado al 10% (Merck) o en líquido de Bouin (apéndice A.2). Una vez fijadas, las muestras fueron talladas por el personal del Servicio de Diagnóstico del Departamento de Anatomía y Anatomía Patológica Comparadas de la Universidad de Córdoba e incluidas en parafina en un procesador automático Shandon Hypercenta XP.

Para los estudios inmunohistoquímicos se utilizaron cortes de 4 μm de grosor montados sobre portaobjetos tratados con Vectabound (Vector Laboratories), seccionados en un microtomo Reicher-Jung modelo 1130 Biocut. Las muestras se desparafinaron mediante tres baños de 10 minutos en xilol (Panreac) seguidos de dos baños de 10 minutos en etanol absoluto. Se procedió entonces a inhibir la actividad de la peroxidasa endógena mediante la incubación en peróxido de hidrógeno (Merck) al 3% en metanol, durante 30 minutos en agitación suave y a temperatura ambiente. La hidratación de los cortes se

realizó mediante sucesivos baños en alcoholes de concentración decreciente (5 minutos en etanol de 96° y otros 5 minutos en etanol de 70°) y un lavado en agua destilada.

Los cortes de tejidos se sometieron entonces a un tratamiento térmico de desenmascaramiento antigénico, hirviéndolos en una solución 10 mM de citrato monosódico a pH 6 durante 20 minutos, tras lo cual se dejaron enfriar durante 15-20 minutos. Se lavaron tres veces en PBS (5 minutos por lavado) y se incubaron en suero normal de cabra (Vector Laboratories) al 10% en PBS durante 30 minutos a temperatura ambiente, bloqueando así los sitios de unión inespecíficos. Se procedió entonces a la incubación con los sobrenadantes de los correspondientes anticuerpos monoclonales a las diluciones pertinentes, que se desarrolló en cámara húmeda durante 18 horas y a 4°C. El control negativo se incubó con PBS.

Pasado este tiempo se dejaron atemperar los cortes de tejido durante una hora y se sometieron a tres lavados con PBS de 5 minutos. Se añadió entonces el anticuerpo secundario, un anticuerpo anti-Ig de ratón desarrollado en cabra conjugado con biotina (Dako) a dilución 1/20 en PBS con un 10% de suero normal de cabra, incubando 30 minutos a temperatura ambiente. Se volvió a lavar tres veces con PBS y los cortes de tejido se incubaron con el complejo avidina-biotina-peroxidasa (ABC) (Sigma) diluido 1/50 en PBS durante 1 hora temperatura ambiente y en oscuridad.

Finalmente, los cortes se lavaron otras tres veces con solución Tris (apéndice A.2) y se expusieron al cromógeno indicado, que en el protocolo empleado es el tetracloruro de 3'-diaminobezidina (Sigma) diluido al 0,35% en solución Tris con 0,3% de peróxido de hidrógeno como sustrato, durante 1 minuto a temperatura ambiente. Los cortes se lavaron entonces con agua y se sometieron a contratinción nuclear con hematoxilina de Mayer (Panreac) durante 30-60 segundos. Se volvió a lavar con agua y se procedió a la deshidratación de los cortes, sumergiendo sucesivamente en alcoholes a diluciones crecientes: etanol de 70°, etanol de 96° (unos segundos en cada paso), dos pases de 1 minuto por etanol absoluto y otro dos de la misma duración por xilol, montando finalmente los cortes con Eukitt (O. Kindler GmbH & Co.). Los cortes histológicos ya montados se fotografiaron en un fotomicroscopio Zeiss modelo Axyphot.

Referencias

- Álvarez B, Domenech N, Alonso F, Sánchez C, Gómez del Moral M, Ezquerra A, Domínguez J, 2000. Molecular and functional characterization of porcine LFA-1 using monoclonal antibodies to CD11a and CD18. *Xenotransplantation* 7: 258-266.
- Álvarez B, Sánchez C, Bullido R, Marina A, Lunney J, Alonso F, Ezquerra A, Domínguez J, 2000. A porcine cell surface receptor identified by monoclonal antibodies to SWC3 is a member of the signal regulatory protein family and associates with protein-tyrosine phosphatase SHP-1. *Tissue Antigens* 55: 342-351.
- Carrascosa AL, Santaren JF, Vinuela E, 1982. Production and titration of African swine fever virus in porcine alveolar macrophages. *J Virol Methods* 3: 303-310.
- Cole SR, Ashman LK, Ey PL, 1987. Biotinylation: an alternative to radioiodination for the identification of cell surface antigens in immunoprecipitates. *Mol Immunol* 24: 699-705.
- Denham S, Zwart RJ, Whittall JT, Pampusch M, Corteyn AH, Bianchi AT, Murtaugh MP, Parkhouse RM, Tlaskalova H, Sinkora J, Sinkora M, Rehakova Z, 1998. Monoclonal antibodies putatively identifying porcine B cells. *Vet Immunol Immunopathol* 60: 317-328.
- Jiménez Marín A, 2002. Caracterización molecular de las integrinas beta-1 (CD29) y beta-3 (CD61) porcinas. Obtención de anticuerpos contra dominios específicos de ambas moléculas. Tesis doctoral.
- Meier T, Arni S, Malarkannan S, Poincelet M, Hoessli D, 1992. Immunodetection of biotinylated lymphocyte-surface proteins by enhanced chemiluminescence: a nonradioactive method for cell-surface protein analysis. *Anal Biochem* 204: 220-226.
- Pescovitz MD, Lunney JK, Sachs DH, 1984. Preparation and characterization of monoclonal antibodies reactive with porcine PBL. *J Immunol* 133: 368-375.
- Pescovitz MD, Aasted B, Canals A, Dominguez J, Vizcaino JS, Pospisil R, Trebichavsky I, Salmon H, Valpotic I, Davis WC, 1994. Analysis of monoclonal antibodies reactive with the porcine CD4 antigen. *Vet Immunol Immunopathol* 43: 233-236.
- Pescovitz MD, Book BK, Aasted B, Dominguez J, Ezquerra A, Trebichavsky I, Novikov B, Valpotic I, Nielsen J, Arn S, Sachs DH, Lunney JK, Boyd PC, Walker J, Lee R, Lackovic G, Kirkham P, Parkhouse RM, Saalmuller A, 1998. Analyses of monoclonal antibodies reacting with porcine CD3: results from the Second International Swine CD Workshop. *Vet Immunol Immunopathol* 60: 261-268.
- Pescovitz MD, Book BK, Aasted B, Dominguez J, Bullido R, Trebichavsky I, Novikov B, Valpotic I, Tomaskovic M, Nielsen J, Arn S, Sachs DH, Lunney JK, Boyd PC, Walker J, Lee R, Saalmuller A, 1998. Analyses of monoclonal antibodies reacting with porcine CD5: results from the Second International Swine CD Workshop. *Vet Immunol Immunopathol* 1998 60: 269-273.
- Saalmuller A, Aasted B, Canals A, Dominguez J, Goldman T, Lunney JK, Maurer S, Pescovitz MD, Pospisil R, Salmon H, 1994. Analyses of mAb reactive with porcine CD8. *Vet Immunol Immunopathol* 43: 249-254.

Shulman M, Wilde CD, Kohler G, 1978. A better cell line for making hybridomas secreting specific antibodies. Nature 276: 269-270.

1. OBTENCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE UN ANTICUERPO MONOCLONAL FRENTE A CD5 PORCINO

1.1 Introducción

La composición de muchas de las proteínas que forman parte de las membranas celulares se asemeja a un mosaico de diversas secuencias conservadas que comprenden distintos dominios estructurales. Con frecuencia estos motivos se caracterizan por la presencia de dominios cortos estabilizados mediante enlaces disulfuro. (Resnick et al., 1994). Una familia altamente conservada de dominios proteicos ricos en cisteína fue reconocida durante el estudio de la estructura del receptor macrofágico scavenger tipo I (Freeman et al., 1990; Krieger, 1992). Se definió así la superfamilia de proteínas SRCR (scavenger receptor cysteine-rich), cuyos miembros se caracterizan por incluir en su secuencia una o más copias de un motivo de aproximadamente 101 residuos homólogo al del receptor scavenger tipo I: el dominio SRCR. En función del número y la localización de los residuos de cisteína en sus dominios SRCR dicha superfamilia se ha dividido en dos grupos: A y B (Resnick et al., 1994).

Muchos de los miembros de la superfamilia SRCR son marcadores de membrana de células asociadas con el sistema inmune o proteínas solubles relacionadas con dicho sistema (Resnick et al., 1994). Sin embargo, proteínas que presentan dominios SRCR también se sintetizan en otros tipos celulares, como hepatocitos (Goldberger et al., 1987) o células epiteliales del aparato digestivo (Holmskov et al., 1999). Las funciones del dominio SRCR se cree que están relacionadas con la interacción entre proteínas y la unión al ligando, habiendo sido ha puesto en evidencia su mediación en la diferenciación y la activación celular en macrófagos (Law et al., 1993) y linfocitos T (Tarakhovsky et al., 1995).

Son muchos los antígenos de membrana leucocitarios y de otros tipos celulares que presentan dominios SRCR en sus secuencias. En macrófagos, aparte del receptor scavenger tipo I existe un marcador con una topología similar, denominado MARCO, que contiene un dominio SRCR (Elomaa et al., 1995). Otro marcador macrofágico es CD163, que presenta nueve dominios SRCR (Law et al., 1993). En la especie bovina WC1, un marcador de los linfocitos T $\gamma\delta$, presenta 11 dominios SRCR (Wijngaard et al., 1992). SP α , una proteína

soluble que se une a macrófagos (Gebe et al., 1997), CD6 (Aruffo et al., 1997) y CD5 (Freeman et al., 1990) contienen tres dominios SRCR en sus secuencias.

CD5, también denominado antígeno Leu-1 y T1, es una glicoproteína de membrana de tipo I perteneciente al grupo B de la superfamilia SRCR que se expresa en timocitos, linfocitos T y en una subpoblación de células B y cuyo peso molecular es de aproximadamente 67 kDa (Barclay et al., 1997). Su estructura y distribución tisular son similares a las de CD6, con tres dominios SRCR en su región extracelular (D1, D2 y D3) y una región citoplasmática relativamente larga de 94 residuos (McAlister et al., 1998). La estructura de CD5 está muy conservada entre las distintas especies y también la secuencia de su región citoplasmática, en particular los sitios de fosforilación (Koskinen et al., 1998). Sin embargo, la secuencia de la región extracelular sólo presenta en torno a un 40% de homología entre especies (Fabb et al., 1993).

Las funciones que desempeña CD5 no han sido aún completamente elucidadas, pero estudios funcionales llevados a cabo en ratones knock-out indican que CD5 interviene en el control de las respuestas linfocitarias, tanto en células B (Bikah et al., 1996; Jamin et al., 1996) como T, actuando como modulador negativo en la maduración y selección de los timocitos (Tarakhovsky et al., 1995). En células B se ha relacionado CD5 con la regulación negativa de las señales mediadas por el receptor de antígeno (Sen et al., 1999). También se ha señalado su implicación en la activación de los linfocitos T colaboradores a través de la interacción con CD72, siendo este marcador de linfocitos B uno de sus ligandos (Noh & Lee, 1998).

La mayoría de los ligandos de CD5 identificados hasta la fecha son proteínas de superficie de linfocitos B; CD72, gp40-80 y las regiones “framework” V(H) de las inmunoglobulinas de superficie, aunque también se ha propuesto como ligando una molécula de superficie por identificar que se expresa en monocitos, linfocitos y diversas líneas celulares de origen linfoide, mieloide y epitelial (Calvo et al., 1999). Si bien no existen datos concluyentes sobre los mecanismos moleculares por los que CD5 interactúa con sus ligandos (McAlister et al., 1998), Calvo y colaboradores (1999) han propuesto un modelo en el que los dos dominios SRCR amino-terminales de CD5 (D1 y D2) intervendrían a la unión del ligando de amplia distribución celular antes mencionado

mientras que el dominio D3 interactuaría con los ligandos presentes en la superficie de los linfocitos B.

Para llevar a cabo sus funciones, CD5 no se expresa aisladamente en la superficie de los linfocitos, sino asociado a otras moléculas de membrana. Así, en linfocitos B humanos se ha descrito su asociación al complejo del receptor de células B, interviniendo en la modulación de las señales de dicho complejo (Lankester et al., 1994), y a las IgM de superficie (Jamin et al., 1997). También se ha puesto de manifiesto en linfocitos T humanos su asociación con el complejo receptor de células T/CD3 (Osman et al., 1993) y con CD9 (Toyo-oka et al., 1999).

El conocimiento de CD5 tiene un gran interés desde el punto de vista clínico dada la implicación de este marcador de membrana en distintos trastornos autoinmunes y en neoplasias de células B y T (Hardin et al., 1992; Delfini et al., 1993). En la mayoría de linfomas y leucemias de células T se detecta expresión de CD5 (Delfini et al., 1993) y también los linfocitos B de la mayoría de leucemias linfoides crónicas expresan CD5, atribuyéndose a esta subpoblación un papel clave en los trastornos linfoproliferativos de células B (Pers et al., 1999). En la especie bovina se ha postulado un posible tropismo del virus de la leucemia bovina por los linfocitos B CD5 positivos (Meirom et al., 1997).

También en diversas enfermedades autoinmunes no órgano-específicas como la artritis reumatoide, el lupus eritematoso sistémico o el síndrome de Sjögren primario se ha observado un aumento de la población de linfocitos B CD5 positivos, lo que sugiere una posible implicación de esta subpoblación en la producción de autoanticuerpos, lo que no implica necesariamente que sean estos linfocitos los productores de los autoanticuerpos (Pers et al., 1999). En ratones con la mutación “motheaten”, que va acompañada de autoinmunidad sistémica grave y disfunción inmune, se constata un aumento de los linfocitos B CD5 positivos (Joliat et al., 2002) y recientes estudios en pacientes con esquizofrenia han puesto en evidencia un aumento de dicha subpoblación en un grupo de enfermos, lo que podría apoyar la hipótesis de que existen mecanismos autoinmunes implicados en el desarrollo de algunos casos de esquizofrenia (Printz et al., 1999). También se ha relacionado el aumento de los linfocitos B CD5 positivos en pacientes infectados por el virus de la hepatitis C con los trastornos autoinmunes y linfoproliferativos asociados a esta patología (Zuckerman et al., 2002).

Sin embargo, estudios sobre ratones afectados de lupus (Ye et al., 1996) y pacientes con miastenia gravis (Araga et al., 1995) indican que tanto los linfocitos B CD5 positivos como los CD5 negativos intervienen en la activación policlonal de las células B y en la subsiguiente producción de autoanticuerpos. Esta discrepancia podría quizá ser explicada por una hipótesis que postula que CD5 es un marcador de activación de los linfocitos B y que por tanto no existen dos linajes de células B diferenciados en función de su expresión de CD5 (Vernino et al., 1992; Kawamura et al., 1994; Gagro et al., 2000). Mediante una técnica que aumenta la resolución de los análisis de citometría de flujo se ha evidenciado la expresión de CD5 en todas las células B, por lo que la producción de autoanticuerpos por linfocitos B CD5 positivos podría explicarse como un fenómeno cuantitativo dependiente de la activación de las células B (Kaplan et al., 2001). Un estudio sobre la producción de autoanticuerpos anti-mielina en pacientes con polineuropatía asociada a gammopatía monoclonal apunta también en este sentido (Ekerfelt et al., 1995).

CD5 se ha descrito y caracterizado en diversas especies animales. De hecho, este marcador fue originalmente identificado en ratón como la molécula Ly-1 (Ledbetter et al., 1981). Posteriormente, y mediante el empleo de anticuerpos monoclonales específicos, se han identificado sus homólogos en rata (Dallman et al., 1984), oveja (Mackay et al., 1985; Beya et al., 1986), vaca (Howard et al., 1988) y conejo (Raman & Knight, 1992). El gen que codifica CD5 en la especie humana se clonó en 1986 (Jones et al., 1986) y posteriormente se han clonado sus homólogos en distintas especies: ratón (Huang et al., 1987), vacuno (Yu et al., 1990), oveja (Fabb et al., 1993), rata (Matsuura et al., 1993) y pollo (Koskinen et al., 1998).

En la especie porcina se ha caracterizado la molécula homóloga de CD5 mediante el uso de un anticuerpo monoclonal (Saalmüller et al., 1994a). En los sucesivos workshops internacionales de antígenos de diferenciación porcinos se han identificado otros anticuerpos frente a CD5, hasta un total de ocho (Haverson et al., 2001), y se ha clonado el gen que codifica esta proteína de membrana (Appleyard & Wilkie, 1998a).

En este capítulo se describe la caracterización de un anticuerpo monoclonal, GP2D8, obtenido mediante inmunización con PBMC de cerdo, que reconoce específicamente CD5 porcino.

1.2 Resultados

1.2.1 Selección y determinación del isotipo del anticuerpo GP2D8

El hibridoma GP2D8 fue seleccionado inicialmente por su reacción positiva en ELISA indirecto frente a PBMC porcinos. Antes de proceder a su caracterización se comprobó su positividad en citometría de flujo frente a leucocitos porcinos (figura 1.1) y se determinó su isotipo, que fue IgG1.

1.2.2 Distribución celular

Mediante el empleo de técnicas de citometría de flujo se analizó la reactividad del anticuerpo monoclonal GP2D8 con las distintas poblaciones leucocitarias porcinas, así como con plaquetas, eritrocitos, macrófagos alveolares y suspensiones celulares de timo y bazo.

El antígeno reconocido por el anticuerpo GP2D8 se expresaba exclusivamente en una subpoblación de linfocitos, con una distribución bimodal, y en suspensiones celulares de timo, mientras que para el resto de poblaciones celulares se obtuvieron valores próximos al control (figura 1.1).

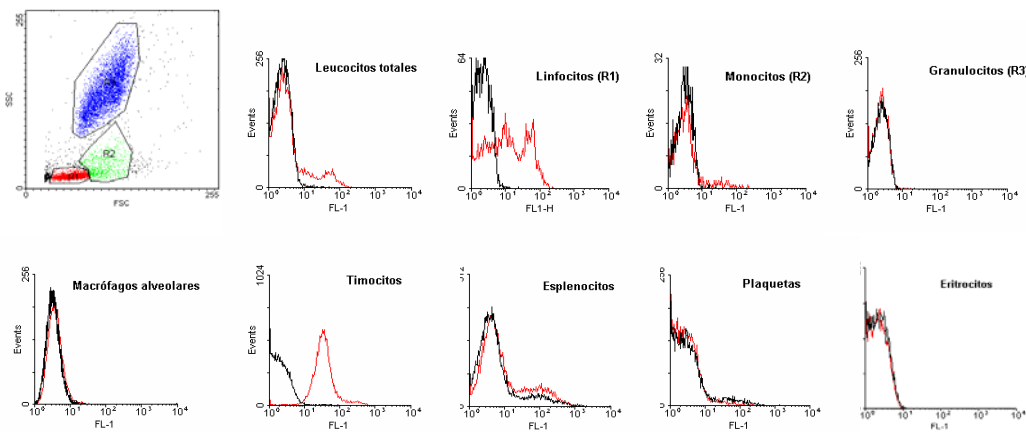


Figura 1.1. Análisis mediante citometría de flujo de la expresión del antígeno reconocido por el anticuerpo GP2D8 (en rojo) en diversas poblaciones celulares. En negro, los controles negativos.

Se procedió entonces al estudio de la distribución de GP2D8 frente a una batería estándar de anticuerpos contra marcadores leucocitarios porcinos mediante citometría con dos fluorocromos sobre PBMC. Se confirmó que GP2D8 reconocía un antígeno ausente en

1. Caracterización de un anticuerpo frente a CD5

monocitos (células SWC3 positivas) (figura 1.2). La mayoría de las células CD3 positivas eran reconocidas por GP2D8, que reconocía también una subpoblación de las CD3 negativas. La totalidad de las células CD4 positivas y la mayoría de las CD8 positivas eran reconocidas por GP2D8, mientras que sólo en torno a un 40% de los linfocitos B (identificados mediante un anticuerpo frente las IgM de superficie) eran reconocidos por dicho anticuerpo (figura 1.2). Al enfrentar a un anticuerpo frente a CD5 (1H6/8) se obtuvieron resultados similares a los obtenidos al enfrentar a un anticuerpo irrelevante (figura 1.2).

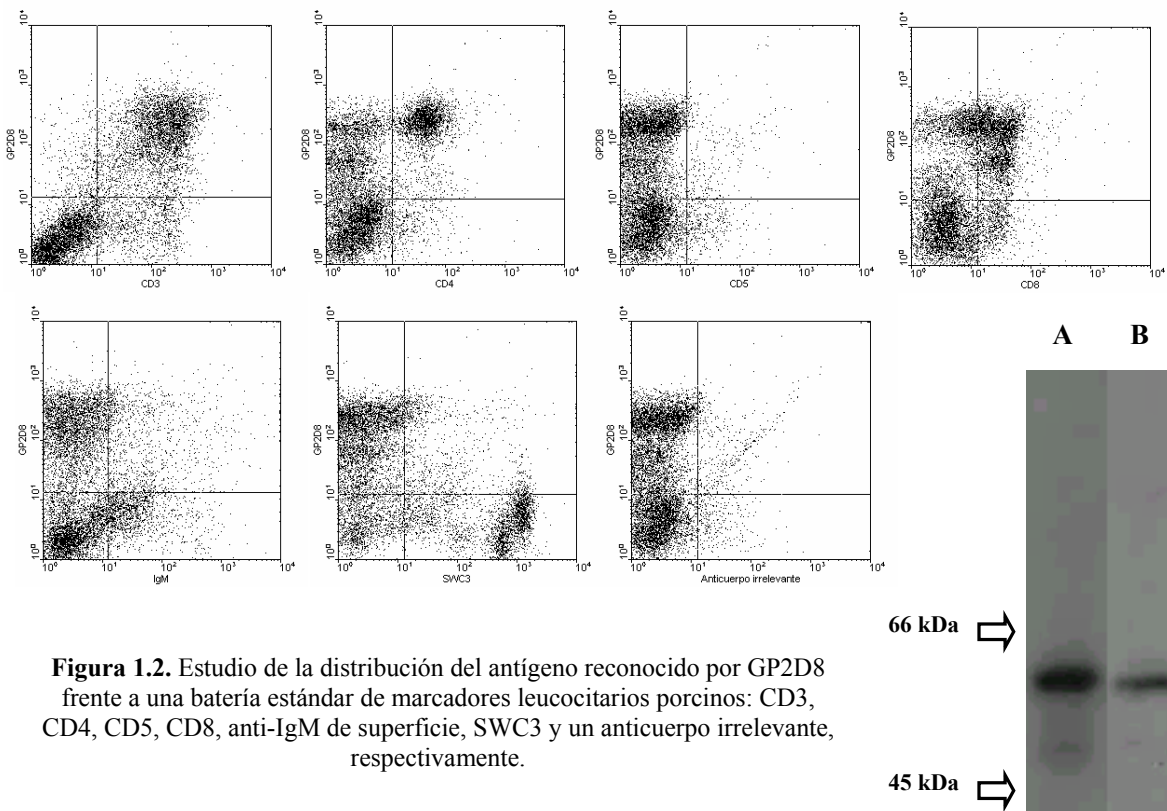


Figura 1.2. Estudio de la distribución del antígeno reconocido por GP2D8 frente a una batería estándar de marcadores leucocitarios porcinos: CD3, CD4, CD5, CD8, anti-IgM de superficie, SWC3 y un anticuerpo irrelevante, respectivamente.

1.2.3 Caracterización bioquímica

Mediante inmunoprecipitación realizada con el anticuerpo monoclonal GP2D8 sobre lisados de PBMC se identificaron dos bandas de un peso molecular aproximado de 55-60 kDa (figura 1.3). Este resultado se obtuvo tanto en condiciones reductoras como no reductoras. Estas bandas coimmunoprecipitaron con las precipitadas por el anticuerpo 1H6/8 (figura 1.4).

Figura 1.3. Bandas inmunoprecipitadas por GP2D8 de un lisado de PBMC porcinos en condiciones reductoras (carril A) y no reductoras (carril B). A la izquierda, los patrones de peso molecular

1. Caracterización de un anticuerpo frente a CD5

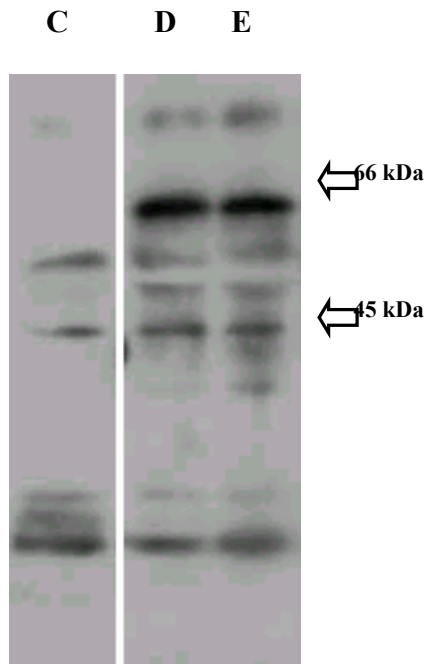


Figura 1.4. Bandas inmunoprecipitadas en condiciones reductoras por GP2D8 (carril D) y 1H6/8 (carril E) de un lisado de PBMC porcinos. El carril C es un control negativo. A la dcha. los patrones de peso molecular.

Para comprobar si el antígeno de membrana reconocido por el anticuerpo GP2D8 era el mismo que el reconocido por 1H6/8 (anti-CD5) se llevó a cabo una inmunoprecipitación sobre un lisado de PBMC con uno y otro anticuerpo, incubando posteriormente la tira de Inmobilon con sobrenadante de 1H6/8. Se identificó una banda de aproximadamente 55-60 kDa de peso molecular tanto en el carril inmunoprecipitado con GP2D8 como en el inmunoprecipitado con 1H6/8 (figura 1.5).

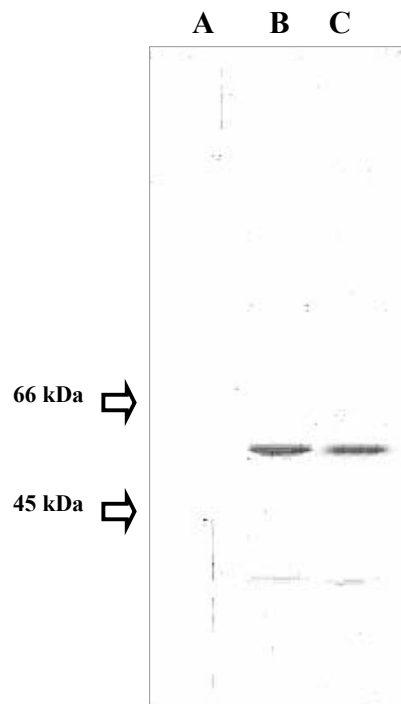


Figura 1.5. Inmunoblotting con 1H6/8 sobre lisados de PBMC inmunoprecipitados con 1H6/8 (carril B) y GP2D8 (carril C). El carril A es un control negativo. A la izqda. los patrones de peso molecular.

1.2.4 Mapeo epitópico

Mediante citometría de flujo sobre linfocitos se estudió si la unión del anticuerpo GP2D8 a su antígeno bloqueaba la de 1H6/8 marcado con biotina. El porcentaje de inhibición de la unión de 1H6/8 se expresó según la fórmula:

$$[1-(A-B/C-B)] \times 100$$

siendo A el canal medio (media geométrica) de la fluorescencia roja de la muestra preincubada con el anticuerpo cuya capacidad de bloqueo se quiere estudiar, B el del control negativo y C el del control preincubado con un anticuerpo irrelevante.

La preincubación de las células con sobrenadante de GP2D8 bloqueaba casi totalmente la unión de 1H6/8 marcado con biotina a su antígeno, con un porcentaje de inhibición del 88%. De un modo similar, si se preincubaba con 1H6/8 se inhibía la unión del anticuerpo marcado con biotina en un 100% (ver figura 1.6).

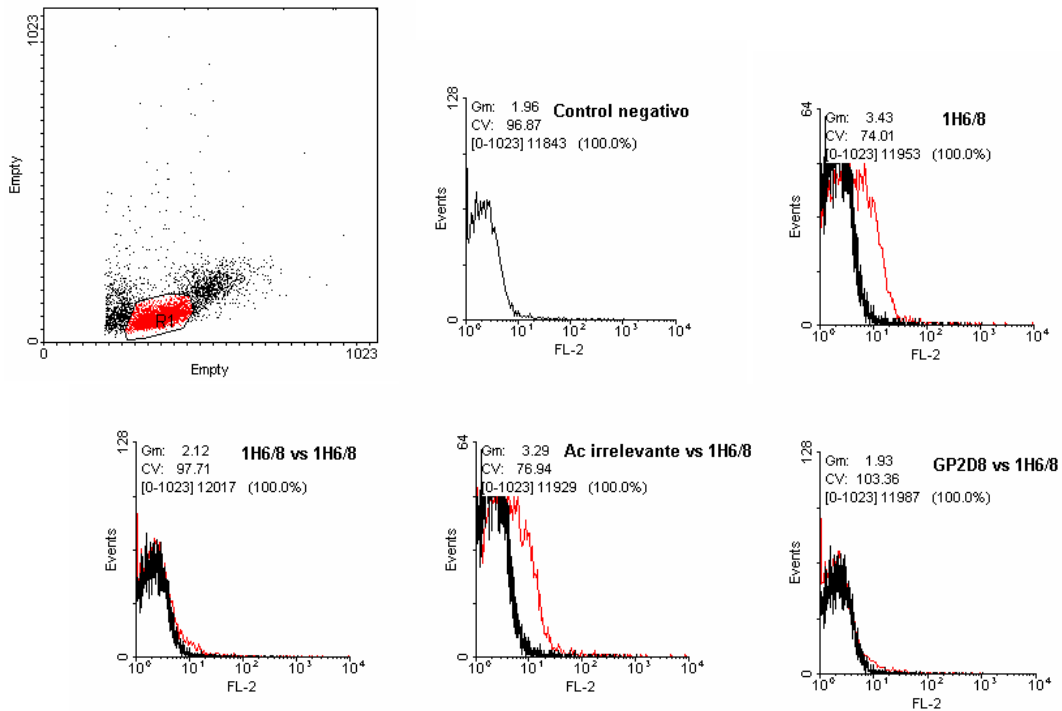


Figura 1.6. Ensayo de bloqueo de la unión de 1H6/8 marcado con biotina (en rojo) preincubando con 1H6/8, un anticuerpo irrelevante a modo de control o GP2D8. En negro, el control negativo.

1.3 Discusión

1.3.1 Distribución celular

Mediante el desarrollo de anticuerpos monoclonales dirigidos contra PBMC porcinos se obtuvo un anticuerpo, GP2D8, que reconocía un antígeno detectado por citometría de flujo en distintas poblaciones celulares de origen linfoide, pero no en células mieloides, plaquetas ni eritrocitos. Dicho marcador se expresaba en timocitos, la mayoría de los linfocitos T y una subpoblación de linfocitos B. Esta distribución celular es similar a la descrita para algunos marcadores leucocitarios porcinos ya definidos como CD5 (Saalmüller et al., 1994b) o CD6 (Pescovitz et al., 1998a). Ambas glicoproteínas de membrana son miembros muy próximos de la superfamilia SRCR y además de una distribución celular similar presentan parecida organización de su dominios extracelulares, intervienen en funciones similares y, en la especie humana, son codificadas por genes situados muy próximos en el cromosoma 11, lo que sugiere que proceden de la duplicación de un gen ancestral común (Calvo et al., 1999).

El estudio más detallado de la distribución en las distintas subpoblaciones de linfocitos T del antígeno reconocido por GP2D8 permitió definir una subpoblación de células GP2D8 negativas que eran CD8 positivas, expresando bajos niveles de ese marcador (figura 1.2). Tanto para CD5 (Saalmüller et al., 1994b) como para CD6 (Saalmüller et al., 1994c) se ha descrito la ausencia de expresión en una subpoblación de linfocitos T CD4 negativos con baja expresión de CD8, que podría corresponderse con estas GP2D8 negativas, y que representa las células NK porcinas (Saalmüller et al., 1994a).

Otro dato de interés en los resultados de las citometrías de flujo fue la distribución bimodal de los linfocitos GP2D8 positivos (figura 1.1), de un modo similar al descrito en cerdo para CD5 (Saalmüller et al., 1994a, 1994b). Esta distribución no ha sido observada en CD6 (Saalmüller et al., 1994c; Pescovitz et al., 1998a). Este resultado, junto al hecho de que, aparentemente, GP2D8 bloquease en los dobles marcajes la unión de un anticuerpo frente a CD5 (figura 1.2), dio credibilidad a la hipótesis de que GP2D8 era un anticuerpo frente a CD5 y no frente a CD6, pero serían necesarios más experimentos para confirmar o desmentir esa hipótesis.

1.3.2 Caracterización bioquímica

El anticuerpo GP2D8 inmunoprecipitaba de lisados de PBMC dos bandas de 55-60 kDa similares a la inmunoprecipitadas por 1H6/8 (figura 1.4), un anticuerpo frente a CD5 porcino (Pescovitz et al., 1998b). Este peso molecular es muy distinto del descrito en inmunoprecipitación para CD6 porcino, que se encuentra entre 110 y 150 kDa, en función de la población celular (Saalmüller et al., 1994c; Pescovitz et al., 1998a), pero es muy próximo a los 63 kDa del homólogo porcino de CD5 (Saalmüller et al., 1994a). Si bien en los estudios de inmunoprecipitación llevados a cabo en otras especies con anticuerpos frente a CD5 se ha descrito una sola banda de 63-67 kDa (Dallman et al., 1984; Mackay et al., 1985; Howard et al., 1988; Barclay et al., 1997), la inmunoprecipitación de dos bandas ha sido descrita en cerdo, siendo atribuida a posibles diferencias en la glicosilación de CD5 (Pescovitz et al., 1998b).

La confirmación de que el antígeno reconocido por GP2D8 era en efecto el homólogo porcino de CD5 la proporcionó un inmunoblotting con 1H6/8, anticuerpo que reconoció específicamente una banda de 55-60 kDa inmunoprecipitada por GP2D8 (figura 1.5). Puesto que 1H6/8 reconoce específicamente CD5 (Pescovitz et al., 1998b), la conclusión fue que la glicoproteína inmunoprecipitada por GP2D8 era CD5.

En los estudios sobre reactividad cruzada de GP2D8 no se observó reacción de dicho anticuerpo con linfocitos de ninguna de las especies estudiadas (resultados no mostrados), lo que concuerda con estudios previos (Jacobsen et al., 1993). Esta ausencia de reacción cruzada de los anticuerpos frente a CD5 se ha explicado por la baja homología entre las distintas especies de los dominios extracelulares de dicho marcador (Appleyard & Wilkie, 1998a).

1.3.3 Mapeo epitópico

Para determinar el epítipo reconocido por GP2D8 se estudió su capacidad de bloquear la unión de 1H6/8 a su propio epítipo. El bloqueo de la reacción evidenció que GP2D8 y 1H6/8 reaccionaban con el mismo epítipo o con epítipos muy próximos. Este tipo de ensayos se han empleado en el estudio de los anticuerpos monoclonales frente a CD5 porcino caracterizados hasta la fecha, comparándolos con b53b7, anticuerpo prototipo de este cluster, y han permitido determinar un sólo epítipo reconocido por todos ellos y

denominado CD5a (Saalmüller et al., 1994b; Pescovitz et al., 1998b). Una posible explicación de la inmunodominancia de dicho epítipo es que las diferencias antigénicas entre CD5 porcino y murino sean mínimas debido a una alta conservación de la secuencia extracelular (Pescovitz et al., 1998b). Puesto que la conservación entre especies de la secuencia de los dominios extracelulares de CD5 es baja (Fabb et al., 1993), un estudio comparativo en detalle de las secuencias de ratón y cerdo sería necesario para confirmar o desmentir esta hipótesis.

Para completar el mapeo epitópico se intentó estudiar si 1H6/8 bloqueaba la unión de GP2D8 a su epítipo, para lo que era necesaria la purificación de este anticuerpo y su marcaje con biotina. Si bien la purificación del anticuerpo a partir de exudado ascítico fue satisfactoria (resultados no mostrados), no resultó posible su marcaje con biotina, lo que impidió llevar a cabo el mencionado ensayo. Este hecho podría explicarse por alguna particularidad en la conformación del anticuerpo, habiéndose descrito en nuestro laboratorio casos similares de anticuerpos y otras proteínas que no se conjugan con la biotina (Pintado et al., 1995; Arce Jiménez, 2001).

1.3.4 Posibles aplicaciones

Dada la implicación de CD5 en diversos trastornos autoinmunes y linfoproliferativos (Hardin et al., 1992; Delfini et al., 1993), las posibles aplicaciones médicas de los anticuerpos frente a este marcador han sido estudiadas en la especie humana. Así, estos anticuerpos podrían emplearse como indicador pronóstico en pacientes con leucemia linfocítica crónica tipo B, en función de que induzcan o no la apoptosis “in vitro” de las células tumorales (Pers et al., 2002). La utilidad del anticuerpo anti-CD5 NCL-CD5-4C7 para el diagnóstico de trastornos linfoproliferativos también se ha mencionado (Dorfman & Shahsfaei, 1997) y se ha propuesto el uso de otro anticuerpo frente a CD5 en la prevención de la reacción “graft versus host” en los trasplantes de médula ósea, aprovechando su capacidad de atravesar la membrana celular para dispensar toxinas a los linfocitos T inmunocompetentes (Delfini et al., 1993). Vassilev y colaboradores (1993) detectaron la presencia de anticuerpos frente a CD5 en las inmunoglobulinas intravenosas empleadas en el tratamiento de ciertos trastornos autoinmunes.

Anticuerpos frente a CD5 porcino se han utilizado en estudios sobre dermatitis alérgica de contacto en cerdos miniatura como modelo experimental de la especie humana

(Vana & Meingassner, 2000). Vista la importancia de los procesos patológicos en que está implicado CD5, el empleo de estos anticuerpos en otros estudios en los que el cerdo sirviera de modelo experimental estaría justificado. También en el estudio del sistema inmune porcino dichos anticuerpos son de utilidad, habiendo sido empleados en la correcta definición de las distintas subpoblaciones de linfocitos T (Saalmüller et al., 1994b; de Bruin et al., 1997; Reháková et al., 1998). En estudios sobre la expresión de CD5 en linfocitos B se ha observado un aumento en el porcentaje de células B CD5 positivas tras la activación con PMA, de un modo similar al descrito en otras especies (Appleyard & Wikie, 1998b). Para profundizar en el conocimiento de las modificaciones de la expresión de CD5 en esta subpoblación linfocitaria porcina es imprescindible la disponibilidad de anticuerpos frente a CD5.

1.3.5 Conclusiones

En este capítulo se describe un anticuerpo monoclonal, GP2D8, que reconoce e inmunoprecipita el marcador CD5 de linfocitos porcinos. El epítipo reconocido por este anticuerpo es CD5a, reconocido por todos los anticuerpos monoclonales frente a CD5 porcino caracterizados hasta la fecha. El anticuerpo GP2D8 podría ser una herramienta útil en estudios relacionados con la Sanidad Animal y la fisiología de los linfocitos porcinos.

1.4 Bibliografía

- Appleyard GD, Wilkie BN, 1998. Porcine CD5 gene and gene product identified on the basis of inter-species conserved cytoplasmic domain sequences. *Vet Immunol Immunopathol* 60: 275-283.
- Appleyard GD, Wilkie BN, 1998. Characterization of porcine CD5 and CD5+ B cells. *Clin Exp Immunol* 111: 225-230.
- Araga S, Kishimoto M, Adachi A, Nakayasu H, Takenaka T, Takahashi K, 1995. The CD5+ B cells and myasthenia gravis. *Autoimmunity* 20: 129-134.
- Arce Jiménez C, 2001. Anticuerpos monoclonales específicos de inmunoglobulina G canina: caracterización y aplicación en inmunoensayos. Tesis doctoral.
- Aruffo A, Bowen MA, Patel DD, Haynes BF, Starling GC, Gebe JA, Bajorath J, 1997. CD-6 ligand interactions: a paradigm for SRCR domain functions? *Immunol Today* 18: 498-504.
- Barclay AN, Brown MH, Law SKA, McKnight AJ, Tomlinson MG, van der Merwe, 1997. *The Leukocyte antigen factsbook*, 2nd edition, Academic Press, London.

1. Caracterización de un anticuerpo frente a CD5

- Beya MF, Miyasaka M, Dudler L, Ezaki T, Trnka Z, 1986. Studies on the differentiation of T lymphocytes in sheep. II. Two monoclonal antibodies that recognize all ovine T lymphocytes. *Immunology* 57: 115-121.
- Bikah G, Carey J, Ciallella JR, Tarakhovsky A, Bondada S, 1996. CD5-mediated negative regulation of antigen receptor-mediated growth signals in B-1 B-cells. *Science* 274: 1906-1909.
- Calvo J, Places L, Padilla O, Vilà JM, Vives J, Bowen MA, Lozano F, 1999. Interaction of recombinant and natural soluble CD5 forms with an alternative cell surface ligand. *Eur J Immunol* 29: 2119-2129.
- Dallman MJ, Thomas ML, Green JR, 1984. MRC OX-19: a monoclonal antibody that labels rat T lymphocytes and augments in vitro proliferative responses. *Eur J Immunol* 14: 260-267.
- de Bruin MG, van Rooij EM, Voermans JJ, de Visser YE, Bianchi AT, Kimman TG, 1997. Establishment and characterization of porcine cytolytic cell lines and clones. *Vet Immunol Immunopathol* 59: 337-347.
- Delfini C, Centis F, Muretto P, Staccioli MP, Pazzaglia C, 1993. Initial characterization of an anti-CD5 monoclonal antibody obtained from leukemic cells infiltrating lymphocytes. *Haematologica* 78: 145-150.
- Dorfman DM, Shahsafaei A, 1997. Usefulness of a new CD5 antibody for the diagnosis of T-cell and B-cell lymphoproliferative disorders in paraffin sections. *Mod Pathol* 10: 859-863.
- Ekerfelt C, Ernerudh J, Solders G, Vrethem M, 1995. CD5 expression on B cells may be an activation marker for secretion of anti-myelin antibodies in patients with polyneuropathy associated with monoclonal gammopathy. *Clin Exp Immunol* 101: 346-350.
- Elomaa O, Kangas M, Sahlberg C, Tuukanen J, Sormunen R, Liakka A, Thesleff I, Kraal G, Tryggvason K, 1995. Cloning of a novel bacteria-binding receptor structurally related to scavenger receptors and expressed on a subset of macrophages. *Cell* 80: 603-609.
- Fabb SA, Gogolin-Ewens KJ, Maddox JF, 1993. Isolation and nucleotide sequence of sheep CD5. *Immunogenetics* 38, 241.
- Freeman M, Ashkenas J, Rees DJG, Kingsley DM, Copeland NG, Jenkins NA, Krieger M 1990. An ancient, highly conserved family of cysteine-rich protein domains revealed by cloning type-I and type-II murine macrophage scavenger receptors. *Proc Natl Acad Sci USA* 87: 8810-8814.
- Gagro A, McCloskey N, Challa A, Holder M, Grafton G, Pound JD, Gordon J, 2000. CD5-positive and CD5-negative human B cells converge to an indistinguishable population on signalling through B-cell receptors and CD40. *Immunology* 101: 201-209.
- Gebe JA, Keiner PA, Ring HZ, Li X, Francke U, Aruffo A, 1997. Molecular cloning, mapping to human chromosome 1 q21-q23, and cell binding characteristics of SP-alpha, a new member of the scavenger receptor cysteine-rich (SRCR) family of proteins. *J Biol Chem* 272: 6151-6158.
- Golderberg G, Bruns GA, Rits M, Edge MD, Kwiatkowski DJ, 1987. Human complement factor 1: analysis of cDNA-derived primary structure and assignment of its gene to chromosome 4. *J Biol Chem* 262: 10065-10071.
- Hardin JA, Gibson M, Grant E, Sherr DH, 1992. Interleukin 4 induces the maturation of idiotype-specific regulatory B cell populations. *Proc Soc Exp Biol Med* 200: 383-393.

1. Caracterización de un anticuerpo frente a CD5

- Haverson K, Saalmuller A, Alvarez B, Alonso F, Bailey M, Bianchi AT, Boersma WJ, Chen Z, Davis WC, Dominguez J, Engelhardt H, Ezquerro A, Grosmaire LS, Hamilton MJ, Hollemweguer E, Huang CA, Khanna KV, Kuebart G, Lackovic G, Ledbetter JA, Lee R, Llanes D, Lunney JK, McCullough KC, Molitor T, Nielsen J, Niewold TA, Pescovitz MD, de la Lastra JM, Rehakova Z, Salmon H, Schnitzlein WM, Seebach J, Simon A, Sinkora J, Sinkora M, Stokes CR, Summerfield A, Sver L, Thacker E, Valpotic I, Yang H, Zuckermann FA, Zwart R, 2001. Overview of the Third International Workshop on Swine Leukocyte Differentiation Antigens. *Vet Immunol Immunopathol* 80: 5-23.
- Holmskov U, Mollenhauer J, Madsen J, Vitvet L, Gronlund J, Tornoe I, Kliem A, Reid KB, Poustka A, Skjodt K, 1999. Cloning of gp-340, a putative opsonin receptor for lung surfactant protein D. *Proc Natl Acad Sci USA* 96: 10794-10799.
- Howard CJ, Parsons KR, Jones BV, Sopp P, Pocock DH, 1988. Two monoclonal antibodies (CC17, CC29) recognizing an antigen (Bo5) on bovine T lymphocytes, analogous to human CD5. *Vet Immunol Immunopathol* 19: 127-139.
- Jacobsen CN, Aasted B, Broe MK, Petersen JL, 1993. Reactivities of 20 anti-human monoclonal antibodies with leucocytes from ten different animal species. *Vet Immunol Immunopathol* 39: 461-466.
- Jamin C, Lydyard PM, Le Corre R, Youinou PY, 1996. CD5+B cells: differential capping and modulation of IgM and CD5. *Scand J Immunol* 43: 73-80.
- Jamin C, Le Corre R, Pers JO, Dueymes M, Lydyard PM, Youinou P, 1997. Modulation of CD72 by ligation of B cell receptor complex molecules on CD5+ B cells. *Int Immunol* 9: 1001-1009.
- Joliat MJ, Lang PA, Lyons BL, Burzenski L, Lynes MA, Yi T, Sundberg JP, Shultz LD, 2002. Absence of CD5 dramatically reduces progression of pulmonary inflammatory lesions in SHP-1 protein-tyrosine phosphatase-deficient 'viable motheaten' mice. *J Autoimmun* 18: 105-117.
- Jones NH, Clabby ML, Dialynas DP, Huang HJ, Herzenberg LA, Strominger JL, 1986. Isolation of complementary DNA clones encoding the human lymphocyte glycoprotein T1/Leu-1. *Nature* 323: 346-349.
- Kaplan D, Smith D, Meyerson H, Pecor N, Lewandowska K, 2001. CD5 expression by B lymphocytes and its regulation upon Epstein-Barr virus transformation. *PNAS* 24: 13850-13853.
- Kawamura M, Wheeler CJ, Notkins AL, Bich-Thuy LT, 1994. Modulation of the expression of CD5 antigen on the surface of human peripheral B lymphocytes. *Cell Immunol* 159: 61-76.
- Koskinen R, Göbel TW, Tregaskes CA, Young JR, Vainio O, 1998. The structure of avian CD5 implies a conserved function. *J Immunol* 160: 4943-4950.
- Krieger M, 1992. Molecular flypaper and atherosclerosis: structure of the macrophage scavenger receptor. *Trends Biochem Sci* 17: 141-146.
- Lankester AC, van Schijndel GM, Cordell JL, van Noesel CJ, van Lier RA, 1994. CD5 is associated with the human B cell antigen receptor complex. *Eur J Immunol* 24: 812-816.
- Law SK, Micklem KJ, Shaw JM, Zhang XP, Dong Y, Willi AC, Mason DY, 1993. A new macrophage differentiation antigen which is a member of the scavenger receptor superfamily. *Eur J Immunol* 2: 2320-2325.

1. Caracterización de un anticuerpo frente a CD5

- Ledbetter JA, Evans RL, Lipinski M, Cunningham-Rundles C, Good RA, Herzenberg LA, 1981. Evolutionary conservation of surface molecules that distinguish T lymphocyte helper/inducer and cytotoxic/suppressor subpopulations in mouse and man. *J Exp Med* 153: 310-323.
- Mackay CR, Maddox JF, Gogolin-Ewens KJ, Brandon MR, 1985. Characterization of two sheep lymphocyte differentiation antigens, SBU-T1 and SBU-T6. *Immunology* 55: 729-737.
- Matsuura A, Murakami T, Kozutsumi D, Kinebuchi M, Onodera K, Kon S, Kikuchi K, 1993. Molecular cloning of cDNA encoding the rat homologue of CD5 and CD8 alpha: evidence that R1-3B3 and R1-10B5 monoclonal antibodies detect rat CD5 and CD8 antigens, respectively. *Transplant Proc* 25: 2793-2794.
- McAlister MS, Brown MH, Willis AC, Rudd PM, Harvey DJ, Aplin R, Shotton DM, Dwek RA, Barclay AN, Driscoll PC, 1998. Structural analysis of the CD5 antigen--expression, disulphide bond analysis and physical characterisation of CD5 scavenger receptor superfamily domain 1. *Eur J Biochem* 257:131-141.
- Meirom R, Moss S, Brenner J, 1997. Bovine leukemia virus-gp51 antigen expression is associated with CD5 and IgM markers on infected lymphocytes. *Vet Immunol Immunopathol* 59: 113-119.
- Noh GW, Lee KY, 1998. Circulating soluble CD5 in atopic dermatitis. *Mol Cells* 8: 618-22.
- Osman N, Lazarovits AI, Crumpton MJ, 1993. Physical association of CD5 and the T cell receptor/CD3 antigen complex on the surface of human T lymphocytes. *Eur J Immunol* 23: 1173-1176.
- Pers JO, Jamin C, Predine-Hug F, Lydyard P, Youinou P, 1999. The role of CD5-expressing B cells in health and disease. *Int J Mol Med* 3: 239-245.
- Pescovitz MD, Book BK, Aasted B, Dominguez J, Bullido R, Trebichavsky I, Novikov B, Valpotic I, Nielsen J, Arn S, Sachs DH, Lunney JK, Boyd PC, Walker J, Lee R, Petrinc N, Saalmüller A, 1998. Analyses of monoclonal antibodies reacting with porcine wCD6: results from the Second International Swine CD Workshop. *Vet Immunol Immunopathol* 60: 285-289.
- Pescovitz MD, Book BK, Aasted B, Dominguez J, Bullido R, Trebichavsky I, Novikov B, Valpotic I, Tomaskovic M, Nielsen J, Arn S, Sachs DH, Lunney JK, Boyd PC, Walker J, Lee R, Saalmüller A, 1998. Analyses of monoclonal antibodies reacting with porcine CD5: results from the Second International Swine CD Workshop. *Vet Immunol Immunopathol* 60: 269-273.
- Pintado CO, Moreno A, Barbancho M, Perez de la Lastra JM, Llanes D, 1995. The beta chain of the GPIIb molecule on ruminant leukocytes and platelets is not labelled by the sulfo-NHS-biotin method. *Vox Sang* 69: 248-249.
- Printz DJ, Strauss DH, Goetz R, Sadiq S, Malaspina D, Krolewski J, Gorman JM, 1999. Elevation of CD5+ B lymphocytes in schizophrenia. *Biol Psychiatry* 46: 110-118.
- Raman C, Knight KL, 1992. Identification and cloning of rabbit CD5. *Ann N Y Acad Sci* 651: 78-81.
- Reháková Z, Sinkora J, Sinkora M, Kozáková H, Splíchal I, Barot-Ciorbaru R, Trebichavský I, 1998. Effect of controlled antigenic stimulation on lymphocyte subsets in pigs and pig fetuses. *Folia Microbiol (Praha)* 43: 513-516.

1. Caracterización de un anticuerpo frente a CD5

- Resnick D, Pearson A, Krieger M, 1994. The SRCR superfamily: a family reminiscent of the Ig superfamily. *Trends Biochem Sci* 19: 5-8.
- Saalmüller A, Hirt W, Maurer S, Weiland E, 1994. Discrimination between two subsets of porcine CD8+ cytolytic T lymphocytes by the expression of CD5 antigen. *Immunology* 81: 578-583.
- Saalmüller A, Aasted B, Canals A, Dominguez J, Goldman T, Lunney JK, Maurer S, Pescovitz MD, Pospisil R, Salmon H, 1994. Analyses of monoclonal antibodies reactive with porcine CD5. *Vet Immunol Immunopathol* 43: 237-242.
- Saalmüller A, Aasted B, Canals A, Dominguez J, Goldman T, Lunney JK, Maurer S, Pescovitz MD, Pauly T, Pescovitz MD, Pospisil R, Salmon H, Trebichavsky I, Valpotic I, Vizcaino JS, Weiland E, Zuckermann F, 1994. Analyses of monoclonal antibodies reactive with porcine CD6. *Vet Immunol Immunopathol* 43: 243-247.
- Sen G, Bikah G, Venkatamaran C, Bondada S, 1999. Negative regulation of antigen receptor-mediated signaling by constitutive associations of CD5 with SHP-1 protein tyrosine phosphatase in B-1 B cells. *Eur J Immunol* 29: 3319-3328.
- Tarakhovskiy A, Kanner SB, Hombach J, Ledbetter JA, Muller W, Killeen N, Rajewsky K, 1995. A role for CD5 in TCR-mediated signal transduction and thymocyte selection. *Science* 269: 535-537.
- Toyo-oka K, Yashiro-Ohtani Y, Park CS, Tai XG, Miyake K, Hamaoka T, Fujiwara H, 1999. Association of a tetraspanin CD9 with CD5 on the T cell surface: role of particular transmembrane domains in the association. *Int Immunol* 11: 2043-2052.
- Vana G, Meingassner JG, 2000. Morphologic and immunohistochemical features of experimentally induced allergic contact dermatitis in Göttingen minipigs. *Vet Pathol* 37: 565-580.
- Vassilev T, Gelin C, Kaveri SV, Zilber MT, Boumsell L, Kazatchkine MD, 1993. Antibodies to the CD5 molecule in normal human immunoglobulins for therapeutic use (intravenous immunoglobulins, IVIg). *Clin Exp Immunol* 92: 369-372.
- Vernino LA, Pisetsky DS, Lipsky PE, 1992. Analysis of the expression of CD5 by human B cells and correlation with functional activity. *Cell Immunol* 139: 185-197.
- Wijngaard PLJ, Metzelaar MJ, MacHugh ND, Morrison WI, Clevers HC, 1992. Molecular characterisation of the WC1 antigen expressed specifically on bovine CD4-CD8- $\gamma\delta$ T lymphocytes. *J Immunol* 149: 3273-3277.
- Ye YL, Chuang YH, Chiang BL, 1996. In vitro and in vivo functional analysis of CD5+ and CD5- B cells of autoimmune NZB x NZW F1 mice. *Clin Exp Immunol* 106: 253-258.
- Yu Q, Reichert M, Brousseau T, Cleuter Y, Burny A, Kettmann R, 1990. Sequence of bovine CD5. *Nucleic Acids Res* 18: 495.
- Zuckerman E, Slobodin G, Kessel A, Sabo E, Yeshurun D, Halas K, Toubi E, 2002. Peripheral B-cell CD5 expansion and CD81 overexpression and their association with disease severity and autoimmune markers in chronic hepatitis C virus infection. *Clin Exp Immunol* 128: 353.

2. OBTENCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE DOS ANTICUERPOS MONOCLONALES FRENTE A DOS MIEMBROS DE LA SUBFAMILIA DE LAS β_2 INTEGRINAS PORCINAS

2.1 Introducción

Para el funcionamiento de los organismos pluricelulares es imprescindible la adecuada integración de los elementos que los constituyen, incluyendo células y matriz extracelular, lo que requiere de una adhesión eficaz, así como de una buena comunicación entre los mismos (Hynes & Zhao, 2000). Estas funciones son desempeñadas por las moléculas o receptores de adhesión, ampliamente expresadas en la superficie celular. A su papel en la adhesión se suma su función de transducción de señales, interviniendo en la regulación de gran número de funciones celulares: forma y polarización celular, proliferación, supervivencia y diferenciación, motilidad celular, organización del citoesqueleto, etc. (Ruoslahti, 1995). Esta mediación en las interacciones célula-célula y célula-matriz extracelular tiene como consecuencia que los receptores de adhesión estén involucrados en una gran variedad de procesos fisiológicos y patológicos. Las moléculas de adhesión se agrupan en cuatro importantes familias: las cadherinas, las selectinas, la superfamilia de la inmunoglobulinas y las integrinas (Hynes, 1999).

Las integrinas son glicoproteínas heterodiméricas constituidas por una cadena α y una cadena β que atraviesan la membrana citoplasmática. Hasta el momento se han descrito 17 variantes de la subunidad α y 8 de la subunidad β . Estas cadenas interactúan de forma no covalente, formando heterodímeros distintos, de los que se conocen 24 diferentes. Generalmente, distintas subunidades α se asocian con un solo tipo de subunidad β , por lo que se habla de subfamilias β integrinas (Green et al., 1998). Estructuralmente, todas las cadenas α presentan en su dominio extracelular un número variable de sitios de unión a cationes divalentes y presentan homología entre sí, aunque no con las cadenas β . Estas homologías afectan al dominio citoplasmático, al dominio transmembranario y a determinadas regiones del dominio extracelular (Takada et al., 1989). Las cadenas β son estructuras muy conservadas, cuyo dominio extracelular presenta una región con abundantes residuos de cisteína y una región altamente conservada con afinidad por el

2. Caracterización de dos anticuerpos frente dos β_2 integrinas

dominio I de las subunidades α , crítico para el reconocimiento del ligando (Green et al., 1997).

La subfamilia de las β_2 integrinas, también conocidas como integrinas leucocitarias, está constituida por heterodímeros $\alpha\beta$ que comparten CD18 (β_2) como subunidad β y que se expresan únicamente en leucocitos (Larson & Springer, 1990). Cada uno de estos heterodímeros constituye una molécula distinta, con sus propias características y funciones, siendo las más estudiadas LFA-1 (CD11a/CD18), Mac-I (CD11b/CD18) y p150,95 (CD11c/CD18). También presentan diferencias en su distribución tisular, pues mientras LFA-1 está presente en todos los leucocitos, Mac-I y p150,95 están restringidas a macrófagos, neutrófilos y otras células mieloides (Champe et al., 1995). El miembro de esta subfamilia de más reciente identificación es $\alpha_D\beta_2$ (CD11d/CD18), que se expresa en macrófagos y en una subpoblación de linfocitos T CD8+ en perro y en la especie humana (Danilenko et al., 1995) y que aún no ha sido completamente caracterizado.

Las β_2 integrinas intervienen en numerosos procesos de la biología leucocitaria, desempeñando papeles claves en la respuesta inmune, la adhesión y la migración a través de los endotelios, la fagocitosis de agentes patógenos y la activación leucocitaria (Plow et al., 2000). La importancia de las

β_2 integrinas queda puesta de manifiesto en los pacientes afectados por LAD tipo I, una deficiencia en la capacidad de adhesión leucocitaria que se caracteriza por la ausencia o disminución importante de la expresión de las β_2 integrinas en la superficie de los leucocitos, lo que dificulta e incluso impide la

Integrinas	Ligandos
$\alpha_L\beta_2$ (CD11a/CD18)	ICAM-1, 2, 3, 4, 5
$\alpha_M\beta_2$ (CD11b/CD18)	Factor X, fibrinógeno, iC3b, ICAM-1, factor inhibidor de neutrófilos, Candida albicans
$\alpha_X\beta_2$ (CD11c/CD18)	Fibrinógeno, iC3b
$\alpha_D\beta_2$ (CD11d/CD18)	ICAM-3, VCAM-1

Tabla 2.1. Ligandos reconocidos por los distintos miembros de la subfamilia de las β_2 integrinas.

extravasación de neutrófilos y es causa de infecciones bacterianas recurrentes y de defectos en la cicatrización (Harris et al., 2000). Sin embargo, la excesiva activación de estas moléculas también es causa de trastornos, como inflamación prolongada y daños tisulares. Entre los ligandos reconocidos por las β_2 integrinas destacan los miembros de la familia de las moléculas de adhesión intercelular (ICAM), que pertenecen a la superfamilia de las inmunoglobulinas, aunque también reconocen otras proteínas y polisacáridos (tabla 2.1).

2. Caracterización de dos anticuerpos frente dos β_2 integrinas

CD11a/CD18, también conocido como LFA-1 (antígeno asociado a la función leucocitaria-1), es el miembro de la subfamilia de las β_2 integrinas más ampliamente distribuido, expresándose en la práctica totalidad de los leucocitos y en macrófagos. Comparte con el resto de miembros de esta subfamilia la subunidad β_2 , con un peso molecular aproximado de 95 kDa, y su subunidad α es la α_L , con un peso molecular de 170 kDa (Hogg & Martz, 2002). Aunque LFA-1 fue originalmente identificado mediante el empleo de anticuerpos monoclonales que inhibían la lisis mediada por células T, interviene en una gran número de funciones leucocitarias, incluyendo respuestas de linfocitos B y T colaboradores, actividad de las células NK, citotoxicidad dependiente de anticuerpos mediada por monocitos y granulocitos y adherencia de leucocitos a células endoteliales, fibroblastos y células epiteliales (Springer, 1990). Esta integrina media en eventos adhesivos tanto heterotípicos como homotípicos entre leucocitos y un amplio abanico de otros celulares que expresan al menos uno de sus ligandos, que pertenecen a la familia de las moléculas de adhesión intercelular: ICAM-1, ICAM-2 e ICAM-3 (Landis et al, 1993). ICAM-1 (CD54) se expresa en muchos tipos celulares, entre ellos leucocitos y células endoteliales; ICAM-2 (CD102) se expresa en leucocitos, células endoteliales y plaquetas, mientras que la distribución de ICAM-3 (CD50) se restringe a leucocitos (Binnerts et al., 1996). Dos moléculas relacionadas con la familia de las ICAM, ICAM-4 e ICAM-5, están siendo estudiadas por su posible interacción con LFA-1 (Hogg & Martz, 2002).

Al igual que el resto de las integrinas, la avidéz de CD11a/CD18 por sus ligandos depende del estado de activación de la célula en que se exprese (Landis et al., 1993). Así, la adhesión mediada por LFA-1 requiere de la activación de dicha molécula, que puede producirse por tres vías diferentes: agonistas que desencadenan una señal de tipo “inside-out” mediante interacción con otros receptores de membrana como el complejo TCR/CD3; cambios en las concentraciones extracelulares de cationes divalentes Ca^{2+} , Mn^{2+} y Mg^{2+} ; y la unión de anticuerpos activadores anti-LFA-1 (Landis et al., 1994).

El conocimiento de las β_2 integrinas y en especial de LFA-1 tiene un gran interés desde el punto de vista clínico por su papel en el trasplante de órganos, puesto que la respuesta inmune adquirida que origina el rechazo depende de interacciones entre las células del sistema inmune del receptor y los tejidos del órgano trasplantado que son mediadas por moléculas de adhesión, entre las que destaca LFA-1 (Dedrick et al., 2002). En

2. Caracterización de dos anticuerpos frente dos β_2 integrinas

lo que respecta al xenotrasplante, se ha destacado la implicación de LFA-1 en el rechazo vascular y celular agudo que, de superarse la fase de rechazo hiperagudo, causa la destrucción del órgano trasplantado en unos días. Dicho papel está relacionado con la mediación de CD11a/CD18, mediante su interacción con ICAM-1, en la adhesión de los neutrófilos y linfocitos humanos al endotelio vascular porcino, paso previo a la diapédesis de los leucocitos a los tejidos del órgano trasplantado (Robinson et al., 1998). Diversos estudios “in vitro” llevados a cabo hasta la fecha destacan el mantenimiento de las interacciones entre receptores celulares de adhesión leucocitarios y endoteliales por encima de la barrera entre la especie humana y porcina, en particular de LFA-1 e ICAM-1 (Robinson et al., 1998; Warrens et al., 2000; Hauzenberger et al., 2000), de modo que la migración de los leucocitos humanos a través del endotelio vascular porcino es tan eficaz como a través del endotelio humano.

Recientemente se ha puesto en evidencia la implicación de LFA-1 en la infección por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), siendo la expresión de este marcador de membrana importante para la interacción inicial entre el virus y la célula, la replicación subsiguiente y la transmisión de célula a célula (Hioe et al., 2001).

Las β_2 integrinas se han estudiado, además de en la especie humana y en ratón, en distintas especies domésticas, como por ejemplo en conejo (Galea-Lauri et al., 1993), perro (Yang et al., 1994), oveja (Gupta et al., 1995) y vaca (Letesson & Delcommenne, 1993). En esta última especie se ha señalado el papel de LFA-1 como receptor de la leucotoxina de *Pasteurella haemolytica* (Jeyaseelan et al., 2000).

En la especie porcina se ha caracterizado el homólogo de LFA-1 mediante el empleo de anticuerpos monoclonales específicos frente a sus subunidades α y β , habiéndose constatado una distribución celular y un peso molecular similares a los descritos para otras especies (Álvarez et al., 2000). Con anterioridad se había clonado el gen que codifica la integrina β_2 (Lee et al., 1996).

En este capítulo se describe la caracterización de dos anticuerpos monoclonales, GP2B7 y GP3D10, obtenidos mediante inmunización con PBMC de cerdo y que reconocen específicamente CD11a y CD18 porcino, respectivamente.

2.2 Resultados

2.2.1 Selección y determinación del isotipo de los anticuerpos GP2B7 y GP3D10

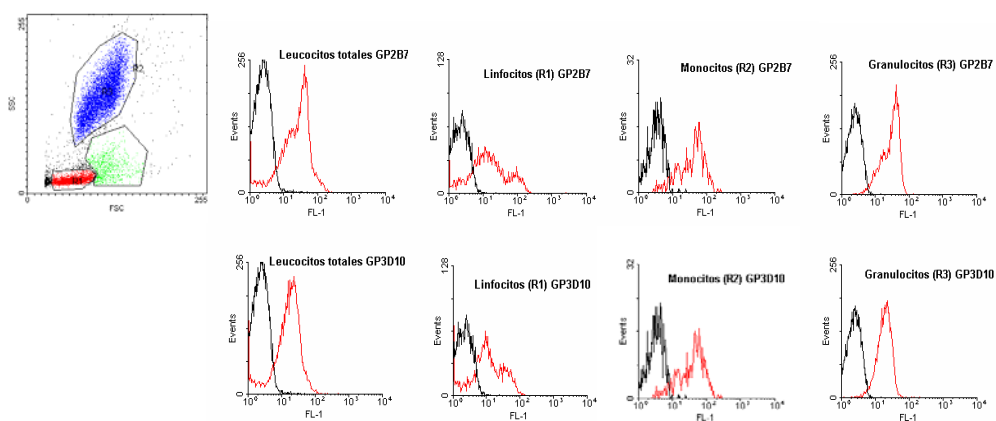
Los hibridomas GP2B7 y GP3D10 fueron seleccionados inicialmente por su reacción positiva en ELISA indirecto frente a PBMC porcinos. Antes de proceder a su caracterización se comprobó su positividad en citometría de flujo frente a leucocitos porcinos (figura 2.1) y se determinó su isotipo, que fue IgG1 en ambos casos.

2.2.2 Distribución celular

Mediante el empleo de técnicas de citometría de flujo se analizó la reactividad de los anticuerpos monoclonales GP2B7 y GP3D10 con distintas poblaciones leucocitarias porcinas, así como en plaquetas, eritrocitos, macrófagos alveolares y suspensiones celulares de timo y bazo.

El antígeno reconocido por el anticuerpo GP2B7 se expresaba muy ampliamente, apareciendo en las distintas subpoblaciones de leucocitos, en macrófagos alveolares, en timocitos y en esplenocitos. Cabe destacar que en linfocitos se observó una distribución bimodal. En plaquetas y eritrocitos se obtuvieron valores próximos al control (figura 2.1). La distribución del antígeno reconocido por GP3D10 se asemejaba a la del reconocido por GP2B7 y sus histogramas eran muy similares (figura 2.1).

Se procedió al estudio de la distribución de uno y otro anticuerpo mediante citometría con dos fluorocromos sobre PBMC enfrentándolo a BA3H2, un anticuerpo específico frente a CD18 porcino. Las distribuciones de GP3D10 y BA3H2 se solapaban perfectamente, mientras que las de GP2B7 y BA3H2 eran similares, pero presentaban algunas diferencias (figura 2.2).



2. Caracterización de dos anticuerpos frente dos β_2 integrinas

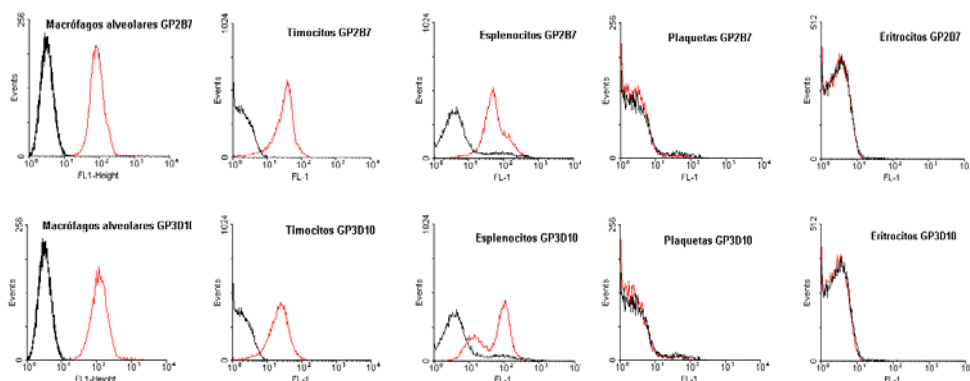


Figura 2.1. Análisis mediante citometría de flujo de la expresión de los antígenos reconocidos por los anticuerpos GP2B7 y GP3D10 (en rojo) en diversas poblaciones celulares. En negro, los controles negativos.

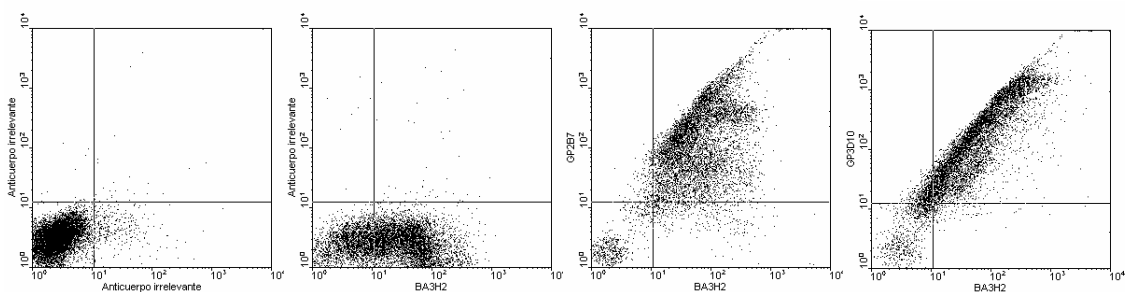


Figura 2.2. Estudio de la distribución de los antígenos reconocidos por GP2B7 y GP3D10 frente a un anticuerpo anti-CD18 (BA3H2).

2.2.3 Reactividad cruzada

En los estudios de reactividad cruzada mediante citometría de flujo el anticuerpo GP3D10 reaccionó con leucocitos de la especie humana (figura 2.3).

2.2.4 Caracterización bioquímica

Mediante inmunoprecipitación realizada con el anticuerpo monoclonal GP2B7 sobre lisados de PBMC se identificaron dos bandas de aproximadamente 95 y 170 kDa de peso molecular. Este resultado se obtuvo tanto en condiciones reductoras como no reductoras (figura 2.4). La más ligera de estas bandas se correspondía en peso molecular con la más ligera de las dos bandas inmunoprecipitadas por el anticuerpo BL3F1, que reconoce CD11R3, mientras que en las bandas pesadas aparecían

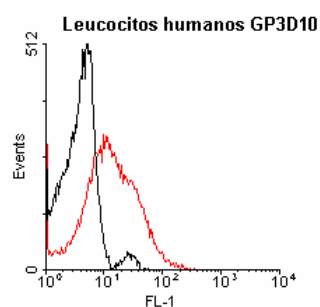


Figura 2.3. Reacción en citometría de flujo de GP3D10 (en rojo) con leucocitos humanos. En negro, el control negativo.

2. Caracterización de dos anticuerpos frente dos β_2 integrinas

diferencias, siendo sensiblemente más pesada la inmunoprecipitada por GP2B7 (figura 2.5). Por otro lado, mediante inmunoblotting en condiciones reductoras sobre lisados de PBMC se observó que el anticuerpo GP2B7 reconocía específicamente una única banda de un peso aproximado de 170 kDa (figura 2.6). Este dato coincidía con los resultados obtenidos en la inmunoprecipitación y define y localiza el epítipo reconocido por GP2B7 sobre el complejo de glicoproteínas previamente obtenido por inmunoprecipitación.

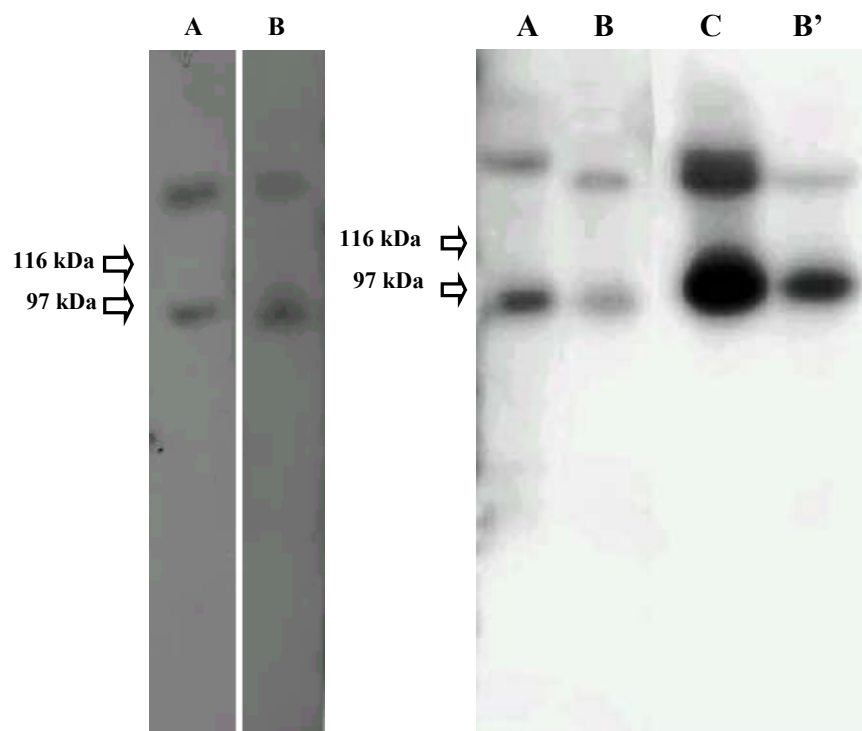
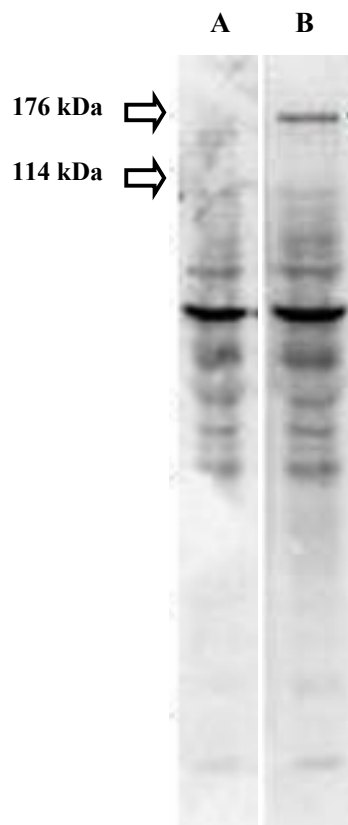


Figura 2.4. Bandas inmunoprecipitadas por GP2B7 de un lisado de PBMC en condiciones reductoras (carril A) y no reductoras (carril B). A la izqda. los patrones de peso molecular.

Figura 2.5. Inmunoprecipitación en condiciones reductoras sobre lisados de PBMC con los anticuerpos GP2B7 (carril A), BL3F1 (carriles B y B') y GP3D10 (carril C). A la izqda. los patrones de peso molecular.

Por su parte, el anticuerpo GP3D10 inmunoprecipitó tres bandas de 95, 155 y 170 kDa de peso molecular, tanto en condiciones reductoras como no reductoras (figura 2.7). El peso molecular de las dos bandas más ligeras se correspondía con el de las bandas inmunoprecipitadas por BL3F1, mientras que la banda más pesada era similar a la de 170 kDa inmunoprecipitada por GP2B7 (figura 2.5).



2. Caracterización de dos anticuerpos frente dos β_2 integrinas

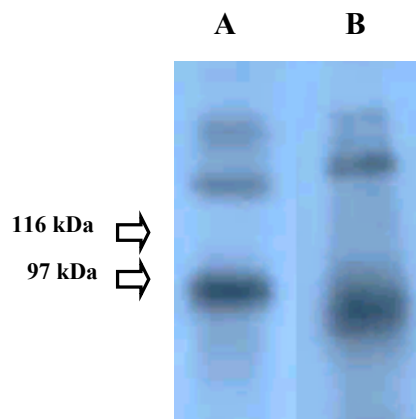


Figura 2.6. (izqda.) Inmunoblotting de un lisado de PBMC con el anticuerpo GP2D7 (tira B). La tira A fue incubada con un anticuerpo irrelevante. A la izqda. los patrones de peso molecular.

Figura 2.7. Bandas inmunoprecipitadas por GP3D10 de un lisado de PBMC en condiciones reductoras (carril A) y no reductoras (carril B). A la izqda. los patrones de peso molecular.

2.2.5 Mapeo epitópico

Mediante citometría de flujo sobre PBMC se estudió si la unión del anticuerpo BA3H2 a su antígeno bloqueaba la de GP3D10 y viceversa (figura 2.8). También se estudió si los anticuerpos BL1H8 y BL2F1, dos anticuerpos frente a CD11a porcino, bloqueaban la unión de GP2B7 a su antígeno (figura 2.9). El porcentaje de inhibición se calculó del modo anteriormente explicado (ver sección 1.2.4).

La preincubación de los PBMC con sobrenadante de BA3H2 bloqueaba parcialmente la unión de GP3D10 marcado con biotina a su antígeno, con un porcentaje de inhibición del 53%, mientras que la preincubación con sobrenadante de GP3D10 la bloqueaba casi totalmente (porcentaje de inhibición del 86%). Sin embargo, la preincubación con sobrenadante de GP3D10 no bloqueaba la unión de BA3H2 marcado con biotina a su antígeno (0% de inhibición), que sí era inhibida por la preincubación con sobrenadante de BA3H2 (94% de inhibición).

Por su parte, la preincubación con sobrenadante de BL1H8 y BL2F1 no tuvo apenas efecto sobre la unión de GP2B7 marcado con biotina, con unos porcentajes de inhibición del 14% y el 0%, respectivamente. La preincubación con sobrenadante de GP2B7 bloqueaba la unión del anticuerpo marcado con biotina en un 83%.

2. Caracterización de dos anticuerpos frente dos β_2 integrinas

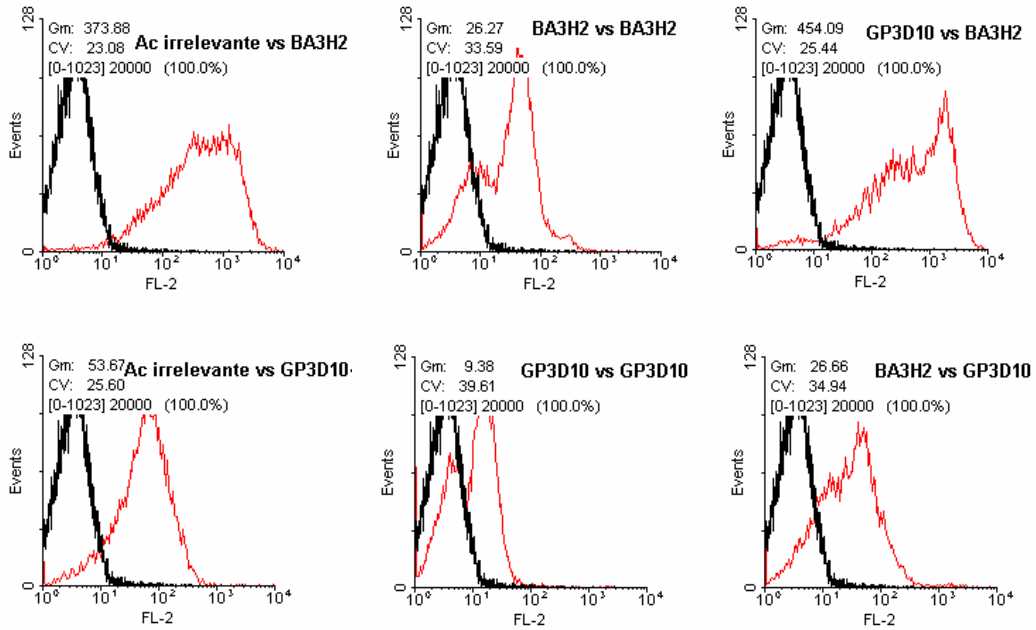


Figura 2.8. Estudio de la capacidad de bloqueo de la unión al antígeno de GP3D10 frente a BA3H2 y viceversa. El anticuerpo mencionado en segundo lugar es el marcado con biotina.

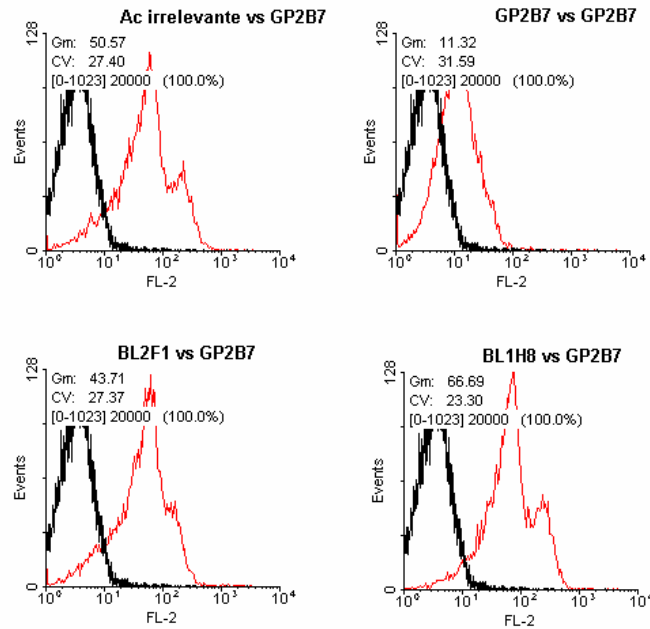


Figura 2.9 Estudio de la capacidad de los anticuerpos BL3F1 y BL1H8 de bloquear la unión a su antígeno del anticuerpo GP2B7 marcado con biotina.

2.3 Discusión

2.3.1 Distribución celular y caracterización bioquímica

Mediante el desarrollo de anticuerpos monoclonales dirigidos contra PBMC porcinos se obtuvieron dos anticuerpos, GP2B7 y GP3D10, que reconocían antígenos de muy similar distribución celular. Así, en los estudios llevados a cabo mediante citometría de flujo ambos anticuerpos reconocieron estructuras presentes en todas las subpoblaciones leucocitarias y ausentes de plaquetas y eritrocitos, siendo los histogramas de uno y otro anticuerpo muy similares, destacando la peculiaridad de que para ambos anticuerpos se observa una distribución bimodal en linfocitos (figura 2.1). El comportamiento de estos dos anticuerpos en inmunoprecipitación también fue parecido, inmunoprecipitando GP2B7 una glicoproteína de 95 y 170 kDa de peso molecular (tanto en condiciones reductoras como no reductoras) y GP3D10 una de 95, 155 y 170 kDa (figuras 2.4 y 2.7).

Estos datos de distribución celular e inmunoprecipitación son muy similares a los previamente descritos para el complejo LFA-1 en la especie porcina (Hildreth et al., 1989; Álvarez et al., 2000), lo que hacía muy probable que los anticuerpos GP2B7 y GP3D10 reconocieran alguna de las dos integrinas que conforman dicho complejo: α_L (CD11a) y β_2 (CD18). También la distribución bimodal en linfocitos, en contraposición al resto de poblaciones leucocitarias, es característica de estas integrinas (Dato & Kim, 1990; Kim et al., 1994). Otro indicio que apuntaba en este sentido era el que ambos anticuerpos coimmunoprecipitaran algunas de las bandas inmunoprecipitadas por BL3F1 (figura 2.5), un anticuerpo frente a CD11R3 porcino (un miembro de la subfamilia de las β_2 integrinas porcinas) que inmunoprecipita un complejo de dos bandas de 95 y 155 kDa que se corresponden con CD18 y CD11R3, respectivamente (Domínguez et al., 2001).

Las tres bandas inmunoprecipitadas por GP3D10 se corresponden por su peso molecular con las que inmunoprecipitan distintos anticuerpos que reconocen CD18 porcino (Hildreth et al., 1989; Kim et al., 1994; Bullido et al., 1996; Álvarez et al., 2000), lo que hacía muy probable que este anticuerpo reconociera dicha integrina. Esta hipótesis se vio confirmada por la comparación, mediante citometría con dos fluorocromos, de las distribuciones en PBMC de GP3D10 y BA3H2, un anticuerpo frente a CD18 porcino (Álvarez et al., 2000). Las distribuciones de uno y otro anticuerpo se solaparon

2. Caracterización de dos anticuerpos frente dos β_2 integrinas

perfectamente (figura 2.2), como sería de esperar de anticuerpos que reconocen el mismo antígeno de membrana.

Por su parte, el antígeno reconocido por GP2B7 presentaba ciertas diferencias en su distribución con CD18, como se puso de evidencia al compararlo mediante citometría doble con BA3H2 (figura 2.2), lo que junto a los resultados en inmunoprecipitación, similares a los obtenidos con anticuerpos frente a CD11a porcino (Álvarez et al., 2000), apuntaba a que el anticuerpo en cuestión reconocía dicha integrina, complementaria de CD18 en el complejo LFA-1. Los resultados en inmunoblotting permitieron localizar el epítipo reconocido por GP2B7 en la banda de 170 kDa y confirmaron que se trataba de un anticuerpo frente a CD11a porcino.

2.3.2 Reactividad cruzada

En nuestro estudio sobre reactividad cruzada con distintas especies, el anticuerpo GP3D10 reaccionó con leucocitos de la especie humana, aunque no de cabra, oveja ni vaca (resultados no mostrados). Existen numerosas reseñas en la literatura sobre reacciones cruzadas de anticuerpos monoclonales frente a CD18 de distintas especies. Así, por ejemplo, Hildreth y colaboradores (1989) caracterizaron una serie de anticuerpos monoclonales frente a CD18 porcino que reaccionaban con antígenos expresados en leucocitos humanos y en diversas especies animales (rata, ratón, hámster, conejo, perro y vaca). Anticuerpos frente a CD18 humano que reconocen su homólogo porcino también han sido descritos (Jacobsen et al., 1993; Kumagai et al., 1995), así como anticuerpos frente a CD18 de conejo y perro que reaccionan con leucocitos porcinos (Brodersen et al., 1998).

Esta abundancia de anticuerpos frente a CD18 que reconocen dicha molécula en especies distintas a aquella para la que fueron desarrollados se ha atribuido a la presencia en la integrina β_2 de epítipos altamente conservados (Hildreth et al., 1989).

2.3.3 Mapeo epitópico

En un intento de determinar el epítipo reconocido por GP2B7 se estudió la capacidad de BL1H8 y BL2F1, dos anticuerpos frente a CD11a porcino que reconocen epítipos distintos (Álvarez et al., 2000), de bloquear la unión de nuestro anticuerpo a su propio epítipo. Ninguno de estos anticuerpos tuvo capacidad de bloquear la unión de GP2B7 a su antígeno, por lo que concluimos que reconoce un epítipo distinto a los

2. Caracterización de dos anticuerpos frente dos β_2 integrinas

definidos por BL1H8 y BL2F1. Si bien en la especie porcina no existen demasiados estudios sobre los epítomos reconocidos por los anticuerpos frente a CD11a, en la especie humana sí se han llevado a cabo diversos estudios que ponen en relación la capacidad de distintos anticuerpos de inhibir o activar las funciones de LFA-1 con el reconocimiento de unos u otros epítomos del dominio I de la integrina α_L (Landis et al., 1993; Champe et al., 1995; Binnersts et al., 1996). Sería de interés llevar a cabo estudios de este tipo en la especie porcina para una mejor caracterización del homólogo de LFA-1 y su comparación con la especie humana, para lo cual sería de interés disponer de una amplia batería de anticuerpos frente a dicha molécula, como los dos caracterizados en este trabajo.

Para la localización del epítomo reconocido por GP3D10 lo enfrentamos a BA3H2, uno de los diversos anticuerpos frente a CD18 porcino caracterizados. Aparentemente, BA3H2 inhibía parcialmente la unión de GP3D10 a su antígeno, pero GP3D10 no inhibía la de BA3H2. Un fenómeno similar se observó durante la caracterización en los workshops de antígenos leucocitarios porcinos de MUC76A, un anticuerpo frente a CD18 porcino que aparentemente no bloqueaba la unión de PNK-I, el anticuerpo prototipo de este marcador (Kim et al., 1994), hasta que en estudios posteriores se demostró que PNK-I bloqueaba la unión de MUC76A a CD18 y se asignó al mismo epítomo (Haverson et al., 1998). Esta divergencia en los resultados de uno y otro experimento fue atribuida a posibles diferencias en la afinidad o el título de los anticuerpos. En este caso podría ocurrir algo similar, no pudiendo descartar que GP3D10 reconozca el mismo epítomo que BA3H2, pero estudios más detallados serían necesarios para confirmar o desmentir esta hipótesis.

2.3.4 Posibles aplicaciones

Dado el papel desempeñado por LFA-1 en la adhesión de los leucocitos al endotelio vascular y la importancia de dicha función en los fenómenos de rechazo vascular y celular agudo en el trasplante de órganos, anticuerpos frente a CD11a y CD18 humanos se han empleado en numerosos estudios “in vitro” sobre la adhesión y la migración de los leucocitos humanos a través del endotelio vascular porcino (Zhang & Feng, 2000; Hauzenberger et al., 2000; Schneider et al., 2002) y las implicaciones de dichos fenómenos en el xenotrasplante de órganos porcinos a pacientes humanos. En lo que respecta al alotrasplante, se ha propuesto el empleo de anticuerpos frente a CD11a por su función

2. Caracterización de dos anticuerpos frente dos β_2 integrinas

como cardioprotectores en pacientes trasplantados de corazón (Oubenaissa et al, 1996; Poston et al., 2000) y también para mejorar la tasa de supervivencia en trasplantes de intestino delgado (Sarnacki et al., 2000). Otra posible aplicación de estos anticuerpos sería en el tratamiento de la psoriasis, al inhibir la activación de células T, su migración a la piel y sus funciones citotóxicas (Gottlieb et al., 2000). Un anticuerpo humanizado anti-CD11a ha demostrado buenos resultados en el tratamiento de esa enfermedad y también en los ensayos clínicos preliminares en pacientes trasplantados de riñón (Dedrick et al., 2002).

Anticuerpos monoclonales frente a CD11a y CD18 porcinos se han empleado en diversos estudios “in vivo” en que se recurre al cerdo como modelo animal. Así, dichos anticuerpos se han utilizado en estudios sobre la implicación de LFA-1 en la respuesta a procesos infecciosos (Walsh et al., 1991; Lyden et al, 1998; Ljungdahl et al., 2000) o en la recuperación tras procesos isquémicos (Fletcher et al., 1993; Gayle et al., 2002). También se ha propuesto el cerdo como modelo experimental en el que probar el efecto de los anticuerpos frente a LFA-1 en el rechazo en alotrasplantes (Hildreth et al., 1989).

En el estudio del sistema inmune porcino los anticuerpos frente a CD11a y CD18 han sido empleados en la definición de distintas subpoblaciones leucocitarias (Summerfield & McCullough, 1997; Arriëns et al., 1998; Chamorro et al, 2000) y en trabajos sobre la maduración de los monocitos (McCullough et al., 1997; Chamorro et al., 2000). También en estudios sobre Sanidad Animal son de interés anticuerpos monoclonales frente a LFA-1 porcino como los caracterizados en este trabajo. Así, por ejemplo, un anticuerpo frente a CD18 se ha empleado para el estudio de la interacción entre los granulocitos porcinos y *Bordetella bronchiseptica*, uno de los agentes causales de la rinitis atrófica (Register et al, 1994).

2.3.5 Conclusiones

En este capítulo se describen dos anticuerpos monoclonales, GP2B7 y GP3D10, que reconocen e inmunoprecipitan las cadenas α y β de LFA-1 porcino (CD11a/CD18), respectivamente. El epítipo reconocido por el anticuerpo GP2B7 es diferente al reconocido por los anticuerpos monoclonales frente a CD11a porcino BL1H8 y BL2F1. La definición del epítipo reconocido por GP3D10 no fue posible, aunque existen indicios de que sea el mismo que reconoce BA3H2, uno de los anticuerpos empleados en la caracterización de

CD18 porcino. Los anticuerpos GP2B7 y GP3D10 podrían ser herramientas de interés en estudios relacionados con los xenotrasplantes, la Sanidad Animal y la fisiología de los leucocitos porcinos.

2.4 Bibliografía

- Álvarez B, Doménech N, Alonso F, Sánchez C, Gómez del Moral M, Ezquerra A, Domínguez J, 2000. Molecular and functional characterization of porcine LFA-1 using monoclonal antibodies to CD11a and CD18. *Xenotransplantation* 7: 258-266.
- Arriëns MA, Summerfield A, McCullough KC, 1998. Differential adhesion molecule expression on porcine mononuclear cell populations. *Scand J Immunol* 47: 487-495.
- Binnerts ME, van Kooyk Y, Edwards CP, Champe M, Presta L, Bodary SC, Figdor CG, Berman PW, 1996. Antibodies that selectively inhibit leukocyte function-associated antigen 1 binding to intercellular adhesion molecule-3 recognize a unique epitope within the CD11a I domain. *J Biol Chem* 271: 9962-9968.
- Brodersen R, Bijlsma F, Gori K, Jensen KT, Chen W, Domínguez J, Haverson K, Moore PF, Saalmüller A, Sachs D, Sliereendrecht WJ, Stokes C, Vainio O, Zuckermann. Aasted B, 1998. Analysis of the immunological cross reactivities of 213 well characterized monoclonal antibodies against various leukocyte surface antigens of human and 11 animal species. *Vet Immunol Immunopath* 64: 1-13.
- Bullido R, Alonso F, Gómez del Moral M, Ezquerra A, Alvarez B, Ortuño , Domínguez J, 1996. Monoclonal antibody 2F4/11 recognizes the alpha chain of a porcine beta 2 integrin involved in adhesion and complement mediated phagocytosis. *J Immunol Methods* 195: 125-134.
- Chamorro S, Revilla C, Alvarez B, Lopez_Fuertes L, Ezquerra A, Dominguez J, 2000. Phenotypic characterization of monocyte subpopulations in the pig. *Immunobiology* 202: 82-93.
- Champe M, McIntyre BW, Berman PW, 1995. Monoclonal antibodies that block the activity of leukocyte function-associated antigen 1 recognize three discrete epitopes in the inserted domain of CD11a. *J Biol Chem* 270: 1388-1394.
- Danilenko DM, Rossitto PV, Van der Vieren M, Le Trong H, McDonough SP, Affolter VK, Moore PF, 1995. A novel canine leukointegrin, alpha d beta 2, is expressed by specific macrophage subpopulations in tissue and a minor CD8+ lymphocyte subpopulation in peripheral blood. *J Immunol* 155: 35-44.
- Dato ME, Kim YB, 1990. Characterization and utilization of a monoclonal antibody inhibiting porcine natural killer cell activity for isolation of natural killer and killer cells. *J Immunol* 144 :4452-4462.
- Dedrick RL, Walicke P, Garovoy M, 2002. Anti-adhesion antibodies efalizumab, a humanized anti-CD11a monoclonal antibody. *Transpl Immunol* 9: 181-186.
- Domínguez J, Álvarez B, Alonso F, Thacker E, Haverson K, McCullough K, Summerfield A, Ezquerra A, 2001. Workshop studies on monoclonal antibodies in the myeloid panel with CD11 specificity. *Vet Immunol Immunopathol* 80: 111-119.

2. Caracterización de dos anticuerpos frente dos β_2 integrinas

- Fletcher MP, Stahl GL, Longhurst JC, 1993. C5a-induced myocardial ischemia: role for CD18-dependent PMN localization and PMN-platelet interactions. *Am J Physiol* 265: 1750-1761.
- Galea-Lauri J, Blackford J, Wilkinson JM, 1993. The expression of CD11/CD18 molecules on rabbit leucocytes: identification of monoclonal antibodies to CD18 and their effect on cellular adhesion processes. *Mol Immunol* 30 :529-537.
- Gottlieb A, Krueger JG, Bright R, Ling M, Lebwohl M, Kang S, Feldman S, Spellman M, Wittkowski K, Ochs HD, Jardieu P, Bauer R, White M, Dedrick R, Garovoy M, 2000. Effects of administration of a single dose of a humanized monoclonal antibody to CD11a on the immunobiology and clinical activity of psoriasis. *J Am Acad Dermatol* 42: 428-435.
- Green L, Mould AP, Humphries MP, 1998. The integrin β subunit. *Int J Biochem Cell Biol* 30: 179-184.
- Gupta VK, McConnell I, Pepin M, Davis WC, Dalziel RG, Hopkins J, 1995. Biochemical and phenotypic characterization of the ovine beta 2 (leucocyte) integrins. *J Comp Pathol* 112: 339-349.
- Harris ES, McIntyre TM, Prescott SM, Zimmerman GA, 2000. The leukocyte integrins. *J Biol Chem* 31: 23409-23412.
- Hauzenberger E, Hauzenberger D, Hultenby K, Holgersson J, 2000. Porcine endothelium supports transendothelial migration of human leukocyte subpopulations: anti-porcine vascular cell adhesion molecule antibodies as species-specific blockers of transendothelial monocyte and natural killer cell migration. *Transplantation* 69: 1837-1849.
- Haverson K, Zuckermann F, Saalmüller A, Lipp J, Aasted B, Stokes CR, 1998. Summary of workshop findings for porcine adhesion molecule subgroup. *Vet Immunol Immunopathol* 60: 351-365.
- Hildreth JE, Holt V, August JT, Pescovitz MD, 1989. Monoclonal antibodies against porcine LFA-1: species cross-reactivity and functional effects of beta-subunit-specific antibodies. *Mol Immunol* 26: 883-895.
- Hioe CE, Chien PC, Lu C, Springer TA, Wang XH, Bandres J, Tuen M, 2001. LFA-1 expression on target cells promotes human immunodeficiency virus type 1 infection and transmission. *J Virol* 75: 1077-1082.
- Hogg N, Martz E, 2002. CD guide: CD11a. En Mason et al (Eds), *Leucocyte typing VII*. Oxford University Press, pp 757-758.
- Hynes RO, 1999. Cell adhesion: old and new questions. *Trends Cell Biol* 9: 33-37.
- Hynes RO, Zhao Q, 2000. The evolution of cell adhesion. *J Cell Biol* 150: 89-95.
- Jacobsen CN, Aasted B, Broe MK, Petersen JL, 1993. Reactivities of twenty anti-human monoclonal antibodies with leucocytes from ten different animal species. *Vet Immunol Immunopath* 39: 461-466.
- Jeyaseelan S, Hsuan SL, Kannan MS, Walcheck B, Wang JF, Kehrl ME, Lally ET, Sieck GC, Maheswaran SK, 2000. Lymphocyte function-associated antigen 1 is a receptor for *Pasteurella haemolytica* leukotoxin in bovine leukocytes. *Infect Immun* 68: 72-79.
- Kim YB, Zhang J, Davis WC, Lunney JK, 1994. CD11/CD18 panel report for swine CD workshop. *Vet Immunol Immunopathol* 43: 289-291.

2. Caracterización de dos anticuerpos frente dos β_2 integrinas

- Kumagai M, Schacter B, Yan Z, Michaelson J, Arn S, Smith M, White-Scharf M, Monroy R, Kurnich J, 1995. The cross-reactivity of anti-human adhesion mAb with primate and swine cells. En Schlossman SF et al. (Eds), Proceedings of the fifth international workshop and conference held in Boston USA. Oxford University Press, pp 1646-1648.
- Landis RC, Bennett RI, Hogg N, 1993. A novel LFA-1 activation epitope maps to the I domain. *J Cell Biol* 120: 1519-1527.
- Landis RC, McDowall A, Holness CLL, Littler AJ, Simmons DL, Hogg N, 1994. Involvement of the I domain of LFA-1 in selective binding to ligands ICAM-1 and ICAM-3. *J Cell Biol* 126: 529-537.
- Larson RS, Springer TA, 1990. Structure and function of leukocyte integrins. *Immunol Rev* 114: 181-217.
- Letesson JJ, Delcommenne M, 1993. Production of a monoclonal antibody to the light chain of the bovine beta 2-integrin family (BoCD18). *Vet Immunol Immunopathol* 39: 103-108.
- Ljungdahl M, Fossum C, Alm G, Haglund U, 2000 Immune cell distribution in gut-associated lymphoid tissue and synthesis of IL-6 in experimental porcine peritonitis. *Eur Surg Res* 32: 323-330.
- Lyden SP, Patton JH, Ragsdale DN, Croce MA, Fabian TC, Proctor KG, 1998. Transient inhibition of CD18-dependent leukocyte functions after hemorrhage and polymicrobial sepsis. *Surgery* 123 :679-691.
- McCullough KC, Schaffner R, Natale V, Kim YB, Summerfield A, 1997. Phenotype of porcine monocytic cells: modulation of surface molecule expression upon monocyte differentiation into macrophages. *Vet Immunol Immunopathol* 58: 265-275.
- Oubenaissa A, Mouas C, Bourgeois F, Le Deist F, Alberici G, Moalic JM, Menasche P, 1996. Evidence for an involvement of the neutrophil integrin lymphocyte function-associated antigen-1 in early failure of heart transplants. *Circulation* 94: 254-259.
- Plow EF, Haas TA, Zhang L, Loftus J, Smith JW, 2000. Ligand binding to integrins. *J Bio Chem* 29: 21785-21788.
- Poston RS, Robbins RC, Chan B, Simms P, Presta L, Jardieu P, Morris RE, 2000. Effects of humanized monoclonal antibody to rhesus CD11a in rhesus monkey cardiac allograft recipients. *Transplantation* 69: 2005-2013.
- Register KB, Ackermann MR, Kehrli ME, 1994. Non-opsonic attachment of *Bordetella bronchiseptica* mediated by CD11/CD18 and cell surface carbohydrates. *Microb Pathog* 17: 375-385.
- Robinson LA, Tu L, Steeber DA, Presi O, Platt JL, Tedder TF, 1998. The role of adhesion molecules in human leukocyte attachment to porcine vascular endothelium: implications for xenotransplantation. *J Immunol* 161: 6931-6938.
- Ruoshlati E, 1995. Integrin signaling and matrix assembly. *Tumor Biol* 17: 117-124.
- Sarnacki S, Auber F, Cretolle C, Camby C, Cavazzana_Calvo M, Muller W, Wagner N, Brousse N, Revillon Y, Fischer A, Cerf_Bensussan N, 2000. Blockade of the integrin alphaLbeta2 but not of integrins alpha4 and/or beta7 significantly prolongs intestinal allograft survival in mice. *Gut* 47: 97-104.
- Springer TA, 1990. Adhesion receptors of the immune system. *Nature* 346: 425-434.
- Summerfield A, McCullough KC, 1997. Porcine bone marrow myeloid cells: phenotype and adhesion molecule expression. *J Leukoc Biol* 62: 176-185.

2. Caracterización de dos anticuerpos frente dos β_2 integrinas

- Takada Y, Elices MJ, Crouse C, Hemler ME, 1989. The primary structure of α -4 subunit of VLA-4: homology to other integrins and possible cell-cell adhesion function. *EMBO J* 8: 1361-1368.
- Walsh CJ, Leeper-Woodford SK, Carey PD, Cook DJ, Bechard DE, Fowler AA, Sugerman HJ, 1991. CD18 adhesion receptors, tumor necrosis factor, and neutropenia during septic lung injury. *J Surg Res* 50: 323-329.
- Warrens AN, Simon AR, Theodore PR, Sachs DH, Sykes M, 2000. Cross-species compatibility of intercellular adhesion molecule-1 (CD54) with its ligands. *Transplantation* 69: 394-399.
- Yang WC, Esquenazi V, Carreno M, Vallone T, Fuller L, Roth D, Nery J, Burke G, Miller J, 1994. Characterization of a monoclonal antibody recognizing an epitope designated as canine leukocyte-associated antigen. *Transplantation* 58: 233-240.

3. OBTENCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE CUATRO ANTICUERPOS MONOCLONALES FRENTE A LA INTEGRINA β_1 PORCINA (CD29)

3.1 Introducción

La subfamilia de las β_1 integrinas está compuesta por doce heterodímeros $\alpha\beta$ que comparten CD29 (β_1) como subunidad β , constituyendo cada uno de estos heterodímeros una molécula distinta con sus propias características y funciones. La distribución tisular de las β_1 integrinas es muy amplia, siendo predominantemente receptores de moléculas de la matriz extracelular como fibronectina, colágeno, vitronectina y laminina, aunque algunas también actúan como receptores de ligandos celulares, como CD106 (VCAM-1) o la fertilina, o de la invasina, una proteína de membrana bacteriana que media la unión de las bacterias a las células eucariotas (Plow et al., 2000) (tabla 3.1).

Debido a que los primeros miembros de la subfamilia de las β_1 integrinas se definieron originalmente como heterodímeros que aparecían de 2 a 4 semanas después de la activación “in vitro” de linfocitos T, los miembros de esta subfamilia también reciben la denominación de VLA (very late antigens) (Hemler, 1988). Sin embargo, la expresión de estas moléculas no está restringida a los linfocitos T, puesto que prácticamente todos los tipos celulares, con la excepción de los eritrocitos, expresan en sus membranas una o varias de las β_1 integrinas (Tanaka, 1997a).

Al igual que el resto de integrinas, los miembros de la subfamilia de las β_1 integrinas intervienen en procesos de adhesión y migración celular y de transducción de señales, mediando en múltiples funciones (Cervella et al., 1993). Dada la amplia distribución celular de estas moléculas, estas funciones son claramente no específicas del sistema inmune. Las β_1 integrinas desempeñan un papel fundamental en la embriogénesis y el desarrollo, la hematopoyesis y las respuestas inflamatorias, entre otros importantes procesos fisiológicos (Brakebusch et al., 1997).

Los dos primeros miembros de la subfamilia de las β_1 integrinas, VLA-1 ($\alpha_1\beta_1$) y VLA-2 ($\alpha_2\beta_1$), fueron originalmente descritos como marcadores de activación linfocitarios. Sin embargo, otros miembros de esta subfamilia se expresan a niveles basales en leucocitos, sin necesidad de activación previa (Springer, 1990). En general, los niveles de

3. Caracterización de cuatro anticuerpos frente la β_1 integrina

expresión de las distintas β_1 integrinas en los leucocitos aumentan tras la estimulación antigénica (Hynes, 1992).

Integrinas	Ligandos	Expresión
$\alpha_1\beta_1$	Colágenos, laminina	Linfocitos T activados, monocitos, neuronas, células mesangiales y endoteliales, fibroblastos, músculo liso, sinusoides hepáticos y condrocitos
$\alpha_2\beta_1$	Colágenos, laminina	Plaquetas, linfocitos, monocitos, fibroblastos, endotelio glomerular renal, túbulo distales y colectores
$\alpha_3\beta_1$	Colágenos, fibronectina, laminina, trombospondina	Linfocitos B, monocitos, membrana basal de los queratinocitos, podocitos glomerulares y conductos colectores del riñón y neuronas
$\alpha_4\beta_1$	Fibronectina, VCAM-1, trombospondina, invasina	Linfocitos, monocitos, polimorfonucleares y células NK
$\alpha_5\beta_1$	Colágenos, fibronectina, fibrinógeno, invasina	Células endoteliales, polimorfonucleares, monocitos, linfocitos T y páncreas
$\alpha_6\beta_1$	Invasina, laminina, fertilina	Óvulo, células nerviosas, linfocitos, plaquetas, monocitos, macrófagos y otros tipos celulares
$\alpha_7\beta_1$	Laminina	Muy amplia distribución, incluyendo músculo estriado y miocardio
$\alpha_8\beta_1$	Citotactina/tenascina-C, fibronectina, osteopontina, vitronectina	Músculo liso, células nerviosas embrionarias, células mesangiales renales y miofibroblastos del pulmón
$\alpha_9\beta_1$	Colágenos, citotactina/tenascina-C, laminina, osteopontina	Epitelios, membrana basal del epitelio escamoso, músculo liso y esquelético y hepatocitos
$\alpha_{10}\beta_1$	Colágenos, condroadherina, laminina	Músculo estriado
$\alpha_{11}\beta_1$	Colágenos, vinculina	Útero, corazón, músculo liso, páncreas, riñón y placenta
$\alpha_v\beta_1$	Fibronectina, fibrinógeno, osteopontina, vitronectina	Óvulo y precursores oligodendrocíticos

Tabla 3.1. Ligandos reconocidos por los distintos miembros de la subfamilia de las β_1 integrinas y principales poblaciones celulares y tejidos en que se expresan.

Existen diferencias en la expresión de las β_1 integrinas entre las distintas subpoblaciones de leucocitos, siendo VLA-4 ($\alpha_4\beta_1$) la expresada con mayor intensidad en linfocitos no activados. Los linfocitos B no activados también expresan pequeñas cantidades de VLA-2 y VLA-3 ($\alpha_3\beta_1$), pero no VLA-1, VLA-5 ($\alpha_5\beta_1$) ni VLA-6 ($\alpha_6\beta_1$). Los linfocitos T expresan normalmente VLA-4, VLA-5 y VLA-6, y VLA-1 y VLA-2 sólo si están activados. En monocitos hay expresión de VLA-2, VLA-4, VLA-5 y VLA-6, así como de VLA-1 y VLA-3 a bajos niveles (Hemler, 1990). Eosinófilos y basófilos expresan

3. Caracterización de cuatro anticuerpos frente la β_1 integrina

VLA-4 y VLA-5, mientras que no existe prácticamente expresión de β_1 integrinas en los neutrófilos (Tanaka, 2002).

Al igual que en otros tipos celulares, estas moléculas median en la unión de los leucocitos a las proteínas de la matriz extracelular y desempeñan un importante papel en la extravasación y migración de estas células a los tejidos durante la respuesta inmune (Hynes, 1992). Es especialmente significativa a este respecto la función de VLA-4, que reconoce un ligando celular (VCAM-1), interviniendo en la adhesión de linfocitos, monocitos, eosinófilos, basófilos y células NK a células endoteliales activadas, paso previo a su extravasación (Carlos & Harlan, 1994). Este mecanismo de interacción entre VLA-4 y VCAM-1 permite la migración a los sitios de inflamación de los linfocitos de pacientes afectados de defectos congénitos de las β_2 integrinas, mientras que los neutrófilos, que no expresan este heterodímero, pierden por completo la capacidad de migrar (Springer, 1990).

El conocimiento de las β_1 integrinas tiene un gran interés desde el punto de vista clínico por su papel en el xenotrasplante y en el cáncer. Su importancia en el xenotrasplante viene dada en primer lugar por la implicación directa de CD29 en el rechazo hiperagudo, que tiene lugar como consecuencia de la existencia en el suero humano de anticuerpos naturales que reaccionan con determinados antígenos del endotelio vascular porcino, provocando el rechazo del órgano trasplantado en un breve periodo de tiempo (Joziase & Oriol, 1999). La mayoría de estos anticuerpos reconocen el epítipo Gal- α -(1,3)-Gal, presente como residuo de glicosilación en las integrinas, siendo la integrina β_1 porcina la reconocida de manera más eficiente por los anticuerpos naturales humanos (Richard et al., 1998).

Las β_1 integrinas también están relacionadas con el rechazo vascular y celular agudo, dada la implicación de VLA-4 en la adhesión de los monocitos y linfocitos humanos al endotelio vascular porcino, paso previo a la diapédesis de estas células a los tejidos del órgano trasplantado (Robinson et al., 1998). Diversos estudios “in vitro” destacan el mantenimiento de la interacción VLA-4 y VCAM-1 por encima de la barrera entre las especies humana y porcina (Robinson et al., 1998; Zhang & Feng, 2000; Hauzenberger et al., 2000; Schneider et al., 2002), de modo que la migración de los leucocitos humanos a través del endotelio vascular porcino mediada por VLA-4 es tan eficaz como a través del endotelio humano.

3. Caracterización de cuatro anticuerpos frente la β_1 integrina

Dado que las interacciones de las β_1 integrinas con la matriz extracelular son de capital importancia en la hematopoyesis y que una de las vías que se han propuesto para la inducción de tolerancia en los receptores de órganos de origen porcino es el trasplante de células hematopoyéticas de cerdo, el estudio del papel de estas moléculas en la interacción entre las células hematopoyéticas porcinas y el entorno medular humano puede tener importantes aplicaciones en el campo del xenotrasplante (Simon et al., 1998; Dalla Riva et al., 2000; Theodore et al., 2002)

Con respecto al cáncer, el interés de las integrinas, y en concreto de la familia de las β_1 integrinas, viene definido por su implicación en multitud de procesos celulares que afectan al desarrollo de los tumores, como por ejemplo la apoptosis y la regulación de la proliferación, la angiogénesis, la motilidad celular y la capacidad invasiva, procesos estos dos últimos directamente relacionados con la capacidad de metástasis (Varner & Cheresch, 1996). Las β_1 integrinas están muy involucradas en este tipo de procesos, lo que se manifiesta en la modificación de su expresión en distintos tipos de células tumorales, entre los que se pueden destacar neuroblastomas (Bonfoco et al., 2000), tumores colorrectales (Fujita et al., 1995), carcinomas pulmonares (Koukoulis et al., 1997) o melanomas (Castel et al., 2000).

La integrina β_1 (CD29) se ha estudiado en distintas especies animales, siendo de hecho la integrina β_1 de pollo la primera estructura de integrina descrita (Tamkun et al., 1986). También se ha estudiado la subunidad β_1 bovina por su papel en el desarrollo de la preimplantación embrionaria (MacLaren & Wildeman, 1995). En nuestro laboratorio se ha secuenciado y caracterizado el homólogo porcino de CD29 (Jiménez Marín et al., 2000). El número de anticuerpos monoclonales frente a CD29 porcino es aún escaso. Sólo se ha caracterizado completamente un anticuerpo monoclonal específico frente a CD29 porcino (Richard et al., 1998), mientras otros dos estudiados en el segundo Workshop no están aún completamente caracterizados (Haverson et al., 1998).

Dada la importancia de la β_1 integrina porcina en el xenotrasplante, sería interesante la obtención de nuevos anticuerpos monoclonales frente a la misma que permitieran profundizar más en su estudio. En la primera sección de este capítulo se describe la caracterización de un anticuerpo monoclonal, GP4B4, obtenido mediante inmunización con PBMC de cerdo y que reconoce específicamente CD29 porcino. En la segunda sección se

3. Caracterización de cuatro anticuerpos frente la β_1 integrina

describe la obtención y caracterización de tres anticuerpos monoclonales, GP1A5, GP1A6 y GP4A1, frente a esta misma molécula obtenidos mediante inmunización con una proteína recombinante (CD29R) que se corresponde con una secuencia del dominio extracelular de la β_1 integrina porcina (Jiménez Marín, 2002).

3.2 Anticuerpo monoclonal GP4B4

3.2.1 Resultados

3.2.1.1 Selección y determinación del isotipo

El hibridoma GP4B4 fue seleccionado inicialmente por su reacción positiva en ELISA indirecto frente a PBMC porcinos. Antes de proceder a su caracterización se comprobó su positividad en citometría de flujo frente a leucocitos porcinos (figura 3.1) y se determinó su isotipo, que fue IgG1.

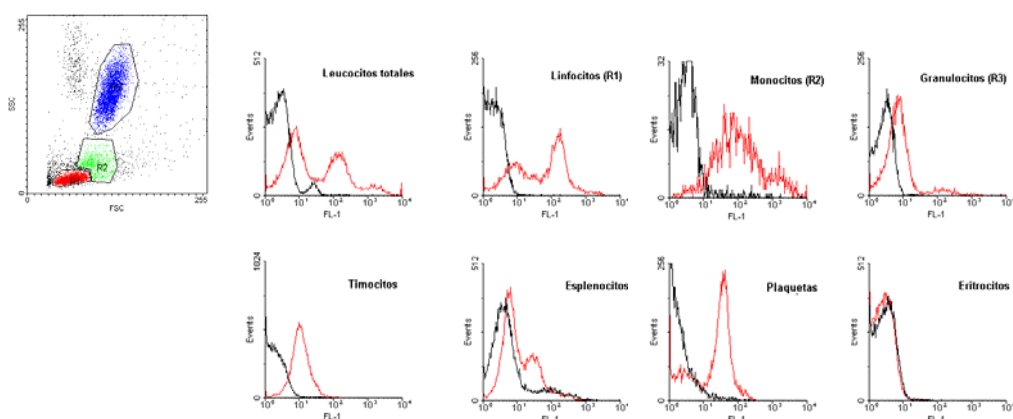


Figura 3.1. Análisis mediante citometría de flujo de la expresión del antígeno reconocido por el anticuerpo GP4B4 (en rojo) en diversas poblaciones celulares. En negro, los controles negativos.

3.2.1.2 Distribución celular

Mediante el empleo de técnicas de citometría de flujo se analizó la reactividad del anticuerpo monoclonal GP4B4 sobre distintas poblaciones leucocitarias porcinas, así como en plaquetas, eritrocitos y suspensiones celulares de timo y bazo.

El antígeno reconocido por el anticuerpo GP4B4 tenía una distribución bastante amplia. Se constató su expresión en la totalidad de los monocitos, en la mayoría de los linfocitos (con una distribución bimodal), en granulocitos (a bajos niveles), en plaquetas y

3. Caracterización de cuatro anticuerpos frente la β_1 integrina

en suspensiones celulares de timo y bazo, mientras que para los eritrocitos se obtuvieron valores próximos al control (figura 3.1).

Se procedió entonces al estudio de la distribución de GP4B4 frente a una batería estándar de anticuerpos contra marcadores leucocitarios porcinos mediante citometría con dos fluorocromos sobre PBMC. Se confirmó que G4B4 reconocía un antígeno presente en todo los monocitos (células SWC3 positivas) (figura 3.2). Las células CD3 positivas se dividían en dos subpoblaciones en función de su nivel de GP4B4; una subpoblación claramente positiva y otra también positiva pero con menor intensidad de fluorescencia. La totalidad de las células CD4 positivas, así como las CD8 positivas, eran reconocidas por GP4B4, mientras que sólo en torno a un 55% de los linfocitos B (identificados mediante un anticuerpo frente las IgM de superficie) eran reconocidos por dicho anticuerpo (figura 3.2). Todas las células CD5 positivas eran positivas para GP4B4 (figura 3.2).

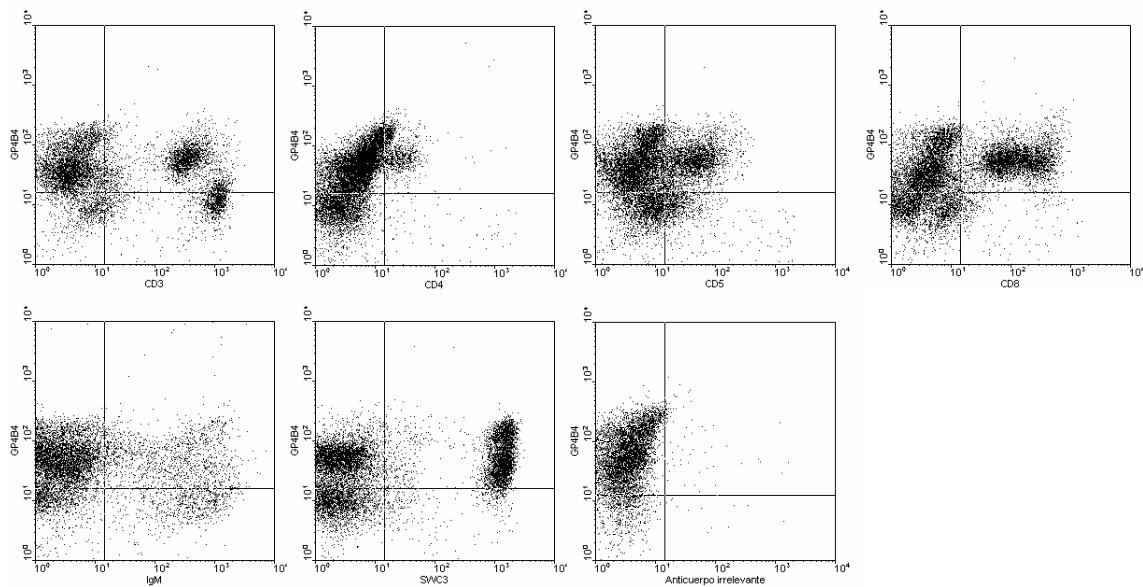


Figura 3.2. Estudio de la distribución del antígeno reconocido por GP4B4 frente a una batería estándar de marcadores leucocitarios porcinos: CD3, CD4, CD5, CD8, anti-IgM de superficie, SWC3 y un anticuerpo irrelevante, respectivamente.

Enfrentado a un anticuerpo comercial frente a CD49f humano (Pharmingen) con reacción cruzada con cerdo, GP4B4 reconoció la totalidad de los leucocitos positivos para CD49f y gran parte de los negativos (figura 3.3). La distribución de las células positivas para ambos anticuerpos sugería una asociación entre los antígenos reconocidos por uno y otro anticuerpo. Esta distribución era similar a la observada al enfrentar UCP1D2, uno de

3. Caracterización de cuatro anticuerpos frente la β_1 integrina

los dos anticuerpos frente CD29 estudiados en el Workshop porcino (Haverson et al., 1998), con el anticuerpo comercial anti-CD49f (figura 3.3).

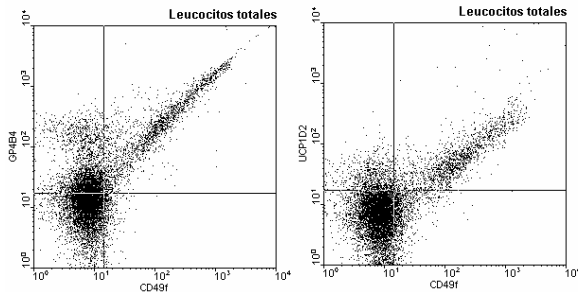


Figura 3.3. Comparación de las distribuciones en leucocitos de CD29 (anticuerpo UCP1D2) y el antígeno reconocido por GP4B4, frente a un anticuerpo anti-CD49f.

3.2.1.3 Reactividad cruzada

En los estudios de reactividad cruzada mediante citometría de flujo el anticuerpo GP4B4 reaccionó con leucocitos y plaquetas de las especies bovina, ovina y caprina (Figura 3.4).

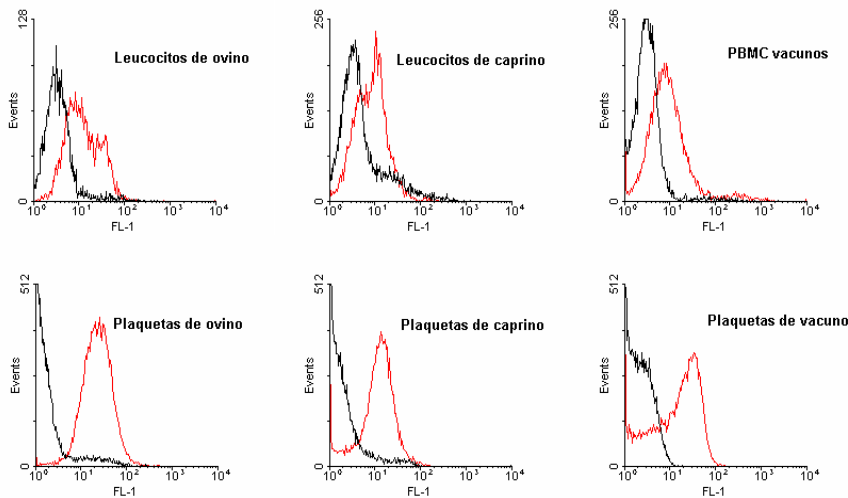


Figura 3.4. Reacción en citometría de flujo del anticuerpo GP4B4 (en rojo) con leucocitos y plaquetas de las especies ovina, caprina y bovina. En negro, los controles negativos.

3.2.1.4 Caracterización bioquímica

Mediante inmunoprecipitación realizada con el anticuerpo monoclonal GP4B4 sobre lisados de PBMC y de plaquetas en condiciones reductoras se identificaron dos bandas de aproximadamente 115 y 150 kDa de peso molecular en ambos tipos celulares (figura 3.5). Estas bandas eran idénticas a las inmunoprecipitadas por UCP1D2 (figura 3.6). En condiciones no reductoras eran tres las bandas inmunoprecipitadas por el anticuerpo

3. Caracterización de cuatro anticuerpos frente la β_1 integrina

GP4B4 tanto sobre lisados de plaquetas como de PBMC. Sus pesos moleculares aproximados eran 110, 140 y 150 kDa (figura 3.5).

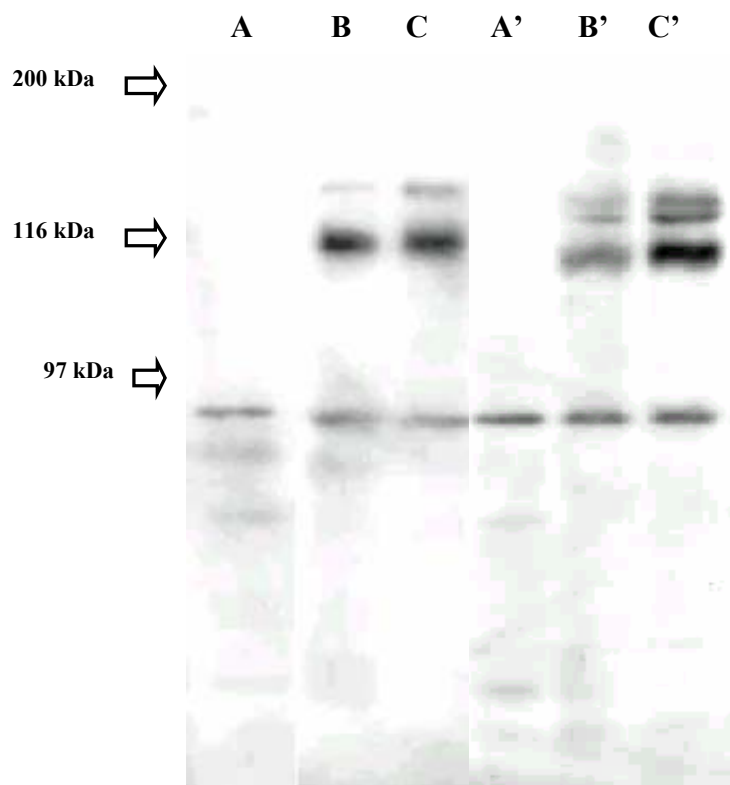


Figura 3.5. Bandas inmunoprecipitadas por el anticuerpo GP4B4 sobre lisados de plaquetas (carriles B y B') y PBMC (carriles C y C') en condiciones reductoras (carriles B y C) y no reductoras (B' y C'). Los carriles A y A' son controles negativos. A la izqda. los patrones de peso molecular.

3.2.2 Discusión

3.2.2.1 Distribución celular y caracterización bioquímica

Mediante el desarrollo de anticuerpos monoclonales dirigidos contra PBMC porcinos se obtuvo el anticuerpo GP4B4, que reconocía un antígeno de amplia distribución celular. En los estudios llevados a cabo mediante citometría de flujo GP4B4 reconoció una estructura presente en todas las subpoblaciones leucocitarias y en plaquetas, pero ausente en eritrocitos. Los niveles de expresión del antígeno en granulocitos eran bajos, mientras que en monocitos y linfocitos se expresaba más intensamente. Cabe destacar la peculiaridad de que para los linfocitos se observa una distribución bimodal (figura 3.1). En

3. Caracterización de cuatro anticuerpos frente la β_1 integrina

inmunoprecipitación en condiciones reductoras GP4B4 precipitó un complejo de 115 y 150 kDa de peso molecular y en condiciones no reductoras de 110, 140 y 150 kDa (figura 3.5).

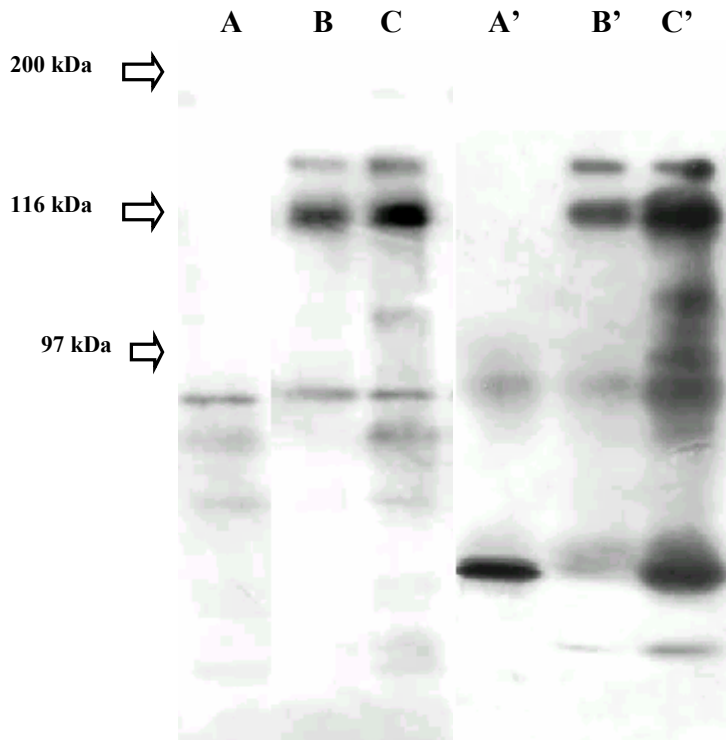


Figura 3.6. Bandas inmunoprecipitadas en condiciones reductoras por los anticuerpos GP4B4 y UCP1D2 sobre lisados de plaquetas (carriles B y C, respectivamente) y PBMC (carriles B' y C', respectivamente). Los carriles A y A' son controles negativos. A la izqda. los patrones de peso molecular.

Estos datos de distribución celular e inmunoprecipitación son muy similares a los previamente descritos para la integrina β_1 en la especie porcina (Haverson et al., 1998; Richard et al., 1998), lo que permitiría aventurar que GP4B4 reconocía específicamente dicha molécula. Si bien en la especie humana se suele atribuir a esta molécula un peso molecular de 130 kDa en condiciones reductoras (Hemler, 1990; Tanaka, 1997a), los estudios llevados a cabo en la especie porcina asignan al homólogo porcino pesos moleculares de 116-118 kDa en condiciones reductoras y 110-120 en condiciones no reductoras (Holzknecht & Platt, 1995; Richard et al., 1988), muy similares a los de la banda más ligera inmunoprecipitada por GP4B4. Las bandas más pesadas corresponderían a las distintas subunidades α a las que puede asociarse la integrina β_1 en leucocitos y plaquetas (Richard et al, 1998). La aparición de una banda de aproximadamente 20 kDa de peso molecular en algunas de las inmunoprecipitaciones en condiciones reductoras (resultados no mostrados) podría en tal caso atribuirse a la separación en dichas condiciones de las cadenas ligera y pesada de algunas de las subunidades α (Takada, 1997a; Takada, 1997b).

3. Caracterización de cuatro anticuerpos frente la β_1 integrina

Al comparar, mediante citometría con dos fluorocromos, las distribuciones en leucocitos de GP4B4 y de CD49f, los resultados obtenidos revelaron una posible asociación entre CD49f y el antígeno de membrana reconocido por GP4B4, a pesar de la más amplia distribución de éste (figura 3.3). CD49f es la integrina α_6 de la subfamilia de las β_1 integrinas y tiene una distribución más restringida que la de la subunidad β_1 (Tanaka, 1997b).

Para confirmar que GP4B4 reconocía específicamente CD29 porcino se comparó mediante citometría de flujo e inmunoprecipitación con UCP1D2, un anticuerpo monoclonal frente a dicha molécula (Haverson et al., 1998). En estudios preliminares mediante citometría de flujo sobre leucocitos los histogramas de uno y otro anticuerpo para las distintas subpoblaciones leucocitarias presentaron grandes similitudes (resultados no mostrados). Ambos anticuerpos coinmunoprecipitaron bandas con los mismos pesos moleculares sobre lisados tanto de plaquetas como de PBMC (figura 3.6) y enfrentados al anticuerpo anti-CD49f presentaron distribuciones similares (figura 3.3). Estos resultados nos permitieron concluir que el anticuerpo monoclonal GP4B4 reconocía específicamente la integrina β_1 porcina.

3.2.2.2 Reactividad cruzada

En nuestro estudio sobre reactividad cruzada con distintas especies, el anticuerpo GP4B4 reaccionó con leucocitos y plaquetas de las tres especies de rumiantes testadas, pero no con células de la especie humana (resultados no mostrados). Existen numerosas reseñas en la literatura sobre reacciones cruzadas de anticuerpos monoclonales frente a CD29 de distintas especies. Así, por ejemplo, el ya mencionado anticuerpo UCP1D2 reacciona con leucocitos de caballo, vaca, oveja, cabra, perro, gato, visón, cobaya y humano (Brodersen et al., 1998). En ese mismo estudio, un anticuerpo frente CD29 humano reconoció, entre otros, los homólogos equino, bovino, ovino, caprino, canino, felino y porcino. Existen otros anticuerpos frente a CD29 humano que reaccionan con células de cerdo (Kumagai et al., 1995) o de vaca (Sopp & Howard, 1997), así como un anticuerpo frente a CD29 bovino que reacciona con humano y cerdo (Vilmos et al., 1996).

Esta abundancia de anticuerpos frente a CD29 que reconocen dicha molécula en especies distintas a aquella para la que fueron desarrollados y el amplio abanico de especies

reconocido por algunos de ellos se ha atribuido a la presencia en la integrina β_1 de epítomos altamente conservados (Brodersen et al., 1998).

3.3 Anticuerpos monoclonales GP1A5, GP1A6 y GP4A1

3.3.1 Resultados

3.3.1.1 Obtención de anticuerpos monoclonales

Para la obtención de anticuerpos monoclonales dirigidos frente a la integrina β_1 porcina se partió de un cultivo de bacterias de la estirpe BL21 (DE3) de *E. coli* transformadas con una secuencia nucleotídica de 700 pares de bases homóloga a una región del dominio extracelular de la integrina β_1 humana que contiene el dominio de unión al ligando (Jiménez Marín, 2002). A partir del cultivo se obtuvo la proteína recombinante correspondiente a la secuencia expresada (CD29R), que se purificó en columnas Ni-NTA mediante elución a pH 4,5 y se empleó en un protocolo de inmunización de ratones BALB/c con los que se llevo a cabo una fusión.

Los sobrenadantes de los clones obtenidos se analizaron por ELISA indirecto frente a dicha proteína. La especificidad de los

clones que resultaron positivos en este primer ensayo se confirmó mediante un segundo análisis por inmunoblotting frente a la proteína recombinante empleada como inmunógeno, reconociendo cuatro de ellos (GP1A5, GP1A6, GP3B2 y GP4A1) una banda de un peso molecular aproximado de 30 kDa correspondiente con la proteína recombinante CD29R (figura 3.7). Los isotipos de estos cuatro fueron IgG1 para los clones GP1A6 y GP4A1 e IgM para el GP1A5, mientras que el isotipo del hibridoma GP3B2 no pudo ser determinado.

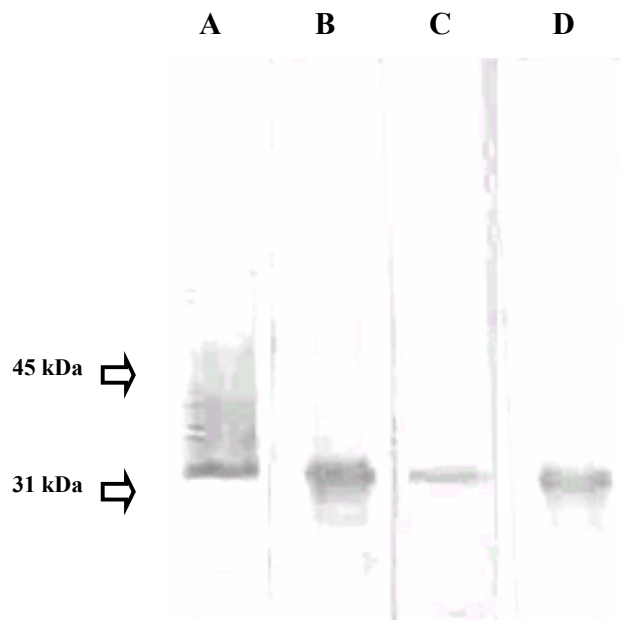


Figura 3.7. Inmunoblotting de la proteína recombinante CD29R con los anticuerpos GP1A5 (tira A), GP1A6 (tira B), GP3B2 (tira C) y GP4A1 (tira D). A la izquierda los patrones de peso molecular.

3. Caracterización de cuatro anticuerpos frente la β_1 integrina

Los hibridomas finalmente seleccionados para su caracterización y estudio fueron GP1A5, GP1A6 y GP4A1.

3.3.1.2 Citometría intracelular en PBMC

Mediante el empleo de técnicas de citometría de flujo intracelulares se analizó la reactividad de los anticuerpos monoclonales GP1A5, GP1A6 y GP4A1 sobre PBMC porcinos. Mientras que para GP1A5 se obtuvieron resultados similares al control, GP1A6 y GP4A1 reaccionaron con un antígeno intracelular (figura 3.8), siendo más intensa la reacción del segundo anticuerpo.

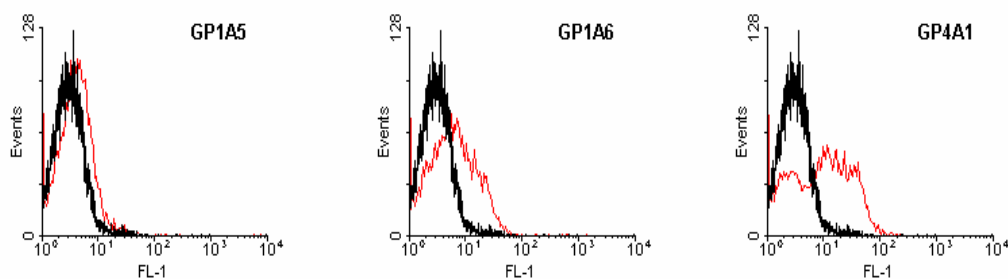


Figura 3.8. Citometría en PBMC permeabilizados con los anticuerpos GP1A5, GP1A6 y GP4A1 (en rojo). En negro, el control negativo.

3.3.1.3 Estudio de la expresión de la β_1 integrina en tejidos porcinos

El estudio de la expresión del receptor CD29 porcino se llevó a cabo sobre cortes de órganos linfoides y no linfoides de cerdo mediante técnicas inmunohistoquímicas. Para la fijación de las muestras de tejidos se emplearon dos fijadores, formaldehído tamponado al 10% y líquido de Bouin. El fijador idóneo para los grupos antigénicos reconocidos por nuestros anticuerpos monoclonales resultó ser el formaldehído tamponado, puesto que la inmunorreacción en las muestras fijadas con líquido de Bouin fue más débil.

De los tres anticuerpos monoclonales estudiados, dos de ellos funcionaron en estas técnicas (GP1A6 y GP4A1), mientras que para el tercero (GP1A5) no se obtuvieron resultados. Otro parámetro a ajustar fue la dilución óptima de los sobrenadantes utilizados, que varió según el anticuerpo de que se tratara y el tejido en cuestión. Para el anticuerpo GP4A1 se obtuvieron los mejores resultados a una dilución 1/10, mientras que con el GP1A6 se emplearon diluciones entre 1/5 y 1/20, dependiendo del tejido a estudiar.

3. Caracterización de cuatro anticuerpos frente la β_1 integrina

En estas condiciones, la técnica se llevó a cabo sobre muestras de los siguientes tejidos: ganglio linfático, bazo, médula ósea, timo, glándula salivar palatina, intestino delgado, piel y pulmón. Los resultados obtenidos fueron similares con ambos anticuerpos, pero la respuesta del GP1A6 fue en todos los casos más intensa.

En ganglio linfático los anticuerpos monoclonales anti-CD29R reaccionaron con macrófagos localizados en los senos peritrabeculares e interfoliculares, así como con células mononucleadas que posiblemente sean monocitos. No se apreció reacción en los folículos linfoides (figuras 3.9, 3.10, 3.11 y 3.12).

En bazo se observó tinción de las fibras musculares lisas de la cápsula y de las arteriolas. En la pulpa roja se evidenció inmunorreacción con macrófagos, con un característico patrón de tinción de membrana, y en células mononucleadas, posiblemente monocitos. En las vainas macrofágicas periarteriolares se observó tinción de macrófagos y células reticulares. No hubo reacción con el tejido linfoide (figuras 3.13, 3.14 y 3.15).

En médula ósea se observó inmunorreacción muy intensa con los megacariocitos y con células de estirpe mieloide, incluyendo leucocitos polimorfonucleares (figuras 3.16 y 3.17).

En timo se constató inmunorreacción con macrófagos y células retículo-epiteliales, pero no con las células linfoides (figuras 3.18 y 3.19).

En la glándula salivar palatina los anticuerpos monoclonales anti-CD29R reaccionaron con el músculo liso de las arteriolas y con las células mioepiteliales que rodean los acinos glandulares (figura 3.20).

En intestino delgado se observó una tinción muy remarcable del músculo liso, tanto de las tónicas musculares como de la muscular de la mucosa y del que rodea las arteriolas. En lámina propia se observó reacción con macrófagos infiltrantes, con el característico patrón de membrana. No se observó reacción con las células epiteliales de la mucosa intestinal ni con el tejido linfoide de las placas de Peyer (figuras 3.21 y 3.22).

En piel se observó reacción con el músculo liso erector del pelo y también con el epitelio secretor de las glándulas apocrinas y con el epitelio escamoso del folículo piloso. En la epidermis no hubo inmunorreacción (figuras 3.23 y 3.24).

En pulmón sólo hubo inmunorreacción con los macrófagos alveolares (figuras 3.25 y 3.26).

3. Caracterización de cuatro anticuerpos frente la β_1 integrina

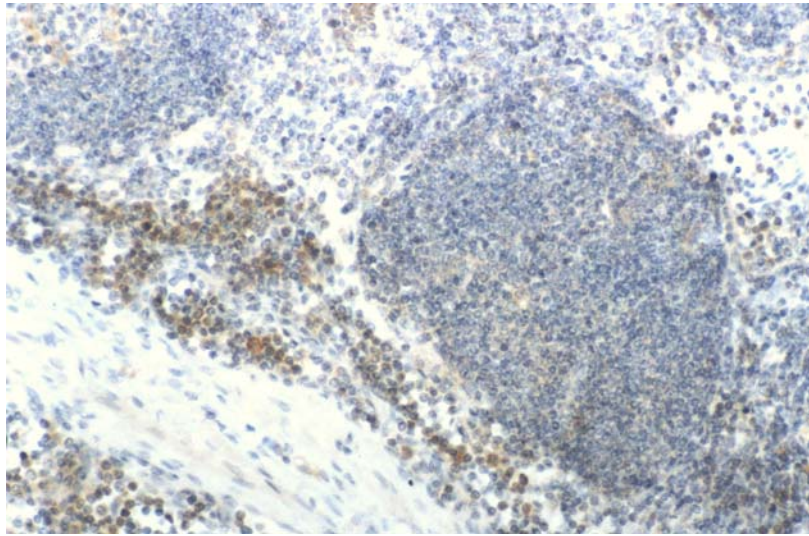


Figura 3.9. Ganglio linfático. Reacción con células aisladas situadas en los senos interfolliculares. Anticuerpo GP4A1 (20x).

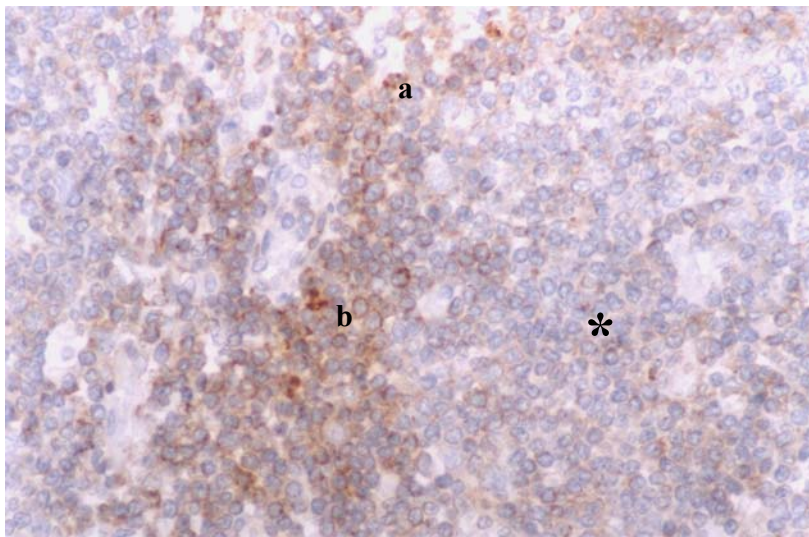


Figura 3.10. Ganglio linfático. Reacción con células aisladas situadas en los senos interfolliculares: macrófagos (**a**) y, posiblemente, monocitos (**b**), con característico patrón de membrana. No se observa reacción en los folículos (*). Anticuerpo GP1A6 (40x).

3. Caracterización de cuatro anticuerpos frente la β_1 integrina

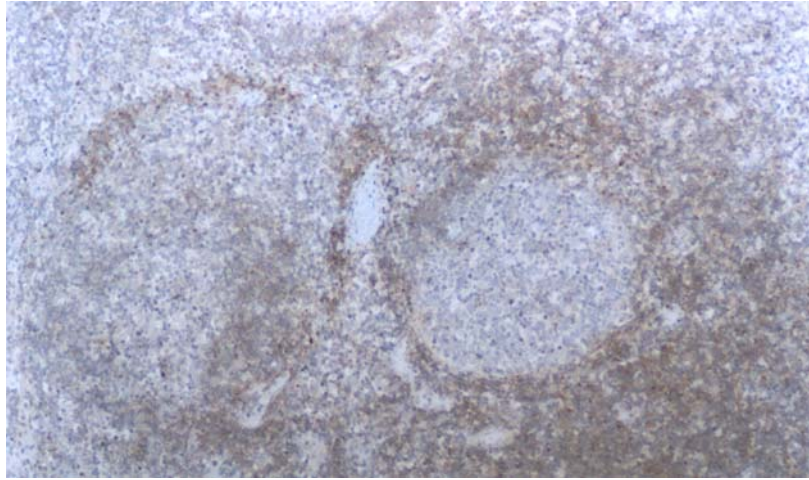


Figura 3.11. Ganglio linfático. Reacción con células aisladas situadas en los senos interfoliculares. No se observa reacción en los folículos. Anticuerpo GP1A6 (10x).

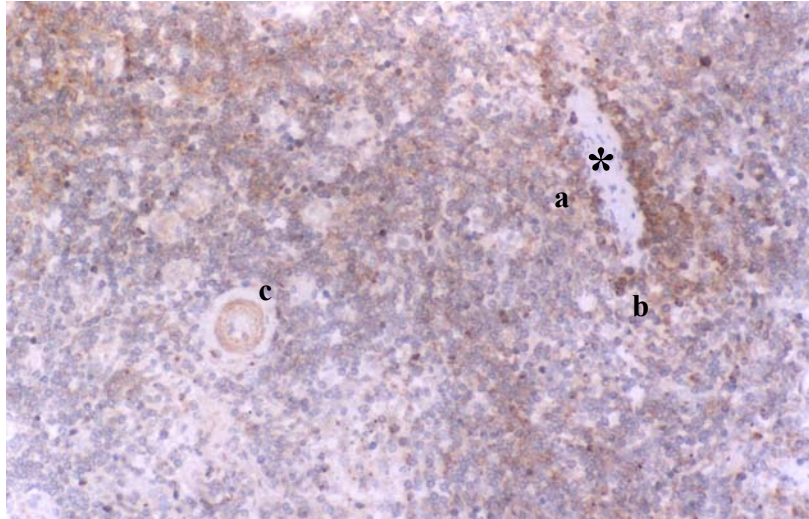


Figura 3.12. Ganglio linfático. Se observa en torno a una trabécula (*) reacción con células situadas en los senos paratrabeculares: macrófagos (a) y, posiblemente, monocitos (b); así como con músculo liso vascular (c). Anticuerpo GP1A6 (20x).

3. Caracterización de cuatro anticuerpos frente la β_1 integrina

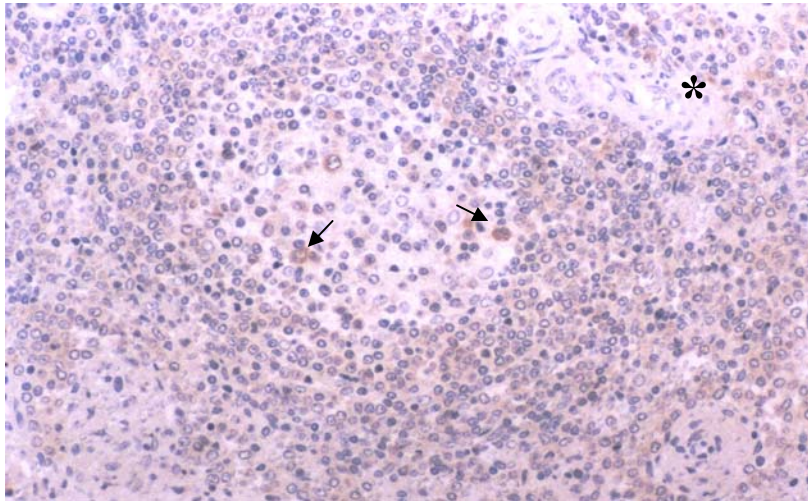


Figura 3.13. Bazo. Reacción con células centrofoliculares aisladas, posiblemente macrófagos. También hay reacción con células aisladas en la pulpa roja (*). Anticuerpo GP4A1 (20x).

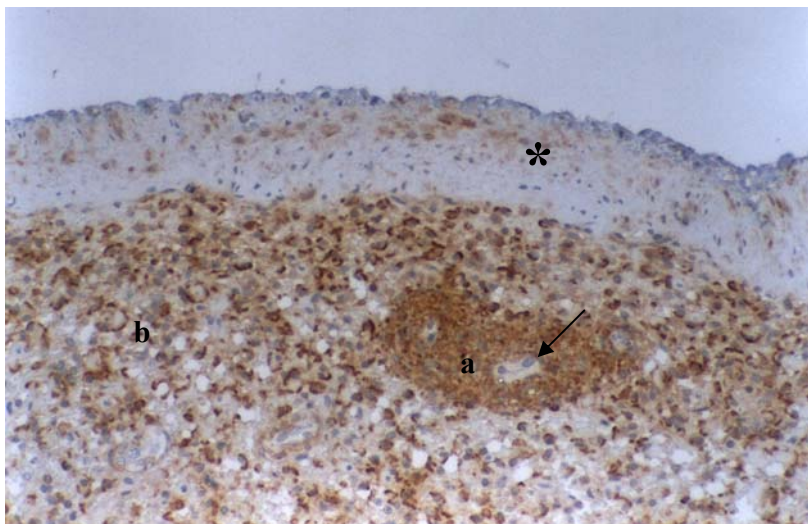


Figura 3.14. Bazo. Reacción con las fibras musculares lisas de la cápsula (*) y de las arteriolas trabeculares (flecha). Fuerte reacción con los macrófagos y células reticulares de una vaina macrófágica periarteriolar (a). Patrón de membrana en macrófagos de la pulpa roja (b). Anticuerpo GP1A6 (20x).

3. Caracterización de cuatro anticuerpos frente la β_1 integrina

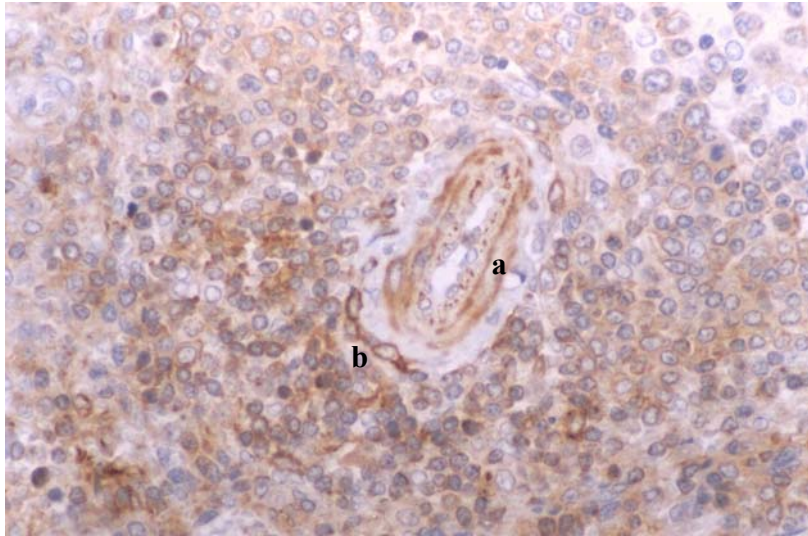


Figura 3.15. Bazo. Reacción con el músculo liso de una arteriola en un folículo (a). Tinción de membrana de macrófagos situados en la pulpa blanca (b). Anticuerpo GP1A6 (40x)

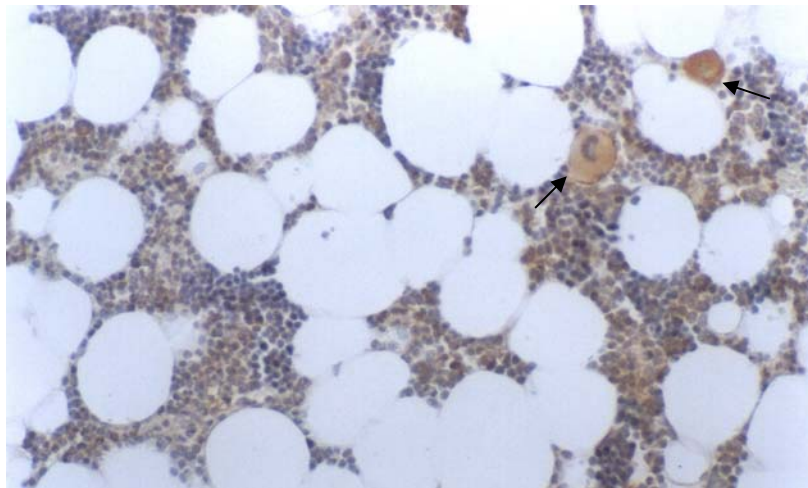


Figura 3.16. Médula ósea. Reacción con megacariocitos, con tinción de citoplasma y de membrana, y con otras células de forma heterogénea. Anticuerpo GP1A6 (20x).

3. Caracterización de cuatro anticuerpos frente la β_1 integrina

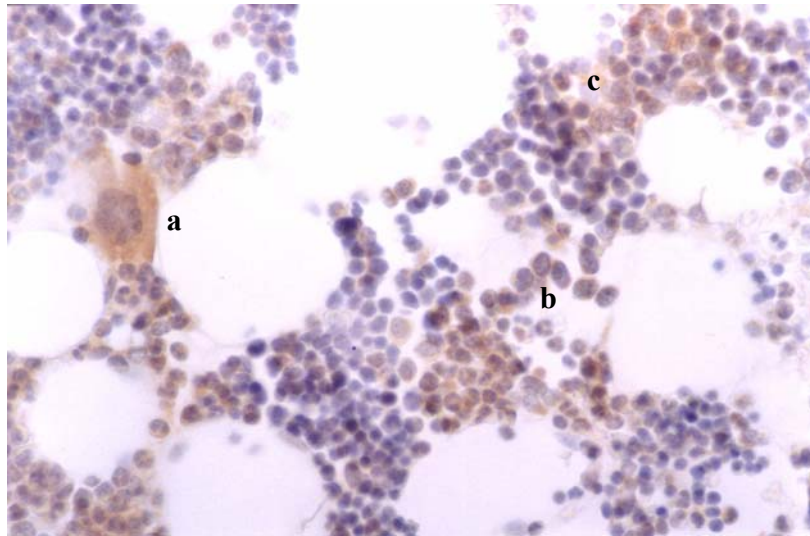


Figura 3.17. Médula ósea. Reacción con un megacariocito (a), con tinción de citoplasma y de membrana, así como con células que posiblemente sean de estirpe mieloide (b). Tinción de membrana de un leucocito polimorfonuclear (c). Anticuerpo GP1A6 (40x).

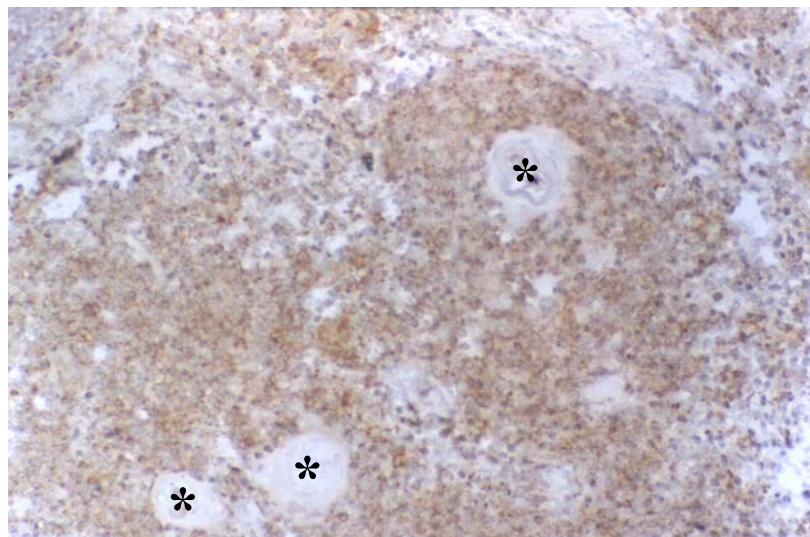


Figura 3.18. Timo. Reacción con macrófagos y células retículo-epiteliales que rodean los corpúsculos de Hassall (*). Anticuerpo GP1A6 (20x).

3. Caracterización de cuatro anticuerpos frente la β_1 integrina

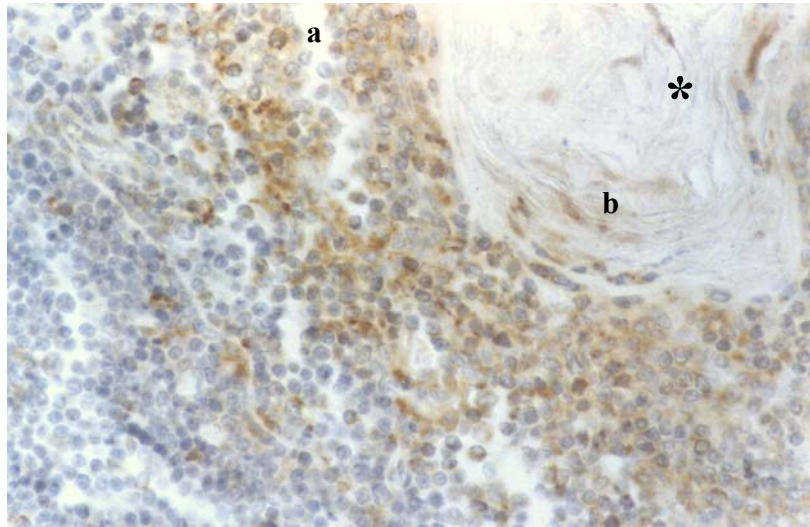


Figura 3.19. Timo. Reacción con macrófagos (a) y células retículo-epiteliales (b) que rodean un corpúsculo de Hassall (*). No se observa reacción con los linfocitos. Anticuerpo GP1A6 (40x)

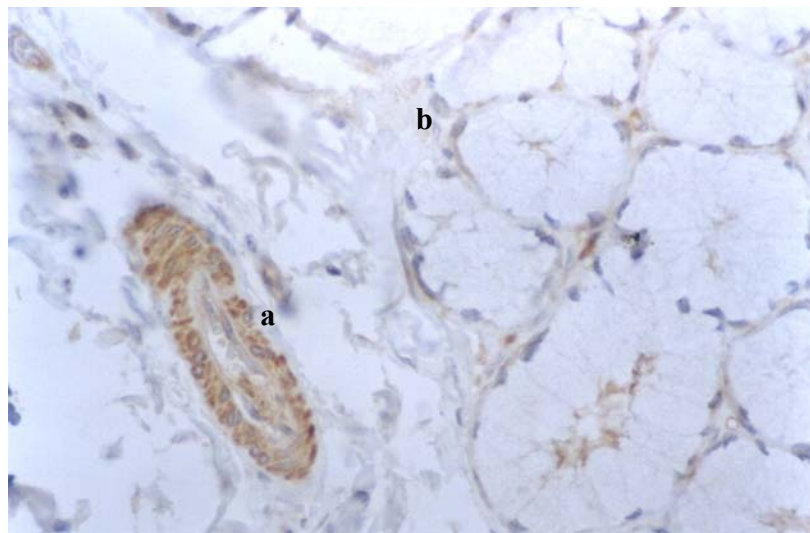


Figura 3.20. Glándula salival palatina. Reacción con con el músculo liso de un vaso (a) y con las células mioepiteliales que rodean los acinos glandulares (b). Anticuerpo GP1A6 (40x).

3. Caracterización de cuatro anticuerpos frente la β_1 integrina

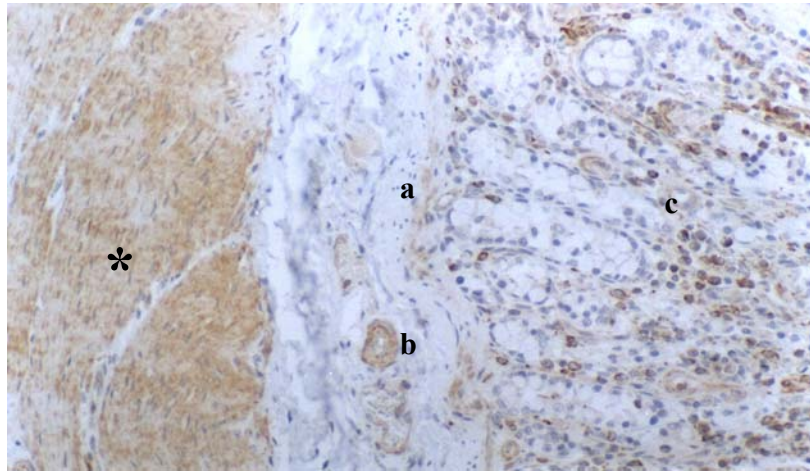


Figura 3.21. Intestino delgado. Reacción intensa con el músculo liso de la túnica muscular (*), de la muscular de la mucosa (a) y de las arteriolas de la submucosa (b). En lámina propia (c) se observó reacción con células infiltrantes. Anticuerpo GP1A6 (20x).

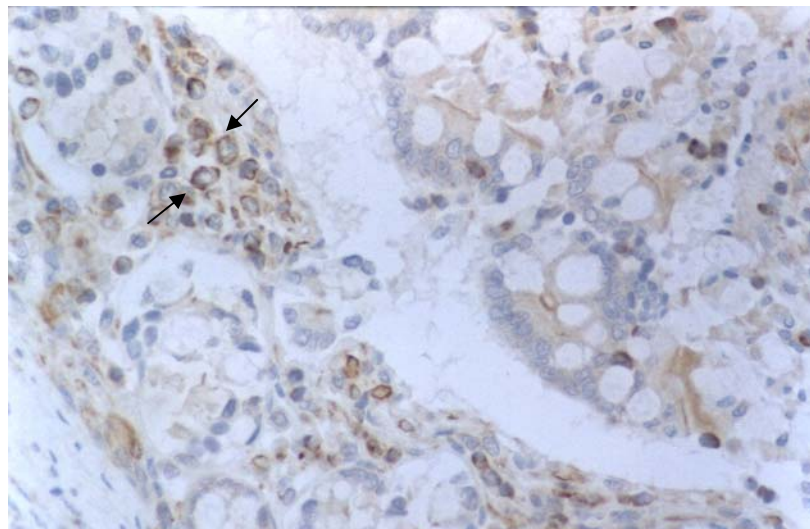


Figura 3.22. Intestino delgado. En la lámina propia de la mucosa se observa reacción con macrófagos infiltrantes, con el característico patrón de membrana. Anticuerpo GP1A6 (40x)

3. Caracterización de cuatro anticuerpos frente la β_1 integrina

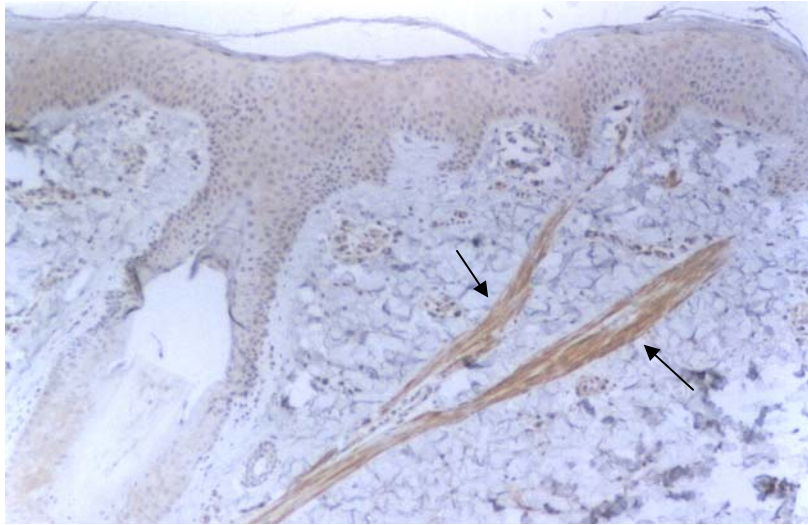


Figura 3.23. Piel. Reacción con el músculo liso erector del pelo. En la epidermis no hubo inmunorreacción. Anticuerpo GP1A6 (10x).

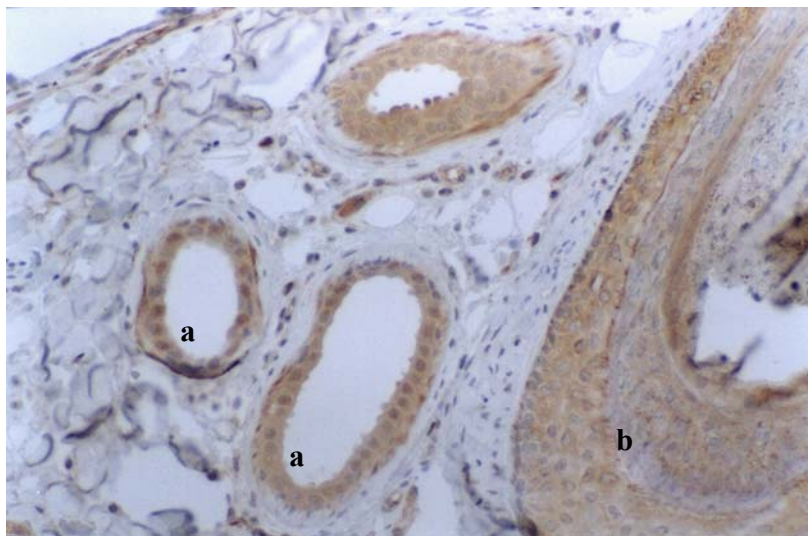


Figura 3.24. Piel. Reacción con el epitelio secretor de las glándulas apocrinas (a) y con el epitelio escamoso de un folículo piloso (b). Anticuerpo GP1A6 (20x).

3. Caracterización de cuatro anticuerpos frente la β_1 integrina

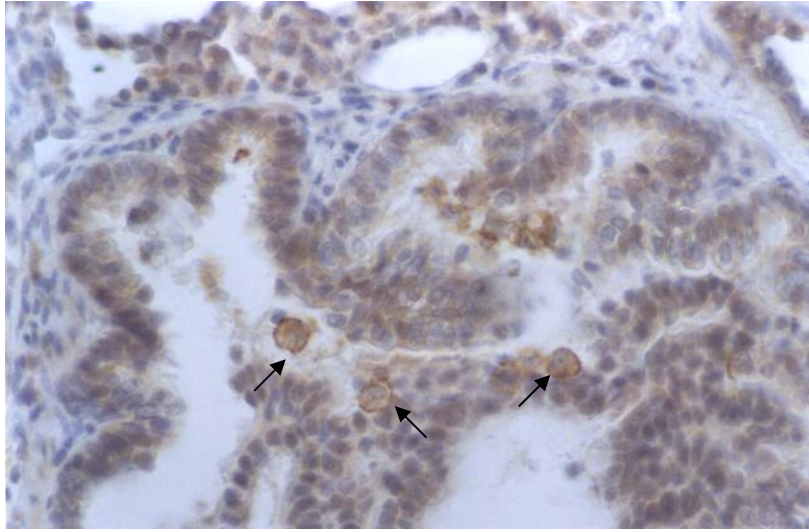


Figura 3.25. Pulmón. Reacción con macrófagos alveolares descamados en la luz de los bronquiolos, con característica tinción de membrana. Anticuerpo GP1A6 (40x).

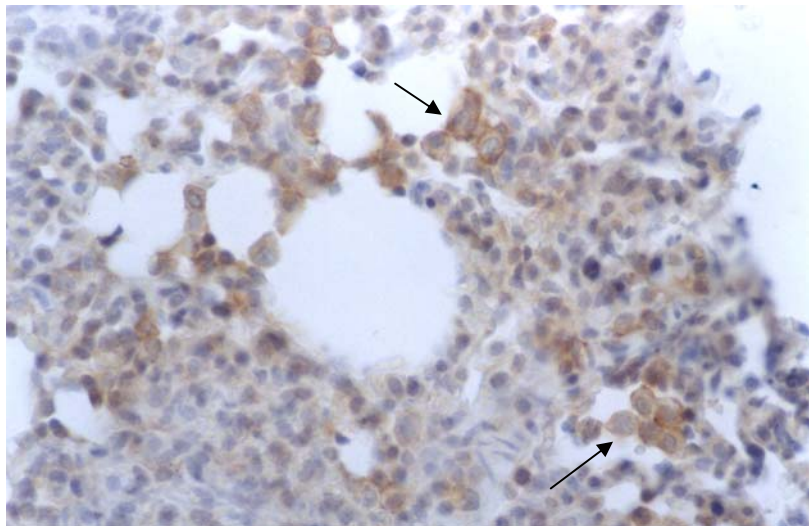


Figura 3.26. Pulmón. Reacción con macrófagos alveolares, con característica tinción de membrana. Anticuerpo GP1A6 (40x).

3.3.2 Discusión

3.3.2.1 Obtención de los anticuerpos

La obtención de anticuerpos específicos frente a un determinado receptor requiere un conocimiento previo de la secuencia de ADN que codifica la proteína. Se produce entonces un péptido sintético que se emplea como inmunógeno para obtener anticuerpos monoclonales (Davies & Brown, 1987). Este método tiene como principal ventaja la fácil caracterización de los anticuerpos así producidos. Dada la relativa dificultad de obtener anticuerpos monoclonales específicos contra nuevos antígenos CD porcinos, esta técnica está cobrando cada vez más auge (Haverson et al., 2001). Como principal inconveniente cabe destacar el que los anticuerpos no reconocerían un epítipo conformacional de la proteína, con la consiguiente limitación de su utilidad desde un punto de vista funcional. También la capacidad inmunógena de los péptidos es menor que cuando se inmuniza con células completas (Goding, 1980). Esta técnica ha sido empleada con éxito en la producción de anticuerpos monoclonales frente a la interleucina-6 ovina (McWaters et al., 2000), la inmunoglobulina E ovina (Clarke et al., 1997) y el receptor de la interleucina-15 de pollo (Li et al., 2001).

Para la obtención de anticuerpos monoclonales frente a la integrina β_1 porcina se siguió un protocolo de inmunización con la proteína recombinante CD29R obtenida en nuestro grupo (Jiménez Marín, 2002) y correspondiente a una secuencia del dominio extracelular de dicha integrina. La obtención de anticuerpos que reconozcan esta integrina es de gran interés, tanto por la escasez de anticuerpos monoclonales frente al CD29 porcino como por la importancia de los estudios sobre el xenotrasplante en que podrían ser utilizados (Richard et al., 1998; Haverson et al., 1998).

3.3.2.2 Selección de los hibridomas

Los hibridomas generados en este trabajo se seleccionaron inicialmente por su reacción positiva en ELISA frente a la proteína recombinante CD29R empleada como inmunógeno. Puesto que no se obtuvieron resultados en las técnicas de citometría de flujo habituales para ninguno de los hibridomas seleccionados (resultados no mostrados), se recurrió al inmunoblotting frente a la proteína recombinante, seleccionando cuatro hibridomas para su caracterización por su capacidad para reconocer mediante esta técnica la

3. Caracterización de cuatro anticuerpos frente la β_1 integrina

proteína recombinante CD29R, de un peso molecular aproximado de 30 kDa (Jiménez Marín, 2002).

Estos mismos anticuerpos se probaron en inmunoblotting e inmunoprecipitación frente a lisados de plaquetas y PBMC porcinos, dos tipos celulares en los que ha sido evidenciada en la especie humana la expresión de la β_1 integrina (Tanaka, 1997a), sin obtener resultados positivos (resultados no mostrados). La ausencia de reactividad en estas técnicas, así como en citometría de flujo, podría deberse a que, al proceder de una inmunización con una proteína recombinante, los anticuerpos no reconocen la conformación nativa de la β_1 integrina porcina (Harlow & Lane, 1988).

Al determinar el isotipo de los clones en estudio no resultó posible obtener un resultado definitivo para el clon GP3B2. Dicho clon no llegó a estabilizarse y antes de poder clonarlo se perdió definitivamente. Probablemente ambas circunstancias, la inestabilidad del clon y la imposibilidad de determinar su isotipo, guarden relación.

3.3.2.3 Citometría intracelular en PBMC

Mediante técnicas de citometría intracelulares sobre PBMC porcinos se evidenció la capacidad de los anticuerpos monoclonales GP1A6 y GP4A1 de reconocer un antígeno intracelular presente tanto en monocitos como en linfocitos (resultados no mostrados). Esta reacción podría ser debida al reconocimiento por GP1A6 y GP4A1 de un precursor intracitoplasmático de la β_1 integrina porcina o del “pool” intracelular de dicha molécula ya madura (Akiyama et al., 1989). Dado que estos anticuerpos aparentemente no reconocen la β_1 integrina porcina en su conformación nativa, la primera hipótesis es más plausible, reaccionando con los precursores de dicha molécula que aún no han adquirido dicha conformación.

3.3.2.4 Estudio de la expresión de la β_1 integrina en tejidos porcinos

La distribución tisular de la integrina β_1 porcina fue estudiada mediante el empleo de los anticuerpos monoclonales anti-CD29R en técnicas inmunohistoquímicas. En estudios preliminares se observó que era necesario un tratamiento térmico con una solución 10 mM de citrato monosódico a pH 6 para desenmascarar el antígeno reconocido por nuestros anticuerpos. Esto se puede atribuir al establecimiento de puentes de unión cruzados entre los componentes proteicos del tejido durante el proceso de fijación, que puede hacer inaccesibles determinados antígenos a los anticuerpos específicos, siendo

3. Caracterización de cuatro anticuerpos frente la β_1 integrina

necesario recurrir a técnicas de desenmascaramiento antigénico como la empleada en este trabajo (Palacín Forgue, 1984).

También en los estudios preliminares se observó que la fijación de las muestras de tejido con líquido de Bouin afectaba al reconocimiento del antígeno, dando lugar a una inmunorreacción notablemente menos intensa que la observada en las muestras fijadas con formaldehído tamponado. Dado que no existe un fijador universal, la elección del mismo dependerá de los grupos antigénicos en estudio, buscando siempre un equilibrio entre la preservación de la morfología y la inmunorreactividad (Palacín Forgue, 1984). El fijador que mejor se adaptó a esos requisitos en nuestro estudio fue el formaldehído tamponado al 10%, posiblemente debido a la acción desnaturalizante que ejerce sobre las proteínas.

Los anticuerpos empleados en las técnicas inmunohistoquímicas fueron GP1A5, GP1A6 y GP4A1, pero sólo se obtuvieron resultados para los dos últimos, con un patrón de inmunorreacción muy similar en los distintos tejidos estudiados. En general, dicho patrón puso de manifiesto que la β_1 integrina porcina se expresa principalmente en músculo liso y células del linaje mieloide, mientras que no se evidenció expresión en las células del linaje linfoide.

La expresión de CD29 en el tejido muscular liso ya había sido previamente puesta de manifiesto en estudios inmunohistoquímicos llevados a cabo en humano y ave (De Strooper et al., 1988) y más recientemente en la especie porcina (Jiménez Marín, 2002). La inmunorreacción en el músculo liso vascular presumiblemente se deba al receptor $\alpha_1\beta_1$, cuya presencia se ha detectado en el músculo liso arterial humano (Skinner et al., 1994). La presencia de la β_1 integrina en el músculo liso no vascular puede ser atribuible al receptor $\alpha_5\beta_1$, cuyo homólogo humano se ha descrito en interacción con la fibrina (Yee et al., 1998).

En células mieloides porcinas también se puso de manifiesto la expresión del CD29, de modo similar a lo previamente descrito (Jiménez Marín, 2002). La presencia de dicho receptor en monocitos puede atribuirse al heterodímero $\alpha_4\beta_1$, que en la especie humana se ha involucrado en la adhesión de dichas células a las células endoteliales activadas por citoquinas (Jonjic et al., 1992). La inmunorreacción con leucocitos polimorfonucleares es probablemente debida a las integrinas $\alpha_4\beta_1$ y $\alpha_5\beta_1$. La primera de ellas ha sido relacionada con la adhesión de eosinófilos y basófilos a las células endoteliales activadas por citoquinas en la especie humana (Schleimer et al., 1992), mientras que la $\alpha_5\beta_1$ media los mecanismos

3. Caracterización de cuatro anticuerpos frente la β_1 integrina

de migración de los leucocitos polimorfonucleares a través de los fibroblastos de pulmón también en humanos (Shang & Issekutz, 1997). La presencia en macrófagos de CD29 es presumiblemente atribuible al receptor $\alpha_6\beta_1$, cuya expresión en macrófagos humanos ha sido descrita (Cooper et al., 1991).

A pesar de que la subunidad β_1 fue inicialmente descrita en linfocitos T activados, la ausencia de inmunorreacción en las células linfoides ya se había observado en otros estudios inmunohistoquímicos, tanto en humano y ave como en la propia especie porcina (De Strooper et al., 1988; Favre et al., 1992; Jiménez Marín, 2002). Estos resultados son similares a los obtenidos en este trabajo. Esta ausencia de reacción puede ser debida a la diferente expresión de CD29 durante la activación celular del tejido linfoide (Hemler, 1990), diferencia que posiblemente no podría ser puesta en evidencia mediante la técnica de estudio empleada.

La inmunorreacción de los anticuerpos en estudio con determinados tejidos fue más restringida que la descrita en un estudio previo llevado a cabo con un anticuerpo policlonal frente a CD29 porcino (Jiménez Marín, 2002) y en un estudio similar en la especie humana (De Strooper et al., 1988). Así, los anticuerpos monoclonales GP1A6 y GP4A1 no reaccionaron con células endoteliales y su reacción con células epiteliales se limitó al epitelio secretor de las glándulas apocrinas, al epitelio escamoso del folículo piloso y a las células retículo-epiteliales tímicas. Por contra, en los estudios mencionados se observó inmunorreacción con el endotelio vascular y con una amplia variedad de células epiteliales. Estas diferencias podrían deberse a peculiaridades de los anticuerpos monoclonales empleados en nuestro estudio o de la técnica inmunohistoquímica seguida que no permitirían un reconocimiento eficiente o el desenmascaramiento del epítipo o epítipos reconocidos por GP1A6 y GP4A1 en los tejidos descritos.

3.4 Aplicaciones y conclusiones

3.4.1 Posibles aplicaciones

Los distintos miembros de la subfamilia de las β_1 integrinas desempeñan un importante papel en la adhesión de las células que los expresan tanto a diversos componentes de la matriz extracelular como a otras células, por lo que distintos anticuerpos monoclonales frente a CD29 humano se han utilizado en estudios sobre estos fenómenos de

3. Caracterización de cuatro anticuerpos frente la β_1 integrina

adhesión. Se ha puesto así en evidencia que determinados anticuerpos anti-CD29 tienen una función inhibitoria, bloqueando la unión a sus ligandos de los distintos VLA (Bednarczyk et al., 1992; Ni & Wilkins, 1998), mientras que otros tienen el efecto inverso, estimulando la unión de estos heterodímeros a sus ligandos (Wilkins et al., 1996; Faull et al., 1996; Whittard & Akiyama, 2001). La capacidad inhibitoria de los primeros ha permitido su empleo en estudios “in vitro” sobre la adhesión de células tumorales a la matriz extracelular, poniendo de manifiesto la importancia de las β_1 integrinas en los procesos de migración y metástasis (Strobel & Cannistra, 1999; Brenner et al., 2000). También se han empleado para el estudio “in vitro” de la adhesión de los linfocitos humanos al endotelio vascular porcino (Robinson et al., 1998) y sus implicaciones en el xenotrasplante de órganos porcinos a pacientes humanos.

En contraste con el gran número de estudios en la especie humana en los que se han empleado anticuerpos monoclonales frente a CD29, en cerdo existen pocos estudios de este tipo, posiblemente debido a la escasez de anticuerpos monoclonales bien caracterizados frente al homólogo porcino de esta molécula. Linfor y Berger (2000) han evidenciado la importancia de la integrina β_1 porcina en la fecundación mediante el empleo de un anticuerpo monoclonal contra CD29 porcino que inhibía la unión de los espermatozoides al oocito porcino. También en estudios sobre la adhesión de PBMC porcinos a células endoteliales humanas, con el fin de determinar la posibilidad de inducir tolerancia en los receptores de órganos de origen porcino mediante el trasplante de células hematopoyéticas de cerdo, se ha utilizado un anticuerpo anti-CD29 humano que reconoce al homólogo porcino (Dalla Riva et al., 2000).

Los anticuerpos caracterizados en este trabajo pueden ser de gran interés para la puesta a punto de ensayos en que la especie porcina sirva como modelo experimental “in vivo” así como en estudios sobre Sanidad Animal. Si bien los resultados no fueron concluyentes, experimentos preliminares apuntaron en la dirección de que los anticuerpos monoclonales GP1A5, GP1A6 y GP4A1 tenían capacidad de inhibir la unión de PBMC porcinos a la fibronectina (resultados no mostrados), lo que, de confirmarse, permitiría su empleo en estudios sobre adhesión celular. Por su parte, el anticuerpo GP4B4 podría también emplearse en la definición de distintas subpoblaciones leucocitarias porcinas mediante técnicas de citometría de flujo.

3.4.2 Conclusiones

En este capítulo se describen una serie de anticuerpos monoclonales frente a la integrina β_1 porcina. Uno de ellos, GP4B4, reconoce dicha integrina en citometría de flujo sobre leucocitos y plaquetas y la inmunoprecipita a partir de lisados de esos tipos celulares. Los otros anticuerpos, GP1A5, GP1A6 y GP4A1, reconocen un epítipo no conformacional de la integrina β_1 porcina. Los dos primeros reaccionan con los precursores intracitoplasmáticos de CD29 en citometría de flujo intracelular sobre PBMC y también funcionan en técnicas inmunohistoquímicas. Estos anticuerpos frente al homólogo porcino de CD29 podrían ser herramientas de interés en estudios relacionados con los xenotrasplantes, la Sanidad Animal y la fisiología de los leucocitos porcinos.

3.5 Bibliografía

- Akiyama SK, Yamada SS, Yamada KM, 1989. Analysis of the role of glycosylation of the human fibronectin receptor. *J Biol Chem* 264: 18011-18018.
- Bednarczyk JL, Teague TK, Wygant JN, Davis LS, Lipsky PE, McIntyre BW, 1992. Regulation of T cell proliferation by anti-CD49d and anti-CD29 monoclonal antibodies. *J Leukoc Biol* 52: 456-462.
- Bonfoco E, Chen W, Paul R, Cheresch DA, Cooper NR, 2000. Beta1 integrin antagonism on adherent, differentiated human neuroblastoma cells triggers an apoptotic signaling pathway. *Neuroscience* 101: 1145-1152.
- Brakebusch C, Hirsch E, Potocnik A, Fassler R, 1997. Genetic analysis of beta1 integrin function: confirmed, new and revised roles for a crucial family of cell adhesion molecules. *J Cell Sci* 110: 2895-28904.
- Brenner W, Gross S, Steinbach F, Horn S, Hohenfellner R, Thüroff JW, 2000. Differential inhibition of renal cancer cell invasion mediated by fibronectin, collagen IV and laminin. *Cancer Lett* 155: 199-205.
- Brodersen R, Bijlsma F, Gori K, Jensen KT, Chen W, Domínguez J, Haverson K, Moore PF, Saalmüller A, Sachs D, Slierendrecht WJ, Stokes C, Vainio O, Zuckermann. Aasted B, 1998. Analysis of the immunological cross reactivities of 213 well characterized monoclonal antibodies against various leucocyte surface antigens of human and 11 animal species. *Vet Immunol Immunopath* 64: 1-13.
- Carlos TM, Harlan JM, 1994. Leukocyte-endothelial adhesion molecules. *Blood* 84: 2068-2101.
- Castel S, Pagan R, Garcia R, Casaroli Marano RP, Reina M, Mitjans F, Piulats J, Vilaro S, 2000. Alpha v integrin antagonists induce the disassembly of focal contacts in melanoma cells. *Eur J Cell Biol* 79: 502-512.
- Cervella P, Silengo L, Pastore C, Altruda F, 1993. Human beta 1-integrin gene expression is regulated by two promoter regions. *J Biol Chem* 268: 5148-5155.
- Clarke RA, Bendixsen T, Fang ZM, Kearsley JH, Beh KJ, 1997. Production and verification of an anti-ovine IgE monoclonal antibody. *Hybridoma* 16: 473-478.

3. Caracterización de cuatro anticuerpos frente la β_1 integrina

- Cooper HM, Tamura RN, Quaranta V, 1991. The major laminin receptor of mouse embryonic stem cells is a novel isoform of the alpha 6 beta 1 integrin. *J Cell Biol* 115: 843-850.
- Dalla Riva C, Tessmann R, Kuehn C, Martin U, Diehl A, Steinhoff G, Haverich A, Simon AR, 2000. VLA-Integrin beta-1 chain function is not fully conserved between the human and porcine species: implications for xenotransplantation. *Transplant Proc* 32: 1054-1055.
- Davies AA, Brown MH, 1987. Biochemical characterization of lymphocyte surface antigens. En Klawns GGB. *Lymphocytes. A practical approach*. IRL Press. Oxford, RU: 229-253.
- De Strooper B, Van der Schueren B, Jaspers M, Saison M, Spaepen M, Van Leuven F, Van den Berghe H, Cassiman JJ, 1989. Distribution of the beta 1 subgroup of the integrins in human cells and tissues. *J Histochem Cytochem* 37: 299-307.
- Faull RJ, Wang J, Leavesley DI, Puzon W, Russ GR, Vestweber D, Takada Y, 1996. A novel activating anti-beta1 integrin monoclonal antibody binds to the cysteine-rich repeats in the beta1 chain. *J Biol Chem* 271: 25099-25106.
- Favre A, Giunta M, Gu Y, Corte G, Grossi CE, 1992. Localization of a novel integrin of the beta 1 subfamily in human tissues. *J Histochem Cytochem* 40: 1291-1298.
- Fujita S, Watanabe M, Kubota T, Teramoto, 1995. Alteration of expression in integrin beta 1-subunit correlates with invasion and metastasis in colorectal cancer. *Cancer Letters* 91: 145-149.
- Goding JW, 1980. Antibody production by hybridomas. *J Immunol Methods* 39:4 285-308.
- Harlow E, Lane D, 1988. *Antibodies. A laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory, EEUU.
- Hauzenberger E, Hauzenberger D, Hultenby K, Holgersson J, 2000. Porcine endothelium supports transendothelial migration of human leukocyte subpopulations: anti-porcine vascular cell adhesion molecule antibodies as species-specific blockers of transendothelial monocyte and natural killer cell migration. *Transplantation* 69: 1837-1849.
- Haverson K, Zuckermann F, Saalmuller A, Lipp J, Aasted B, Stokes CR, 1998. Summary of workshop findings for porcine adhesion molecule subgroup. *Vet Immunol Immunopathol* 60: 351-365.
- Haverson K, Saalmuller A, Alvarez B, Alonso F, Bailey M, Bianchi AT, Boersma WJ, Chen Z, Davis WC, Dominguez J, Engelhardt H, Ezquerro A, Grosmaire LS, Hamilton MJ, Hollemweguer E, Huang CA, Khanna KV, Kuebart G, Lackovic G, Ledbetter JA, Lee R, Llanes D, Lunney JK, McCullough KC, Molitor T, Nielsen J, Niewold TA, Pescovitz MD, de la Lastra JM, Rehakova Z, Salmon H, Schnitzlein WM, Seebach J, Simon A, Sinkora J, Sinkora M, Stokes CR, Summerfield A, Sver L, Thacker E, Valpotic I, Yang H, Zuckermann FA, Zwart R, 2001. Overview of the Third International Workshop on Swine Leukocyte Differentiation Antigens. *Vet Immunol Immunopathol* 20 80:1-2 5-23.
- Hemler ME, 1988. Adhesive protein receptors on hematopoietic cells. *Immunol Today* 9: 109-113.
- Hemler ME, 1990. VLA proteins in the integrin family: structures, functions, and their role on leukocytes. *Annu Rev Immunol* 8: 365-400.
- Holzknicht ZE, Platt JL, 1995. Identification of porcine endothelial cell membrane antigens recognized by human xenoreactive natural antibodies. *J Immunol* 154: 4565-4575.

3. Caracterización de cuatro anticuerpos frente la β_1 integrina

- Hynes RO, 1992. Integrins: versatility, modulation, and signaling in cell adhesion. *Cell* 69: 11-25.
- Jiménez Marín A, Garrido JJ, de Andrés Cara DF, Morera L, Barbancho MJ, Llanes D, 2000. Molecular cloning and characterization of the pig homologue to human CD29, the integrin beta1 subunit. *Transplantation* 70: 649-655.
- Jiménez Marín A, 2002. Caracterización molecular de las integrinas beta-1 (CD29) y beta-3 (CD61) porcinas. Obtención de anticuerpos contra dominios específicos de ambas moléculas. Tesis doctoral.
- Jonjic N, Jilek P, Bernasconi S, Peri G, Martin_Padura I, Cenzuales S, Dejana E, Mantovani A, 1992. Molecules involved in the adhesion and cytotoxicity of activated monocytes on endothelial cells. *J Immunol* 148: 2080-2083.
- Joziase DH, Oriol R, 1999. Xenotransplantation: the importance of the Gal-alpha-(1,3)-Gal epitope in hyperacute vascular rejection. *Biochim Biophys Acta* 1455: 403-418.
- Koukoulis GK, Warren WH, Virtanen I, Gould VE, 1997. Immunolocalization of integrins in the normal lung and in pulmonary carcinomas. *Hum Pathol* 28: 1018-1025.
- Kumagai M, Schacter B, Yan Z, Michaelson J, Arn S, Smith M, White-Scharf M, Monroy R, Kurnich J, 1995. The cross-reactivity of anti-human adhesion mAb with primate and swine cells. En Schlossman SF et al. (Eds), *Proceedings of the fifth international workshop and conference held in Boston USA*. Oxford University Press, pp 1646-1648.
- Li G, Lillehoj HS, Min W, 2001. Production and characterization of monoclonal antibodies reactive with the chicken interleukin-15 receptor alpha chain. *Vet Immunol Immunopathol* 82: 215-227.
- Linfor J, Berger T, 2000. Potential role of alpha v and beta1 integrins as oocyte adhesion molecules during fertilization in pigs. *J Reprod Fertil* 120 :65-72.
- MacLaren LA, Wildeman AG, 1995. Fibronectin receptors in preimplantation development: cloning, expression, and localization of the alpha 5 and beta 1 integrin subunits in bovine trophoblast. *Biol Reprod* 53: 153-165.
- McWaters P, Hurst L, Chaplin PJ, Collins RA, Wood PR, Scheerlinck JP, 2000. Characterisation of monoclonal antibodies to ovine interleukin-6 and the development of a sensitive capture ELISA. *Vet Immunol Immunopathol* 73: 155-165.
- Ni H, Wilkins JA, 1998. Localisation of a novel adhesion blocking epitope on the human beta 1 integrin chain. *Cell Adhes Commun* 5: 257-271.
- Palacín Forgue A, 1984. Técnicas inmunohistoquímicas. Aspectos teórico-prácticos. Atom S.A.
- Plow EF, Haas TA, Zhang L, Loftus J, Smith JW, 2000. Ligand binding to integrins. *J Biol Chem* 275: 21785-21788.
- Richard C, Thibaudeau K, Charreau B, Loirat MJ, Naulet J, Blanchard D, Soullillou JP, Bouhours JF, 1998. Characterization of a murine monoclonal antibody specific for swine beta1 integrin. *Xenotransplantation* 5: 75-83.
- Robinson LA, Tu L, Steeber DA, Presi O, Platt JL, Tedder TF, 1998. The role of adhesion molecules in human leukocyte attachment to porcine vascular endothelium: implications for xenotransplantation. *J Immunol* 161: 6931-6938.

3. Caracterización de cuatro anticuerpos frente la β_1 integrina

- Schleimer RP, Sterbinsky SA, Kaiser J, Bickel CA, Klunk DA, Tomioka K, Newman W, Luscinskas FW, Gimbrone MA, McIntyre BW, 1992. IL-4 induces adherence of human eosinophils and basophils but not neutrophils to endothelium. Association with expression of VCAM-1. *J Immunol* 148: 1086-1092.
- Schneider MK, Strasser M, Gilli UO, Kocher M, Moser R, Seebach JD, 2002. Rolling adhesion of human NK cells to porcine endothelial cells mainly relies on CD49d-CD106 interactions. *Transplantation* 73: 789-796.
- Shang XZ, Issekutz AC, 1997. Beta 2 (CD18) and beta 1 (CD29) integrin mechanisms in migration of human polymorphonuclear leucocytes and monocytes through lung fibroblast barriers: shared and distinct mechanisms. *Immunology* 92: 527-535.
- Simon AR, Warrens AN, Yazzie NP, Seebach JD, Sachs DH, Sykes M, 1998. Cross-species interaction of porcine and human integrins with their respective ligands: implications for xenogeneic tolerance induction. *Transplantation* 66: 385-394.
- Skinner MP, Raines EW, Ross R, 1994. Dynamic expression of alpha 1 beta 1 and alpha 2 beta 1 integrin receptors by human vascular smooth muscle cells. Alpha 2 beta 1 integrin is required for chemotaxis across type I collagen-coated membranes. *Am J Pathol* 145: 1070-1081.
- Sopp P, Howard CJ, 1997. Cross-reactivity of monoclonal antibodies to defined human leucocyte differentiation antigens with bovine cells. *Vet Immunol Immunopathol* 56: 11-25.
- Springer TA, 1990. Adhesion receptors of the immune system. *Nature* 346: 425-434.
- Strobel T, Cannistra SA, 1999. Beta1-integrins partly mediate binding of ovarian cancer cells to peritoneal mesothelium in vitro. *Gynecol Oncol* 73: 362-367.
- Takada Y, 1997. CD guide: CD49c. En Kishimoto et al (Eds) *Leucocyte typing VI*. Garland Publishing, pp 1148-1149.
- Takada Y, 1997. CD guide: CD49e. En Kishimoto et al (Eds) *Leucocyte typing VI*. Garland Publishing, pp 1150.
- Tamkun JW, DeSimone DW, Fonda D, Patel RS, Buck C, Horwitz AF, Hynes RO, 1986. Structure of integrin, a glycoprotein involved in the transmembrane linkage between fibronectin and actin. *Cell* 46: 271-282.
- Tanaka Y, 1997. CD guide: CD29. En Kishimoto et al (Eds) *Leucocyte typing VI*. Garland Publishing, pp 1130.
- Tanaka Y, 1997. CD guide: CD49f. En Kishimoto et al (Eds) *Leucocyte typing VI*. Garland Publishing, pp 1150-1151.
- Tanaka Y, 2002. CD guide: CD49d. En Mason et al (Eds), *Leucocyte typing VII*. Oxford University Press, pp 798-799.
- Theodore PR, Simon AR, Warrens AN, Sackstein R, Sykes M, 2002. Porcine mononuclear cells adhere to human fibronectin independently of very late antigen-5: implications for donor-specific tolerance induction in xenotransplantation. *Xenotransplantation* 9: 277-289.
- Varner JA, Cheresh DA, 1996. Integrins and cancer. *Curr Opin Cell Biol* 8: 724-730.

3. *Caracterización de cuatro anticuerpos frente la β_1 integrina*

- Vilmos P, Kurucz E, Ocsovszki I, Keresztes G, Ando I, 1996. Phylogenetically conserved epitopes of leukocyte antigens. *Vet Immunol Immunopathol* 52: 415-426.
- Whittard JD, Akiyama SK, 2001. Activation of beta1 integrins induces cell-cell adhesion. *Exp Cell Res* 263: 65-76.
- Wilkins JA, Li A, Ni H, Stupack DG, Shen C, 1996. Control of beta1 integrin function. Localization of stimulatory epitopes. *J Biol Chem* 271: 3046-3051.
- Yee KO, Rooney MM, Giachelli CM, Lord ST, Schwartz SM, 1998. Role of beta1 and beta3 integrins in human smooth muscle cell adhesion to and contraction of fibrin clots in vitro. *Circ Res* 83: 241-251.
- Zhang XF, Feng MF, 2000. Adherence of human monocytes and NK cells to human TNF-alpha-stimulated porcine endothelial cells. *Immunol Cell Biol* 78:633-640.

4. CARACTERIZACIÓN PARCIAL DE UNA SERIE DE ANTICUERPOS MONOCLONALES FRENTE DIVERSOS ANTÍGENOS PORCINOS NO IDENTIFICADOS

4.1 Introducción

En este capítulo se describe la caracterización parcial de una serie de anticuerpos monoclonales fruto de fusiones en las que se emplearon PBMC porcinos como inmunógeno, y para los que no se ha logrado definir completamente el antígeno que reconocen. Dado el interés de los resultados preliminares obtenidos se han incluido en este trabajo.

De entre estos anticuerpos monoclonales cabe destacar GP3F1, que reconoce específicamente la totalidad de los linfocitos B y una subpoblación de los T que probablemente corresponda con los linfocitos $\gamma\delta$, y los anticuerpos monoclonales GP2D7 y GP4F8, que reconocen un mismo antígeno de superficie plaquetario.

4.2 Resultados

4.2.1 Selección y determinación del isotipo de los distintos anticuerpos

Los hibridomas GP3F1, GP2D7, GP4F8, GP2D5, GP2H4, GP4A6, GP1D8, GP3D12 y GP4A5 se seleccionaron inicialmente por su reacción positiva en ELISA indirecto frente a PBMC porcinos. Antes de proceder a su caracterización se comprobó su positividad en citometría de flujo frente a leucocitos y/o plaquetas porcinas y se determinó su isotipo, que fue IgG1 para todos ellos excepto GP1D8, que era IgG2b, y GP3F1, que era IgM.

4.2.2 Distribución celular de los antígenos

Mediante el empleo de técnicas de citometría de flujo se analizó la reactividad de los anticuerpos monoclonales en estudio con distintas poblaciones leucocitarias porcinas, así como con plaquetas, eritrocitos y macrófagos alveolares. Los resultados obtenidos se resumen en la tabla 4.1.

Dado que, de entre todos los anticuerpos en estudio, sólo GP3F1 reconocía una subpoblación leucocitaria restringida, fue el único para el que se procedió al estudio de su distribución frente a una batería estándar de anticuerpos contra marcadores leucocitarios

4. Caracterización parcial de varios anticuerpos

porcinos mediante citometría con dos fluorocromos sobre PBMC. Se confirmó que GP3F1 reconocía un antígeno ausente en monocitos (células SWC3 positivas) (figura 4.1). En torno a un 10% de las células CD3 positivas eran reconocidas por GP3F1, que reconocía también una subpoblación de las CD3 negativas. La totalidad de las células CD4 positivas y la mayoría de las CD8 positivas (un 80% aproximadamente) eran negativas para GP3F1, mientras que prácticamente todos los linfocitos B (identificados mediante un anticuerpo frente las IgM de superficie) eran reconocidos por dicho anticuerpo (figura 4.1). Las células GP3F1 positivas presentaban niveles bajos o intermedios de CD5 (figura 4.1).

Clon	Isotipo	Citometría en linfocitos	Citometría en monocitos	Citometría en granulocitos	Citometría en plaquetas	Citometría en macrófagos	Citometría en eritrocitos	Resultados en inmuno precipitación	Resultados en inmuno blotting
GP2D5	IgG1	+	+	+	-	-	-	-	-
GP2H4	IgG1	+	+	+	-	+	-	-	-
GP4A6	IgG1	+	+	+	-	+	-	-	-
GP1D8	IgG2b	-	-	-	+	x	-	-	-
GP2D7	IgG1	-	-	-	+	x	-	20, 80 y 115 kDa (cond red) 20, 115 y 140 kDa (cond no red)	-
GP4F8	IgG1	-	-	-	+	x	-	20, 80 y 115 kDa (cond red) 20, 115 y 140 kDa (cond no red)	-
GP3D12	IgG1	+	+	+	-	+	-	-	-
GP4A5	IgG1	+	+	+	-	+	-	-	-
GP3F1	IgM	+	-	-	-	-	-	-	-

Tabla 4.1. Resultados de los distintos anticuerpos monoclonales en estudio en citometría de flujo frente a distintas poblaciones celulares, así como en inmunoprecipitación y en inmunoblotting. (+) reacción positiva (-) sin reacción (x) no testado.

4.2.3 Peso molecular de los antígenos

Para determinar los pesos moleculares de los antígenos reconocidos por los anticuerpos monoclonales en estudio recurrimos a la inmunoprecipitación y el inmunoblotting sobre lisados de PBMC o plaquetas, en función de la distribución previamente determinada por citometría de flujo. Sólo se obtuvieron resultados para dos de los anticuerpos en estudio, GP2D7 y GP4F8 (tabla 4.1). Estos dos últimos anticuerpos reconocían aparentemente un mismo antígeno, posiblemente compuesto por varias

4. Caracterización parcial de varios anticuerpos

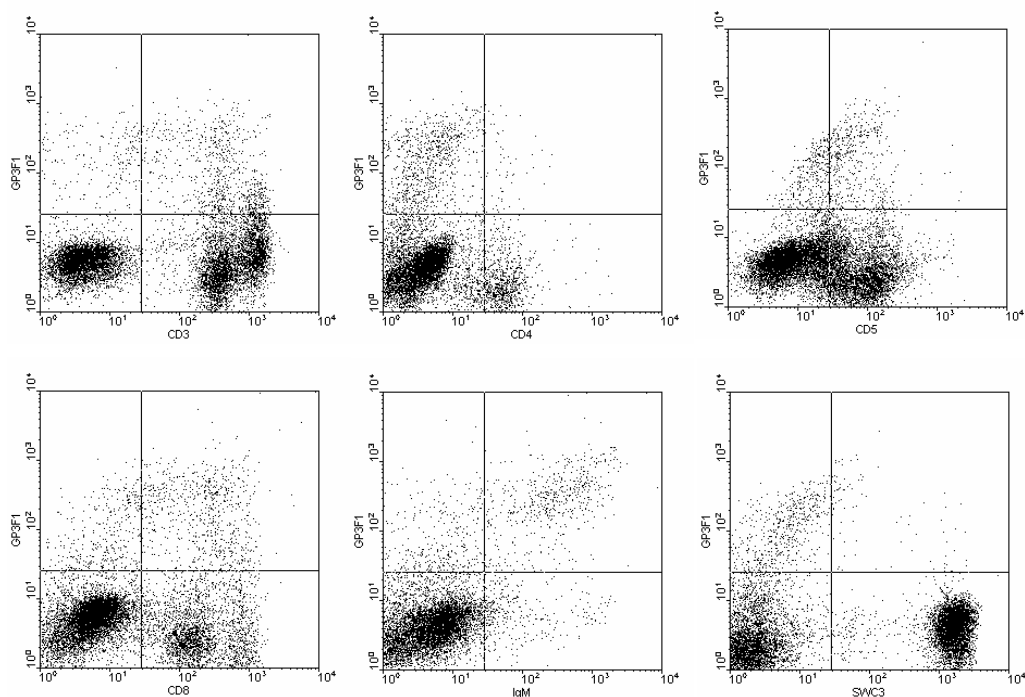


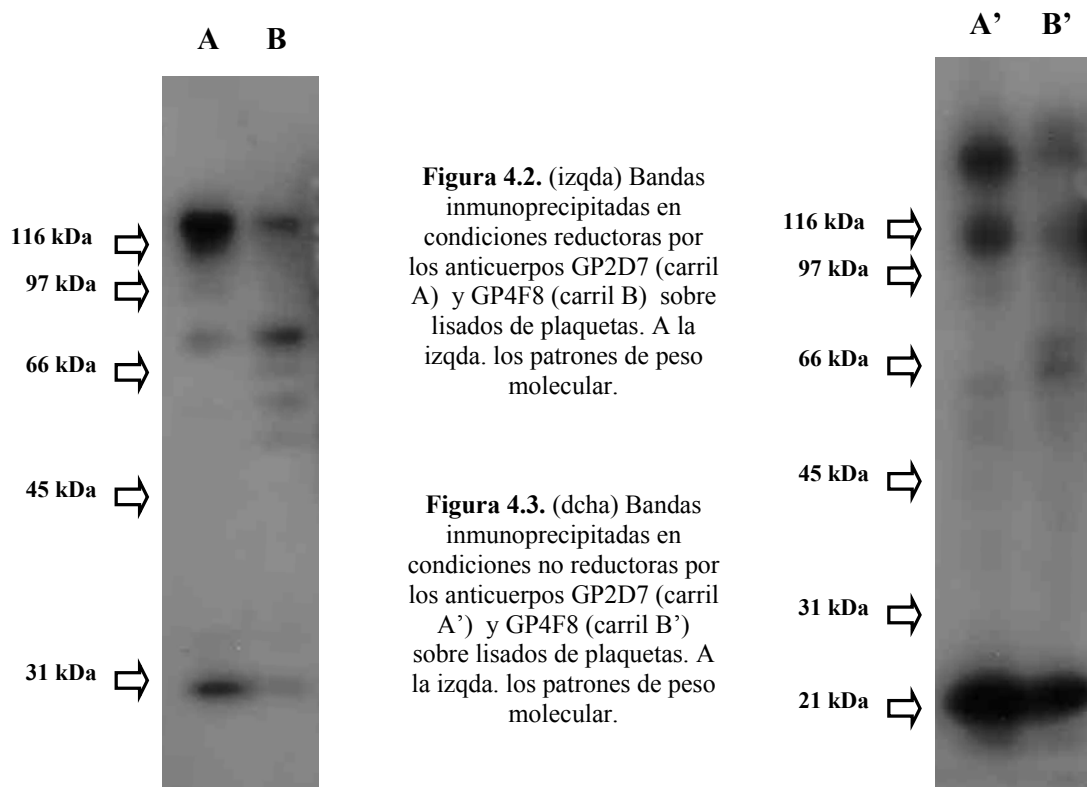
Figura 4.1. Estudio de la distribución del antígeno reconocido por GP43F1 frente a una batería estándar de marcadores leucocitarios porcinos: CD3, CD4, CD5, CD8, anti-IgM de superficie y SWC3, respectivamente.

subunidades distintas, coimmunoprecipitando tres bandas de los mismos pesos moleculares sobre lisados de plaquetas tanto en condiciones reductoras como no reductoras (figuras 4.2 y 4.3). En inmunoprecipitación secuencial, la preincubación de los lisados con el anticuerpo GP2D7 tuvo como consecuencia la desaparición de las bandas inmunoprecipitadas por GP4F8 y viceversa (figura 4.4), lo que indicaba que ambos anticuerpos reconocían un mismo antígeno.

4.3 Discusión

4.3.1 Generalidades

Mediante el desarrollo de anticuerpos monoclonales dirigidos contra PBMC porcinos se obtuvieron una serie de anticuerpos monoclonales. Si bien la mayoría de ellos reconocían antígenos presentes en las distintas subpoblaciones leucocitarias (tabla 4.1), cabe destacar la obtención de tres anticuerpos, GP1D8, GP2D7 y GP4F8, que reconocían antígenos plaquetarios ausentes en leucocitos. En nuestro laboratorio se han obtenido anticuerpos monoclonales anti-plaquetas fruto de fusiones en que se emplearon como inmunógeno PBMC ovinos, lo que ha sido atribuido a la adsorción de plaquetas en la



superficie de los leucocitos durante su aislamiento por gradiente de Ficoll (Pérez de la Lastra et al., 1996).

Dada la distribución panleucocitaria o restringida a plaquetas de la mayoría de los anticuerpos obtenidos y la ausencia de datos sobre peso molecular para casi todos ellos, se disponía de pocos indicios sobre los posibles antígenos reconocidos por estos anticuerpos. Como excepciones se pueden señalar los anticuerpos GP3F1, GP2D7 y GP4F8, que se discuten a continuación.

4.3.2 Anticuerpo GP3F1

El antígeno definido por el anticuerpo monoclonal GP3F1 se encuentra restringido a una subpoblación de linfocitos. Un estudio más detallado de su distribución, enfrentándolo a una batería estándar de anticuerpos contra marcadores linfocitarios porcinos, permitió determinar que dicha subpoblación estaba compuesta por la práctica totalidad de los linfocitos B y una subpoblación de linfocitos T que muy posiblemente se corresponda con los $\gamma\delta$.

Las células $\gamma\delta$ conforman una subpoblación compleja dentro de las células T porcinas, caracterizándose porque las cadenas de su complejo TCR son $\gamma\delta$, en lugar de $\alpha\beta$ como las del resto de células T. Si bien en un principio se definieron como linfocitos T que no expresaban CD4 ni CD8, actualmente se conoce la existencia de una subpoblación de células $\gamma\delta$ CD8 positivas (Davis et al., 1998). A pesar de la variedad de marcadores

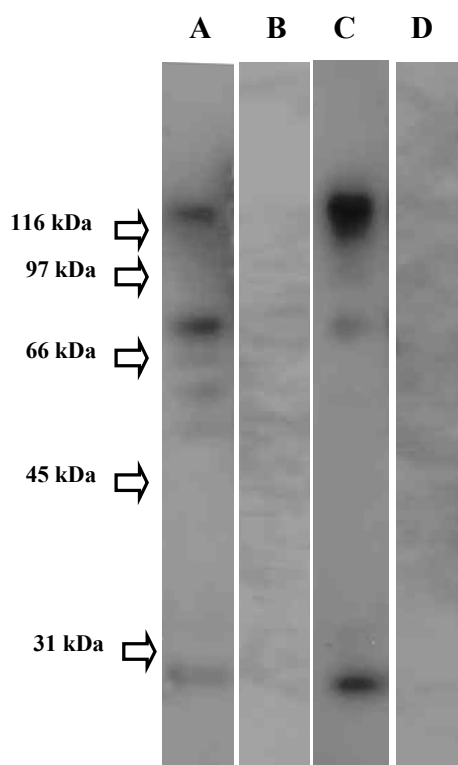


Figura 4.4. Inmunoprecipitación en condiciones reductoras con GP4F8 de un lisado de PBMC preincubado con GP2D7 (carril B) y con GP2D7 de un lisado de PBMC preincubado con GP4F8 (carril D).

Los carriles A y B son inmunoprecipitaciones de GP4F8 y GP2D7 de lisados de PBMC no tratados. A la izquierda los patrones de peso molecular.

expresados por las distintas subpoblaciones de células $\gamma\delta$, la totalidad de ellas son CD3 y CD5 positivas, presentando bajos niveles de expresión de este último marcador (Saalmüller et al, 1994; Davis et al., 1998). Estas características inmunofenotípicas coinciden con las de la subpoblación de linfocitos T reconocida por el anticuerpo GP3F1.

Si bien se han descrito en cerdo anticuerpos monoclonales que definen antígenos presentes tanto en subpoblaciones de células $\gamma\delta$ como en otras subpoblaciones restringidas de linfocitos T $\alpha\beta$ (Davis et al., 2001), ninguno de ellos presentó un patrón similar al de GP3F1. Sólo uno de los anticuerpos empleados en el estudio mencionado reconoció células $\gamma\delta$ y linfocitos B, pero se trata de un anticuerpo frente a la isoforma CD45RA de CD45, que también se expresa en monocitos (Zuckermann et al., 1998), contrariamente al antígeno reconocido por GP3F1.

4.3.3 Anticuerpos GP2D7 y GP4F8

Los anticuerpos monoclonales GP2D7 y GP4F8, pese a proceder de una fusión en la que se emplearon PBMC porcinos como inmunógeno, reconocían específicamente un mismo antígeno presente en plaquetas y ausente de las distintas subpoblaciones

leucocitarias y de eritrocitos. El estudio de los anticuerpos monoclonales reactivos con plaquetas porcinas no está demasiado avanzado y hasta el III Workshop no se ha procedido a su análisis en una sección independiente (Llanes et al., 2001). A la vista de los resultados recogidos en dicho informe, GP2D7 y GP4F8 no pueden incluirse en ninguno de los clusters definidos para los anticuerpos que reconocen plaquetas porcinas (CD29, CD41/61, CD46 y CD47) sea por su distribución celular, sea por el peso molecular del antígeno que inmunoprecipitan.

De entre los antígenos CD principalmente expresados en plaquetas, el más similar al reconocido por GP2D7 y GP4F8 es el complejo CD42, tanto por la ausencia de expresión en leucocitos y eritrocitos como por el peso molecular de los componentes de dicho antígeno (De Haas & vom dem Borne, 1997). El complejo CD42 es un tetrámero compuesto por cuatro glicoproteínas transmembranarias: CD42a, CD42b, CD42c y CD42d, cuya expresión está restringida a plaquetas y megacariocitos. Este complejo desempeña un importante papel en la adhesión de las plaquetas del subendotelio, ya que es el principal receptor del factor de von Willebrand en la membrana plaquetaria (Valentin et al., 1997). Una deficiencia en la expresión de CD42 causa un trastorno hemorrágico hereditario conocido como síndrome de Bernard-Soulier en el que se ve afectada la capacidad de adhesión de las plaquetas y su respuesta a la trombina (Aioriello et al., 1997).

En la literatura no existe constancia de estudios sobre el complejo CD42 en la especie porcina. El antígeno reconocido por GP2D7 y GP4F8 podría tratarse del homólogo porcino de alguna de las subunidades CD42, pero presenta ciertas diferencias en su comportamiento en inmunoprecipitación con los anticuerpos descritos en humanos, principalmente en el peso molecular de los antígenos inmunoprecipitados en condiciones no reductoras, que, si bien podrían atribuirse a peculiaridades de la especie porcina, hacen imposible asignar con certeza los anticuerpos en estudio a ese CD. Para la caracterización definitiva de estos dos anticuerpos se debería purificar y secuenciar el antígeno que reconocen, aprovechando su alta afinidad por el mismo, puesta en evidencia por su capacidad para inmunoprecipitarlo (Harlow & Lane, 1988).

4.3.3 Posibles aplicaciones

El anticuerpo GP3F1, dada su peculiaridad de reconocer un antígeno presente tanto en linfocitos B como probablemente en linfocitos T $\gamma\delta$, podría ser utilizado para el estudio y definición de las distintas subpoblaciones linfocitarias, en particular las células $\gamma\delta$. Por su parte, los anticuerpos GP2D7 y GP4F8 serían de interés para el estudio de las plaquetas porcinas, aumentando el panel de anticuerpos disponibles frente a ese tipo celular. El resto de anticuerpos obtenidos, dado la escasez de datos sobre su distribución celular y el peso molecular de los antígenos que reconocen, deberían ser mejor caracterizados antes de poder encontrarles algún tipo de aplicación.

4.3.4 Conclusiones

Mediante técnicas bioquímicas y de citometría de flujo se han caracterizado parcialmente una serie de anticuerpos monoclonales, de entre los que destacan GP3F1, GP2D7 y GP4F8. El primero de ellos reconoce linfocitos B y una subpoblación de linfocitos T que posiblemente se corresponda con las células $\gamma\delta$, por lo que podría ser de utilidad en estudios relacionados con los linfocitos porcinos. GP2D7 y GP4F8 reconocen un antígeno polimérico de membrana presente en plaquetas, posiblemente relacionado con el complejo CD42, pero estudios más profundos serían necesarios para confirmar esta hipótesis.

4.4 Bibliografía

- Amoriello A, Tremitterra E, Lo Pardo C, Esposito G, Licenziati MR, Del Vecchio L, 1997. CD42a-d Workshop: Flow cytometric análisis of CD42 and CD41 section: Impaired expresión of GPIIb/IIIa on platelets lacking GPIX in Bernard-Soulier síndrome. En Kishimoto et al (Eds) Leucocyte typing VI. Garland Publishing, pp 655-656.
- Davis WC, Zuckermann FA, Hamilton MJ, Barbosa JI, Saalmuller A, Binns RM, Licence ST, 1998. Analysis of monoclonal antibodies that recognize gamma delta T/null cells. *Vet Immunol Immunopathol* 60: 305-316.
- Davis WC, Haverson K, Saalmuller A, Yang H, Lunney JK, Hamilton MJ, Pescovitz MD, 2001. Analysis of monoclonal antibodies reacting with molecules expressed on gammadelta T-cells. *Vet Immunol Immunopathol* 80: 53-62.
- De Haas M, von dem Borne AEGK, 1997. Platelet antigens: Section report. En Kishimoto et al (Eds) Leucocyte typing VI. Garland Publishing, pp 625-628.

4. Caracterización parcial de varios anticuerpos

- Harlow E, Lane D, 1988. Antibodies. A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory, EEUU.
- Llanes D, Arce C, de la Lastra JP, de Andrés D, Barbancho M, Morera L, Moreno A, Lucena C, Jiménez Marín A, Abdel Aziz YE, Paños G, Garrido JJ, Haverson K, 2001. Swine platelet antigens: section report. *Vet Immunol Immunopathol* 80: 131-142.
- Pérez de la Lastra JM, Mateo A, Dusinsky R, Simon M, Llanes D, 1996. Two monoclonal antibodies from the platelet panel recognize sheep plasma fibrinogen. *Vet Immunol Immunopathol*, 52:4 371-5.
- Saalmüller A, Hirt W, Maurer S, Weiland E, 1994. Discrimination between two subsets of porcine CD8+ cytolytic T lymphocytes by the expression of CD5 antigen. *Immunology* 81: 578-583.
- Valentin N, Goyenaga MH, Muller JY, Blanchard D, 1997. CD42a-d Workshop: Section report on CD42 subsection. En Kishimoto et al (Eds) *Leucocyte typing VI*. Garland Publishing, pp 659-660.
- Zuckermann FA, Peavey C, Schnitzlein WM, Schabacker D, Husmann RJ, Yang H, Saalmuller A, Lunney JK, 1998. Definition of the specificity of monoclonal antibodies against porcine CD45 and CD45R: report from the CD45/CD45R and CD44 subgroup of the Second International Swine CD Workshop. *Vet Immunol Immunopathol* 60: 367-387.

5. ESTUDIO DE LA EXPRESIÓN DE PrP^C (CD230) EN LEUCOCITOS Y PLAQUETAS PORCINOS MEDIANTE EL EMPLEO DE UN ANTICUERPO MONOCLONAL ESPECÍFICO

5.1 Introducción

La isoforma celular de la proteína prión, también conocida como PrP^C o CD230, es una pequeña glicoproteína anclada a la membrana celular mediante un enlace tipo glicosil fosfatidil inositol (GPI) (Dodelet & Cashman, 1998). Aunque su estructura no está completamente elucidada, en ella predomina la conformación en hélice α sobre las hojas β y se ha predicho la existencia de 4 regiones de estructura secundaria denominadas H1 a H4 (Prusiner, 1997). En función de su grado de glicosilación, PrP^C presenta tres glicofomas de distinto peso molecular, desde los 27 a los 42 kDa, que se han detectado en diversas especies animales, incluyendo humano y ratón, mediante el empleo de anticuerpos monoclonales específicos (Zanusso et al., 1998).

PrP^C está presente mayoritariamente en el cerebro, pero también se ha detectado su expresión en una amplia variedad de tejidos y órganos: diversas células sanguíneas, corazón, músculo esquelético, pulmón, intestino, bazo y otros órganos (Bendheim et al., 1992). Se trata de una proteína de membrana muy conservada a lo largo de la evolución (Westaway & Prusiner, 1986) y que se ha detectado en todas las especies de mamíferos estudiadas con una homología en la secuencia de aminoácidos superior al 90% (Groschup et al., 1997), lo que sugiere una función de vital importancia para dicha molécula. Sin embargo, ratones knock-out para el gen que codifica PrP^C presentan un desarrollo y una conducta completamente normal hasta los 7 meses de edad (Büeler et al., 1992), aunque estudios posteriores permitieron constatar distintas anomalías de la función sináptica y los ritmos circadianos y la pérdida de células cerebelares de Purkinje (Collinge et al., 1994; Tobler et al., 1996; Sakaguchi et al., 1996).

Las funciones de PrP^C no han sido completamente determinadas, pero su localización en la membrana celular la hacen candidata a desempeñar funciones de señalización, adhesión o transporte celular (Politopoulou et al., 2000). El estudio de líneas celulares procedentes de ratones knock-out para PrP^C ha permitido observar anomalías en la regulación de genes relacionados con la proliferación celular, la diferenciación y la supervivencia, lo que indicaría un posible papel de dicho marcador en la morfogénesis y

5. Estudio de la expresión de PrP^C en leucocitos y plaquetas

adhesión celular (Sato et al., 2000). En ese mismo sentido apunta el que PrP^C actúe como receptor específico de alta afinidad de la laminina (Graner et al., 2000). También se ha relacionado esta proteína con el metabolismo del cobre y con un posible papel en la regulación de los niveles de este elemento y en la protección de las células del daño oxidativo (Politopoulou et al., 2000).

El estudio del patrón de expresión de PrP^C en determinadas subpoblaciones celulares podría ser de interés para la determinación de sus funciones. En leucocitos de la especie humana y roedores se ha detectado la expresión de esta molécula en monocitos y linfocitos, pero no en granulocitos (Cashman et al., 1990, Bendheim et al., 1992). PrP^C se expresa desde las primeras fases de la hematopoyesis, manteniéndose su expresión en monocitos y linfocitos, pero desapareciendo durante la diferenciación de los granulocitos (Dodelet & Cashman, 1998). Mediante el uso de anticuerpos policlonales se ha constatado un aumento en la expresión de PrP^C en la superficie de los linfocitos tras su activación. Dichos anticuerpos inhiben la activación inducida por mitógenos, lo que permite atribuir a PrP^C un papel en la activación celular (Cashman et al., 1990). También se ha señalado el aumento de la expresión de PrP^C con respecto a los niveles normales en plaquetas y monocitos activados (Barclay et al., 1999; Dürig et al., 2000).

El estudio de PrP^C tiene un gran interés desde el punto de vista médico, dada la implicación de esta glicoproteína en la patogenia de las encefalopatías espongiformes. Bajo este nombre se agrupan una serie de enfermedades neurodegenerativas que afectan tanto a la especie humana como a diversas especies animales (tabla 5.1) y que se caracterizan por la acumulación en el sistema nervioso central de una isoforma aberrante de PrP^C denominada proteína prión anormal o PrP^{Sc} que acarrea una degeneración espongiforme del cerebro acompañada de sintomatología nerviosa (Demart et al., 1999). La conversión de PrP^C en PrP^{Sc} conlleva un cambio en la conformación de la proteína por el cual su contenido en hélices α disminuye en favor de las hojas β , lo que modifica profundamente las propiedades de la proteína, que en la forma alterada es insoluble en detergentes no desnaturizantes y parcialmente resistente a la digestión por proteasas (Prusiner, 1997).

En función de su etiología las encefalopatías espongiformes o enfermedades priónicas pueden ser esporádicas, hereditarias o infecciosas (tabla 5.1). Estas últimas revisten un especial interés, en tanto que suponen un problema de salud pública por el

5. Estudio de la expresión de PrP^C en leucocitos y plaquetas

posible carácter de zoonosis de la encefalopatía espongiforme bovina, que ha podido transmitirse a la especie humana a través de la cadena alimentaria dando origen a los casos de la nueva variante de la enfermedad de Creutzfeldt-Jakob (Prusiner, 1997; Demart et al., 1999).

Enfermedad	Especie afectada	Etiología
Kuru	Humana	Infección por canibalismo ritual
Enfermedad de Creutzfeldt-Jakob iatrogénica	Humana	Infección por hormona del crecimiento, trasplantes de dura mater o material quirúrgico contaminado con PrP ^{Sc}
Nueva variante de la enfermedad de Creutzfeldt-Jakob	Humana	¿Infección por ingestión de PrP ^{Sc} de origen bovino?
Enfermedad de Creutzfeldt-Jakob familiar	Humana	Mutaciones en el gen de PrP ^C
Enfermedad de Gerstmann-Straüssler-Scheinker	Humana	Mutaciones en el gen de PrP ^C
Insomnio fatal familiar	Humana	Mutaciones en el gen de PrP ^C
Enfermedad de Creutzfeldt-Jakob esporádica	Humana	¿Mutación somática o conversión espontánea de PrP ^C en PrP ^{Sc} ?
Tembladera	Oveja y cabra	Infección de animales genéticamente susceptibles
Encefalopatía espongiforme bovina	Vaca	Infección por consumo de harinas de origen animal contaminadas con PrP ^{Sc}
Encefalopatía transmisible del visón	Visón	Infección por consumo de harinas de origen animal contaminadas con PrP ^{Sc}
Enfermedad de desgaste crónico	Alce y ciervo	Desconocida
Encefalopatía espongiforme felina	Gato	Infección por consumo de harinas de origen animal contaminadas con PrP ^{Sc}
Encefalopatía de los ungulados exóticos	Kudu, nyala y óryx	Infección por consumo de harinas de origen animal contaminadas con PrP ^{Sc}

Tabla 5.1. Principales encefalopatías espongiformes que afectan a las distintas especies animales y a la especie humana y etiología de las mismas. Adaptado de Prusiner, 1997.

Las encefalopatías espongiformes transmisibles son enfermedades infecciosas causadas por agentes infecciosos no convencionales distintos de las bacterias, hongos, parásitos, viroides y virus y denominados priones. Los priones son partículas infectivas proteináceas carentes de ácido nucleico y compuestas por moléculas de la isoforma anormal de PrP^C (PrP^{Sc}) iguales a las que se acumulan en el sistema nervioso central de los individuos afectados por este tipo de patologías (Prusiner, 1991). Para el desarrollo de estas enfermedades es necesario que el individuo exprese normalmente PrP^C, como pone de manifiesto el que ratones knock-out para PrP^C inoculados con el prión de la tembladera de la oveja no desarrollen lesiones ni síntomas de dicha enfermedad (Büeler et al., 1993).

La patogenia de las encefalopatías espongiformes transmisibles es aparentemente muy compleja. Estudios experimentales demuestran que, tras la ingestión o la inoculación periférica de partículas infectivas, la infección comienza en el sistema inmune, habiéndose descrito la acumulación de PrP^{Sc} en tejido linfóide de afectados de la nueva variante de la enfermedad de Creutzfeldt-Jakob (Hilton et al., 1998; Hill et al, 1999). Se ha señalado la

implicación de las células dendríticas intestinales en el transporte de PrP^{Sc} desde la luz del intestino al tejido linfoide (Huang et al., 2002). Para la replicación del agente patógeno en este tejido es imprescindible que las células dendríticas foliculares expresen PrP^C (Brown et al., 1999). Los linfocitos B desempeñan un papel crucial en la transmisión del agente patógeno al sistema nervioso central y en la progresión de la enfermedad (Klein et al., 1997) para el que, sin embargo, no es necesario que expresen PrP^C (Klein et al., 1998). También se ha especulado sobre la posible implicación de las células dendríticas mieloides en la diseminación de PrP^{Sc} (Burthem et al., 2001).

El mecanismo mediante el cual PrP^{Sc} media la transformación de las isoformas normales (PrP^C) en nuevas isoformas alteradas, cuya acumulación en el tejido nervioso origina toda la sintomatología propia de estas enfermedades, no está aún elucidado. La hipótesis de Prusiner (1991) postula que una molécula de PrP^{Sc} se une a una molécula de PrP^C formando un heterodímero que se transforma en dos moléculas de PrP^{Sc}. Para que esta transformación tenga lugar se supone que es necesaria la mediación de un factor, posiblemente una proteína, que se une a PrP^C y facilita la formación de PrP^{Sc} (Prusiner, 1997).

Al igual que el resto de mamíferos la especie porcina expresa normalmente PrP^C, habiéndose secuenciado el gen del homólogo porcino de esta glicoproteína. Dicho gen codifica una proteína de 257 aminoácidos y su secuencia presenta una homología superior al 75% con la de los genes correspondientes de otros mamíferos (Martin et al., 1995). Mediante el empleo de antisueros frente a PrP^C ovino se ha constatado la presencia de esta proteína en el sistema nervioso central del cerdo (Groschup et al., 1997). Sin embargo, no existen estudios sobre la expresión de este marcador en otros órganos o tejidos porcinos.

En este trabajo se aborda por primera vez el estudio de la expresión del homólogo porcino de PrP^C en leucocitos y plaquetas porcinos mediante el empleo de 8H4, un anticuerpo monoclonal desarrollado por inmunización de ratones knock-out para PrP^C con PrP^C murino recombinante y que reconoce un epítipo situado en el extremo carbono terminal de PrP^C, entre los residuos 145 y 220 (Zanusso et al., 1998).

5.2 Resultados

5.2.1 Inmunoblotting sobre extracto crudo de cerebro

Mediante inmunoblotting realizado en condiciones reductoras con el anticuerpo monoclonal 8H4 sobre un extracto crudo de cerebro porcino se identificaron dos bandas de aproximadamente 30-35 y 40 kDa de peso molecular (figura 5.1). La más ligera de estas bandas era similar a la reconocida por el mismo anticuerpo sobre un extracto crudo de cerebro de cabra, aunque ésta presentó un peso molecular ligeramente superior (figura 5.1).

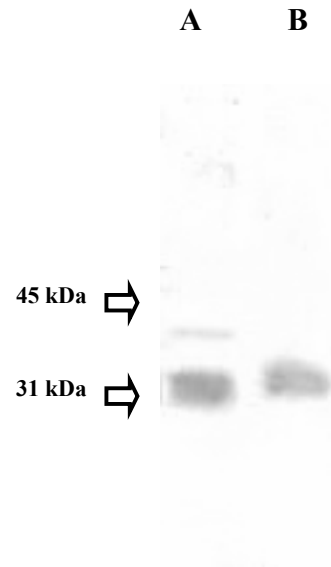


Figura 5.1. Inmunoblotting con el anticuerpo 8H4 sobre extractos crudos de cerebro porcino (tira A) y caprino (tira B). A la izqda. los patrones de peso molecular.

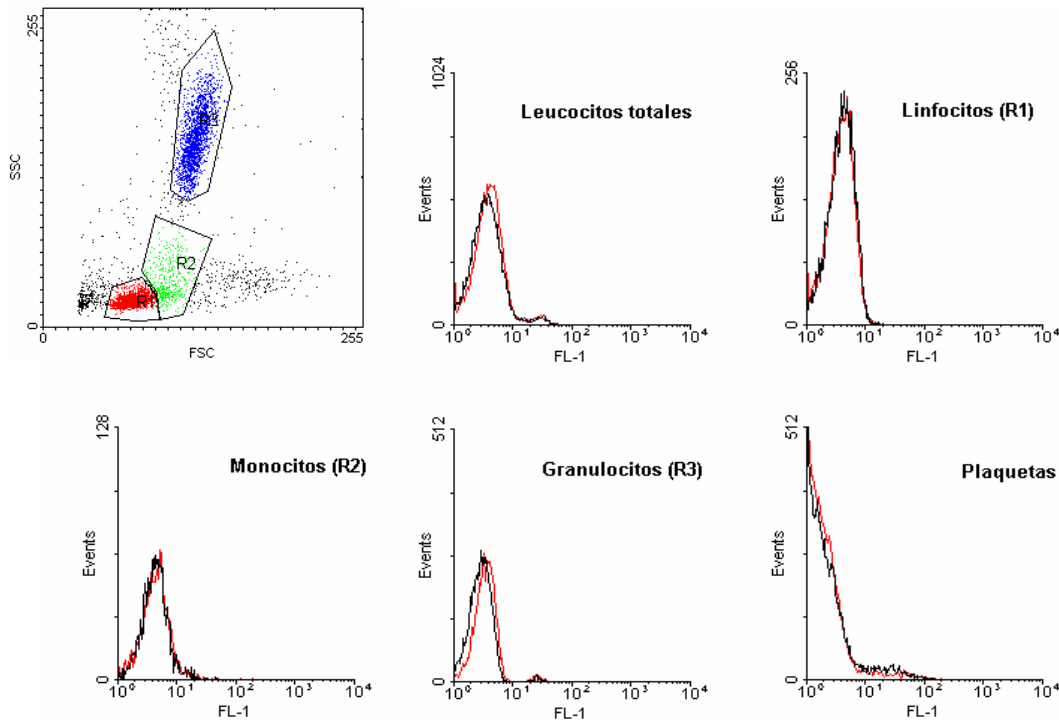


Figura 5.2. Análisis mediante citometría de flujo de la expresión de PrP^C en diversas poblaciones celulares porcinas empleando el anticuerpo monoclonal 8H4 (en rojo). En negro, los controles negativos

5.2.2 Estudio de la expresión de PrP^C en leucocitos y plaquetas porcinos

Para el estudio de la expresión del receptor PrP^C en leucocitos y plaquetas porcinos se recurrió a las técnicas de citometría de flujo indirecta, empleando con este fin el anticuerpo monoclonal 8H4. En todas las poblaciones celulares estudiadas (linfocitos, monocitos, granulocitos y plaquetas) se obtuvieron niveles de fluorescencia próximos a los de los correspondientes controles (figura 5.2).

5.3 Discusión

5.3.1 Reactividad cruzada del anticuerpo 8H4

Para comprobar la reactividad del anticuerpo monoclonal 8H4 con el homólogo porcino de PrP^C se empleó en inmunoblotting sobre un extracto crudo de cerebro porcino. Este anticuerpo había demostrado ya su eficacia en esa técnica, reconociendo PrP^C en extractos de cerebro de vaca, oveja, chimpancé, ardilla y diversas especies de monos (Zanusso et al., 1998). Aunque se ha demostrado mediante inmunoblotting y técnicas inmunohistoquímicas la reactividad cruzada con PrP^C porcino de distintos antisueros dirigidos contra PrP^C de vaca, hámster, oveja y ratón (Groschup et al., 1994; Groschup et al., 1997; Ryder et al., 2000) no se encontraron referencias sobre el empleo de 8H4 ni de otros anticuerpos monoclonales en el estudio de la expresión de PrP^C en la especie porcina.

Las bandas reconocidas por 8H4 en el extracto crudo de cerebro de cerdo eran de aproximadamente 30-35 y 40 kDa de peso molecular (figura 5.1). La más ancha de estas bandas es similar a la detectada en la especie porcina por Groschup y colaboradores (1997) en un estudio con distintos antisueros frente a PrP^C ovino. En dicho trabajo también se estudió la especie caprina, que presentaba una sola banda de peso molecular ligeramente superior a la encontrada en cerdo, resultados similares a los obtenidos con el anticuerpo monoclonal 8H4 (figura 5.1). La presencia de la banda de 45 kDa puede corresponder a alguna de las isoformas altamente glicosiladas de PrP^C (Zanusso et al., 1998), aunque el patrón de bandas en inmunoblotting obtenido con los diversos anticuerpos frente a PrP^C varía dentro de la misma especie en función del anticuerpo utilizado y de la técnica de obtención de los lisados o extractos (Groschup et al., 1997; Zanusso et al., 1998; Holada & Vostal, 2000).

5.3.2 Expresión de PrP^C en leucocitos y plaquetas porcinos

Una vez comprobada la reactividad del anticuerpo monoclonal 8H4 con el homólogo porcino de PrP^C se procedió al estudio mediante citometría de flujo indirecta de la expresión de dicho marcador en las distintas subpoblaciones de leucocitos y en plaquetas porcinas. El anticuerpo 8H4 ya había sido empleado con anterioridad en citometría de flujo con resultados satisfactorios (Zanusso et al., 1998; Herrmann et al., 2001).

A la vista de los resultados obtenidos, concluimos que los leucocitos y plaquetas de la especie porcina no expresaban en sus membranas citoplasmáticas niveles detectables de PrP^C. Este patrón de expresión es muy similar al descrito para el hámster (Holada & Vostal, 2000), una de las especies en que se ha estudiado mediante el empleo de anticuerpos monoclonales en citometría de flujo la expresión de PrP^C en las poblaciones celulares de sangre periférica. La expresión de este marcador presenta grandes diferencias entre unas especies y otras. Así, un estudio en la especie humana constató la expresión de PrP^C en linfocitos, monocitos y plaquetas y su ausencia de granulocitos y eritrocitos (Barclay et al., 1999). Un trabajo posterior coincide con estos resultados, aunque señala la expresión en eritrocitos de bajos niveles de PrP^C (Holada & Vostal, 2000). En este trabajo se describe también un patrón de expresión similar en ratón, con la única diferencia de que no se detecta expresión en plaquetas. En oveja también se han llevado a cabo estudios similares utilizando precisamente el anticuerpo 8H4, habiendo observado reacción con linfocitos y monocitos, pero no con granulocitos ni plaquetas (Herrmann et al., 2001). Estos resultados coinciden con los obtenidos en nuestros ensayos preliminares con leucocitos y plaquetas ovinos y caprinos para comprobar la positividad de 8H4 en citometría de flujo (resultados no mostrados).

Puesto que estudios en roedores infectados experimentalmente de encefalopatía espongiforme transmisible demuestran la capacidad infectiva de la sangre, tanto de su componente celular como del plasma (Brown et al., 1998), y que diversas subpoblaciones celulares sanguíneas se han relacionado con la diseminación del agente causal de dichas patologías (Klein et al., 1997; Burthem et al., 2001), estas diferencias en los patrones de expresión de PrP^C entre distintas especies animales podrían reflejar diferencias en la cantidad y distribución de la capacidad infectiva de la sangre. Sin embargo, ratones y hamsters infectados de encefalopatía espongiforme transmisible presentan similares niveles

de capacidad infectiva ligada a la sangre (Brown et al., 1998), a pesar de la gran diferencia en sus patrones de expresión de PrP^C, mientras que ratones infectados con distintas cepas de PrP^{Sc} presentan diferencias en la distribución tisular de la capacidad infectiva (Brown et al., 1999). Es probable que exista una interacción entre los patrones de expresión de PrP^C en las células sanguíneas de las distintas especies y las diversas cepas de PrP^{Sc}, cuya influencia en la capacidad infectiva de la sangre está por determinar (Holada & Vostal, 2000).

5.3.3 Posibles aplicaciones

Los anticuerpos monoclonales frente a PrP^C (CD230) tienen diversas aplicaciones, dada la relación directa de esta glicoproteína con las encefalopatías espongiformes y el interés que existe en el estudio de este tipo de trastornos. Así, se han empleado anticuerpos monoclonales en el estudio de la estructura de PrP^{Sc} en distintas especies y sus posibles implicaciones en la patogenia de las encefalopatías espongiformes (Demart et al., 1999). La identificación de los tejidos y poblaciones celulares que expresan PrP^C en condiciones normales puede proporcionar claves sobre los mecanismos de diseminación de la isoforma alterada en el organismo de los animales afectados de encefalopatías espongiformes transmisibles y en su estudio se han empleado diversos anticuerpos monoclonales (Zanusso et al., 1998; Holada & Vostal, 2000; Herrmann et al, 2001; Burthem et al, 2001; Kubosaki et al, 2001). También en el estudio de las modificaciones de la expresión de PrP^C en las células hemáticas a lo largo de su diferenciación (Dodelet & Cashman, 1998) o en función de la edad (Politoupolou et al., 2000) se han empleado anticuerpos monoclonales con el fin de determinar las posibles implicaciones de dichas modificaciones en la patogenia o la susceptibilidad a determinadas encefalopatías espongiformes.

Una de las aplicaciones más interesantes de los anticuerpos monoclonales frente a PrP^C es en el diagnóstico de la encefalopatía espongiforme bovina, dada la enorme importancia económica y sanitaria de esta patología. El test Prionics, desarrollado por una compañía suiza, se basa en un inmunoblotting rápido sobre muestras de tejido encefálico de los animales sospechosos tratadas con proteinasa K, que lisa PrP^C pero no PrP^{Sc}. Los individuos infectados presentan reacción con el anticuerpo empleado, mientras que en los sanos no se observa reacción (Cooley et al., 2001). Este test diagnóstico ha sido introducido

en el Reino Unido como test oficial para confirmar el diagnóstico en los casos sospechosos de encefalopatía espongiforme bovina y tembladera.

Aunque en la especie porcina no se ha descrito la existencia natural de ninguna encefalopatía espongiforme transmisible, se ha conseguido reproducir experimentalmente en cerdos la sintomatología y lesiones de la encefalopatía espongiforme bovina mediante inoculación parenteral de homogeneizados de cerebro de vacas afectadas por ese trastorno (Dawson et al., 1990; Ryder et al., 2000). Dadas las características del cerdo y su similitud con la especie humana, podría plantearse su utilización como modelo en los estudios sobre encefalopatías espongiformes humanas, en especial la nueva variante de la enfermedad de Creutzfeldt-Jakob. La puesta en práctica de este tipo de estudios requeriría de un conocimiento más profundo de la expresión normal de PrP^C en la especie porcina, para lo que sería necesario disponer de anticuerpos monoclonales que reconocieran dicha molécula. Los resultados de este trabajo supondrían un primer paso en esa dirección.

5.3.4 Conclusiones

En este capítulo se describe por primera vez la reacción de 8H4, un anticuerpo monoclonal frente a PrP^C murino, con PrP^C (CD230) porcino. También se aborda por primera vez el estudio de la expresión en leucocitos y plaquetas de la especie porcina de PrP^C, señalando sus peculiaridades con respecto al patrón de expresión en otras especies animales. Finalmente se discuten las posibles aplicaciones prácticas del anticuerpo 8H4 en estudios sobre encefalopatías espongiformes humanas en que se empleara al cerdo como modelo animal.

5.4 Bibliografía

- Barclay GR, Hope J, Birkett CR, Turner ML, 1999. Distribution of cell-associated prion protein in normal adult blood determined by flow cytometry. *Br J Haematol* 107: 804-814.
- Bendheim PE, Brown HR, Rudelli RD, Scala LJ, Goller NL, Wen GY, Kascsak RJ, Cashman NR, Bolton DC, 1992. Nearly ubiquitous tissue distribution of the scrapie agent precursor protein. *Neurology* 42: 149-156.
- Brown P, Rohwer RG, Dunstan BC, MacAuley C, Gajdusek DC, Drohan WN, 1998. The distribution of infectivity in blood components and plasma derivatives in experimental models of transmissible spongiform encephalopathy. *Transfusion* 38: 810-816.

5. Estudio de la expresión de PrP^C en leucocitos y plaquetas

- Brown KL, Stewart K, Ritchie DL, Mabbott NA, Williams A, Fraser H, Morrison WI, Bruce ME, 1999. Scrapie replication in lymphoid tissues depends on prion protein-expressing follicular dendritic cells. *Nat Med* 5: 1308-1312.
- Büeler H, Fischer M, Lang Y, Bluethmann H, Lipp HP, DeArmond SJ, Prusiner SB, Aguet M, Weissmann C, 1992. Normal development and behaviour of mice lacking the neuronal cell-surface PrP protein. *Nature* 356: 577-582.
- Büeler H, Aguzzi A, Sailer A, Greiner RA, Autenried P, Aguet M, Weissmann C, 1993. Mice devoid of PrP are resistant to scrapie. *Cell* 73: 1339-1347.
- Burthem J, Urban B, Pain A, Roberts DJ, 2001. The normal cellular prion protein is strongly expressed by myeloid dendritic cells. *Blood* 98: 3733-3738.
- Cashman NR, Loertscher R, Nalbantoglu J, Shaw I, Kasesak RJ, Bolton DC, Bendheim PE, 1990. Cellular isoform of the scrapie agent protein participates in lymphocyte activation. *Cell* 61: 185-192.
- Collinge J, Whittington MA, Sidle KC, Smith CJ, Palmer MS, Clarke AR, Jefferys JG, 1994. Prion protein is necessary for normal synaptic function. *Nature* 370: 295-297.
- Cooley WA, Clark JK, Ryder SJ, Davis LA, Farrelly SS, Stack MJ, 2001. Evaluation of a rapid western immunoblotting procedure for the diagnosis of bovine spongiform encephalopathy (BSE) in the UK. *J Comp Pathol* 125: 64-70.
- Dawson M, Wells GA, Parker BN, Scott AC, 1990. Primary parenteral transmission of bovine spongiform encephalopathy to the pig. *Vet Rec* 127: 338.
- Demart S, Fournier JG, Creminon C, Frobert Y, Lamoury F, Marce D, Lasmezas C, Dormont D, Grassi J, Deslys JP, 1999. New insight into abnormal prion protein using monoclonal antibodies. *Biochem Biophys Res Commun* 265: 652-657.
- Dodelet VC, Cashman NR, 1998. Prion protein expression in human leukocyte differentiation. *Blood* 91: 1556-1561.
- Dürig J, Giese A, Schulz-Schaeffer W, Rosenthal C, Schmücker U, Bieschke J, Dührsen U, Kretzschmar HA, 2000. Differential constitutive and activation-dependent expression of prion protein in human peripheral blood leucocytes. *Br J Haematol* 108: 488-495.
- Graner E, Mercadante AF, Zanata SM, Forlenza OV, Cabral AL, Veiga SS, Juliano MA, Roesler R, Walz R, Minetti A, Izquierdo I, Martins VR, Brentani RR, 2000. Cellular prion protein binds laminin and mediates neuritogenesis. *Brain Res Mol Brain Res* 76: 85-92.
- Groschup MH, Langeveld J, Pfaff E, 1994. The major species specific epitope in prion proteins of ruminants. *Arch Virol* 136: 423-431.
- Groschup MH, Harmeyer S, Pfaff E, 1997. Antigenic features of prion proteins of sheep and of other mammalian species. *J Immunol Methods* 207: 89-101.
- Herrmann LM, Davis WC, Knowles DP, Wardrop KJ, Sy MS, Gambetti P, O'Rourke KI, 2001. Cellular prion protein is expressed on peripheral blood mononuclear cells but not platelets of normal and scrapie-infected sheep. *Haematologica* 86: 146-153.

5. Estudio de la expresión de PrP^C en leucocitos y plaquetas

- Hill AF, Butterworth RJ, Joiner S, Jackson G, Rossor MN, Thomas DJ, Frosh A, Tolley N, Bell JE, Spencer M, King A, Al_Sarraj S, Ironside JW, Lantos PL, Collinge J, 1999. Investigation of variant Creutzfeldt-Jakob disease and other human prion diseases with tonsil biopsy samples. *Lancet* 353: 183-189.
- Hilton DA, Fathers E, Edwards P, Ironside JW, Zajicek J, 1998. Prion immunoreactivity in appendix before clinical onset of variant Creutzfeldt-Jakob disease. *Lancet* 352: 703-704.
- Holada K, Vostal JG, 2000. Different levels of prion protein (PrP^C) expression on hamster, mouse and human blood cells. *Br J Haematol* 110: 472-480.
- Huang FP, Farquhar CF, Mabbott NA, Bruce ME, MacPherson GG, 2002. Migrating intestinal dendritic cells transport PrP(Sc) from the gut. *J Gen Virol* 83: 267-271.
- Klein MA, Frigg R, Flechsig E, Raeber AJ, Kalinke U, Bluethmann H, Bootz F, Suter M, Zinkernagel RM, Aguzzi A, 1997. A crucial role for B cells in neuroinvasive scrapie. *Nature* 390: 687-690.
- Klein MA, Frigg R, Raeber AJ, Flechsig E, Hegyi I, Zinkernagel RM, Weissmann C, Aguzzi A, 1998. PrP expression in B lymphocytes is not required for prion neuroinvasion. *Nat Med* 4: 1429-1433.
- Kubosaki A, Yusa S, Nasu Y, Nishimura T, Nakamura Y, Saeki K, Matsumoto Y, Itohara S, Onodera T, 2001. Distribution of cellular isoform of prion protein in T lymphocytes and bone marrow, analyzed by wild-type and prion protein gene-deficient mice. *Biochem Biophys Res Commun* 282: 103-107.
- Martin T, Hughes S, Hughes K, Dawson M, 1995. Direct sequencing of PCR amplified pig PrP genes. *Biochim Biophys Acta* 1270: 211-214.
- Politopoulou G, Seebach JD, Schmugge M, Schwarz HP, Aguzzi A, 2000. Age-related expression of the cellular prion protein in human peripheral blood leukocytes. *Haematologica* 85: 580-587.
- Prusiner SB, 1991. Molecular biology of prion diseases. *Science* 252: 1515-1522.
- Prusiner SB, 1997. Prion diseases and the BSE crisis. *Science* 278: 245-251.
- Ryder SJ, Hawkins SA, Dawson M, Wells GA, 2000. The neuropathology of experimental bovine spongiform encephalopathy in the pig. *J Comp Pathol* 122: 131-143.
- Sakaguchi S, Katamine S, Nishida N, Moriuchi R, Shigematsu K, Sugimoto T, Nakatani A, Kataoka Y, Houtani T, Shirabe S, Okada H, Hasegawa S, Miyamoto T, Noda T, 1996. Loss of cerebellar Purkinje cells in aged mice homozygous for a disrupted PrP gene. *Nature* 380: 528-531.
- Satoh J, Kuroda Y, Katamine S, 2000. Gene expression profile in prion protein-deficient fibroblasts in culture. *Am J Pathol* 157: 59-68.
- Tobler I, Gaus SE, Deboer T, Achermann P, Fischer M, Rulicke T, Moser M, Oesch B, McBride PA, Manson JC, 1996. Altered circadian activity rhythms and sleep in mice devoid of prion protein. *Nature* 380: 639-642.
- Westaway D, Prusiner SB, 1986. Conservation of the cellular gene encoding the scrapie prion protein. *Nucleic Acids Res* 14: 2035-2044.
- Zanusso G, Liu D, Ferrari S, Hegyi I, Yin X, Aguzzi A, Hornemann S, Liemann S, Glockshuber R, Manson JC, Brown P, Petersen RB, Gambetti P, Sy MS, 1998. Prion protein expression in different species: analysis with a panel of new mAbs. *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 8812-8816.

CONCLUSIONES

1. En esta tesis se han caracterizado 7 anticuerpos monoclonales frente a distintas moléculas de diferenciación porcinas, se han estudiado otros 9 y se ha abordado por primera vez el estudio de la expresión de PrP^C (CD230) en la especie porcina.

2. El anticuerpo monoclonal GP2D8 reconoce es específico e inmunoprecipita el homólogo porcino de CD5. Mediante ensayos de bloqueo se determinó que reconocía el epítipo CD5a, único descrito en la especie porcina hasta la fecha. El anticuerpo GP2D8 podría ser una herramienta útil en estudios relacionados con la Sanidad animal y la fisiología de los linfocitos porcinos.

3. Los anticuerpos monoclonales GP2B7 y GP3D10 reconocen específicamente e inmunoprecipitan las cadenas α y β de LFA-1 porcino (CD11a/CD18), respectivamente. El segundo de ellos presenta reacción cruzada con CD18 humano. El epítipo reconocido por el anticuerpo GP2B7 es diferente al reconocido por los anticuerpos monoclonales frente a CD11a porcino BL1H8 y BL2F1.

4. El anticuerpo GP4B4 reconoce específicamente e inmunoprecipita la integrina β_1 porcina (CD29) y presenta reacción cruzada con las moléculas homólogas de las especies ovina, caprina y bovina.

5. Mediante inmunización con una proteína de recombinante, CD29R, cuya secuencia es homóloga a la de una región extracitoplasmática de la integrina β_1 humana que contiene el dominio de unión al ligando, se obtuvieron tres anticuerpos monoclonales, GP1A5, GP1A6 y GP4A1, que reconocen un epítipo no conformacional de la integrina β_1 porcina. Los dos primeros reaccionan con los precursores intracitoplasmáticos de CD29 en citometría de flujo intracelular sobre PBMC y también se pueden utilizar en técnicas inmunohistoquímicas.

6. Dada la importancia de los procesos fisiológicos en que intervienen las distintas integrinas reconocidas por los anticuerpos monoclonales GP2B7, GP3D10, GP4B4, GP1A5, GP1A6 y GP4A1, se discuten las posibles aplicaciones que podrían tener en diversos estudios relacionados con el xenotrasplante, la Sanidad Animal y la fisiología de los leucocitos porcinos.

7. El anticuerpo monoclonal GP3F1 reconoce linfocitos B y una subpoblación de linfocitos T que posiblemente se corresponda con las células $\gamma\delta$. Los anticuerpos GP2D7 y GP4F8 reconocen un antígeno complejo de membrana presente en plaquetas, posiblemente relacionado con el complejo CD42.

8. En este trabajo se describe por primera vez la reacción de 8H4, un anticuerpo monoclonal frente a PrP^C murino, con PrP^C (CD230) porcino. También se aborda por primera vez el estudio de la expresión en leucocitos y plaquetas de la especie porcina de PrP^C, señalando sus peculiaridades con respecto al patrón de expresión en otras especies animales, y se discuten las posibles aplicaciones prácticas del anticuerpo 8H4 en estudios sobre encefalopatías espongiiformes humanas en que se empleara al cerdo como modelo animal.

APÉNDICES

A. Tampones y soluciones

A.1 Uso general

PBS/PBST (tampón fosfato salino/ tampón fosfato salino-tween): 8,1 mM NaHPO₄, 1,5 mM KH₂PO₄, 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, pH 7,4/ Tween-20 0,1% (Panreac).

Solución eosina: 0,25% eosina (Panreac), 0,02% NaN₃ en PBS.

Tampón de lisis de eritrocitos: Na₂HPO₄/NaH₂PO₄ 5 mM, EDTA 2 mM, PMSF 1mM, NaN₃ 0,05%, pH 7,4.

Solución de ficoll-amidotriazoato: 8% ficoll 400 (Pharmacia Biotech) en agua destilada. Añadir amidotriazoato sódico y meglumina al 76% (Schering) hasta alcanzar una densidad de 1,080 g/ cm³.

Tampón fosfato: 2 mM NaH₂PO₄, 8 mM Na₂PO₄, pH 7,4.

Tampón de lisis celular: 10mM Tris-HCl, 150mM NaCl, 1mM EDTA, 1mM PMSF(fluoruro fenilmetilsulfónico) (Merck), 0,05% NP-40 (Sigma), pH 7,4.

A.2 Inmunoensayos y citometría de flujo

Solución reveladora de ELISA: 0,5M ácido cítrico pH 4 (Panreac), 1/100 (v/v) 2% ABTS (ácido 2,2' azino-bis (3-etilbezo-tiazolín-6-sulfónico)) (Roche), 0,03% H₂O₂.

Solución de bloqueo: Leche desnatada en polvo 5% en PBS o BSA (Roche) 2% en PBS.

Tampón fosfatasa alcalina: 100 mM NaCl, 5mM MgCl₂, 100 mM Tris, pH 9,5.

Solución BCIP: 5% de BCIP (Roche) en dimetilformamida al 70%.

Solución NBT: 5% de NBT (Sigma) en dimetilformamida al 70%.

Solución fijadora para citometría de flujo: 1% de paraformaldehído en FacsFlow[®] (Becton Dickinson).

Líquido de Bouin: 78,8% solución de ácido pícrico acuoso saturado, 26% formaldehído 40% y 5,25% ácido acético glacial.

Solución Tris: Tris 0,05M, pH 7,6.

A.3 Electroforesis y electrotransferencia

Solución 1: 29,2% de acrilamida y 0,8% de bis-acrilamida en agua destilada.

Solución 2: 1,5 M Tris-HCl en agua destilada, pH 8,8.

Solución 3: 0,5 M Tris-HCl en agua destilada, pH 6,8.

Solución 4: 10% de SDS (sodio dodecil sulfato) en agua destilada.

Solución APS: 10% de APS (persulfato amónico) en agua destilada.

Tampón puente de electroforesis: 0,025 M Tris-HCl, 0,192 M glicina, 0,1% de SDS en agua destilada.

Solución de negro amido: 0,1% de negro amido 10-B, 45% de metanol, 10% de ácido acético en agua destilada.

Tampón de tratamiento de muestras: 0,125 M Tris-HCl, 4% de SDS, 20% de glicerol, (10% de 2-mercaptoetanol), 0,1% de Brilliant Blue en agua destilada, pH 6,8.

Tampón de transferencia: 25 mM Tris, 192 mM glicina, 20% de metanol en agua destilada.

A.4 Tinción y decoloración de geles de poliacrilamida

Solución de tinción: 0,125% de Azul de Coomasie R-250, 50% de metanol, 10% de ácido acético en agua destilada.

Solución de decoloración: 50% de metanol, 10% de ácido acético en agua destilada.

A.5 Obtención de proteína recombinante

Medio LB (Lennox L Broth Base): 2% LB (Sigma) en agua destilada, esterilizar en el autoclave.

Tampón de lisis: 8 M urea, 0,1M NaH₂PO₄, 0,01M Tris en agua destilada, pH 8.

Tampones de lavado y de elución: composición igual a tampón de lisis, pH 6,3, 5,9 o 4,5.

B. Medios de cultivo

Medio HY: 13,3% Medio HY (Sigma), 3,5% NaHCO₃ en agua destilada, pH 7,3.

Medio HY suplementado: 0,1 mM hipoxantina (Sigma), 0,016 mM timidina (Sigma), 2.500 U/L penicilina, 2,5 mg/l estreptomycin, 10% suero fetal bovino (Sigma) en medio HY.

Medio selectivo HAT (hipoxantina/aminopterina/timidina): 0,1 mM hipoxantina (Seromed), 0,016 mM timidina (Seromed), 0,4 μ M aminopterina (Seromed), en medio HY.

Medio de congelación: 45 ml de suero fetal bovino, previamente inactivado durante una hora a 56°C, 5 ml de dimetil-sulfóxido (DMSO) (Sigma).

C. Procedimientos básicos

C.1 Congelación de células

Las células, que deben encontrarse en cultivo en fase semilogarítmica, se centrifugan a 1.200 rpm durante 5 minutos a temperatura ambiente. Se desecha el sobrenadante y se resuspende el pellet en medio de congelación, que se añade en un volumen suficiente para alcanzar una concentración aproximada de 2×10^6 células/ml. Se deposita 1 ml de esta suspensión por criovial, se cierran y se introducen en una caja de congelación a -70°C toda una noche. Posteriormente se transfieren al tanque de nitrógeno líquido.

C.2 Descongelación de células

Se introduce el criovial que contiene las células a descongelar en un baño a 37°C , agitando suavemente hasta la total descongelación de su contenido. Se resuspenden las células en medio HY y se centrifugan a 1.200 rpm durante 5 minutos a temperatura ambiente. Se desecha el sobrenadante y se resuspenden las células en medio HY suplementado, transfiriéndolas a botella o placa de cultivo.

C.3 Preparación de geles de poliacrilamida de gradiente 15%-5%

Se montan los cristales, previamente limpiados con etanol, con los espaciadores, rellenando los huecos de los bordes inferiores con grasa selladora antes de colocarlos en el porta-geles. La formación del gradiente de concentración se realizó mediante una bomba peristáltica y el formador de gradientes, añadiendo en cada uno de los vasos de éste una de las soluciones del gel de separación. Una vez polimerizado el gel separador (45-50

minutos) se añadió la solución del gel de concentración, colocando inmediatamente el peine para formar los pocillos y dejando polimerizar unos 20 minutos.

Gel separador del 15%: 3,1 ml de agua destilada, 6,4 ml de solución 1, 3,2 ml de solución 2, 130 μ l de solución 4, 80 μ l de solución APS y 8 μ l de TEMED (Sigma).

Gel separador del 5%: 7,3 ml de agua destilada, 2,2 ml de solución 1, 3,2 ml de solución 2, 130 μ l de solución 4, 80 μ l de solución APS y 8 μ l de TEMED (Sigma).

Gel de concentración: 7 ml de agua destilada, 1,5 ml de solución 1, 2,87 ml de solución 3, 120 μ l de solución 4, 100 μ l de APS y 10 μ l de TEMED (Sigma).

C.4 Preparación de geles de poliacrilamida al 10%

El cristal y la placa de alúmina, previamente limpiados con etanol, se montaron con los espaciadores y se colocaron en los porta-geles. Se vertió la solución del gel de separación, se cubrió con agua y se dejó polimerizar (1 hora). Se vació el agua y se vertió la segunda solución, correspondiente al gel separador, se colocó inmediatamente el peine para formar los pocillos y se dejó polimerizar durante media hora.

Gel de separación: 3,33 ml de agua destilada, 4 ml de solución 1, 2,5 ml de solución 2, 100 μ l de solución 4, 50 μ l de solución APS y 5 μ l de TEMED (Sigma).

Gel de concentración: 3 ml de agua destilada, 0,67 ml de solución 1, 1,25 ml de solución 3, 50 μ l de solución 4, 60 μ l de solución APS y 6 μ l de TEMED (Sigma).