

Cartas al editor

Pre-ensayo de suero para la generación y cultivo de hibridomas de ratón

Al editor:

Para los grupos que trabajan en la generación de anticuerpos monoclonales por hibridación de mielomas y linfocitos esplénicos, es de vital importancia el control de la calidad de los lotes de suero empleados en la confección del medio de cultivo. El suero, además de no exhibir citotoxicidad, debe poseer una adecuada capacidad de promoción del crecimiento en condiciones clonales y de alta densidad para los mielomas e hibridomas, y no es infrecuente que los investigadores confronten algunos problemas con lotes nuevos de suero durante las fusiones, o luego de tener establecidos algunos hibridomas de interés.

En nuestro Departamento hemos venido desarrollando un sistema sencillo y sensible para la valoración del suero bovino -fetal, sin calostro o donante-, empleado en las fusiones o el cultivo masivo de hibridomas de ratón. Este sistema se basa en el establecimiento de condiciones clonales de crecimiento para un hibridoma conocido (o en su defecto para el mieloma parental), la adición de células esplénicas de ratón como "capa alimentadora", y el ensayo de diferentes concentraciones de los sueros a probar con respecto a: a) la posible citotoxicidad para las células esplénicas, y b) la capacidad de promover el crecimiento clonal del hibridoma o mieloma. El empleo de placas de microtitulaje hace mínimo el gasto y aumenta el número posible de sueros a ensayar por prueba.

Es nuestra intención proponer a la Revista el procedimiento empleado en nuestro trabajo, con vista a su difusión y evaluación por los grupos de investigación correspondientes.

El esquema general de trabajo es el siguiente:

MATERIALES

1. Placas de microtitulaje de 96 pozos (Costar, Linbro, Sterilin, Falcon, NUNC, etcétera).
2. Medio RPMI 1640 suplementado (18 mM de Hepes, 26 mM de CO_3HNa , 2 mM de L-glutamina, 1 mM de piruvato de sodio, $5 \cdot 10^{-5}$ M de 2-mercapto etanol).
3. Suero bovino inactivado por calor (56°C , 30 minutos)
4. Hibridoma de ratón, o mieloma parental para fusión, en crecimiento exponencial.
5. Ratones BALB/c, preferiblemente.
6. Condiciones y materiales habituales empleados en la técnica del cultivo celular

PROCEDIMIENTO

1. Sacrifique el ratón y extraiga las células esplénicas, tal como se ha recomendado para la hibridación con mielomas (Köhler, 1981).
2. Prepare una suspensión de aproximadamente 10^6 células por ml en medio RPMI 1640 suplementado, y en cantidad suficiente para el número de combinaciones que se emplearán en la placa. Considere que cada muestra deberá ensayarse por duplicado o triplicado, y deben incluirse controles positivos y negativos.
3. Deposite 100 μ l (aproximadamente 10^5 células) de esta suspensión en cada pozo. Guarde la placa en atmósfera de 5% CO_2 -95% de aire, mientras procede con otras manipulaciones.
4. Procese el cultivo exponencial del hibridoma o mieloma de manera similar a la recomendada para la fusión con células esplénicas (Köhler, 1981).
5. Prepare una suspensión de aproximadamente 10^2 células por ml, en medio RPMI 1640 suplementado y en cantidad suficiente.
6. Deposite 50 μ l (aproximadamente unas 5 células) de esta suspensión en cada pozo de la placa anteriormente referida.
7. Añada por pozo (duplicado o triplicado), 10 μ l (5%), 20 μ l (10%), 30 μ l (15%), o 40 μ l (20%) de cada muestra de suero. El control negativo no lleva muestra alguna y el positivo 10% de suero de calidad preensayada.
8. Complete los pozos con RPMI 1640 suplementado hasta 200 μ l totales.
9. Examine algunos pozos al microscopio invertido, identifique en cada uno no menos de 3 células de hibridoma o mieloma, y guarde la placa a 37°C y en atmósfera de 5% CO_2 -95% de aire.
10. A las 48 horas evalúe en un microscopio invertido: a) presencia de división celular en las células del hibridoma o mieloma; b) algún efecto citotóxico sobre estas, o en las células esplénicas; c) eventual contaminación con microorganismos.
11. A los 7 días clasifique en un microscopio invertido sus muestras de suero sobre la base del número promedio y tamaño de las colonias de hibridoma o mieloma. Seleccione el lote y las concentraciones de trabajo.

OBSERVACIONES GENERALES

1. Pueden emplearse otros medios base utilizados de rutina para el trabajo con hibridomas en el laboratorio en cuestión.
2. La prueba puede realizarse en presencia de antibióticos, a menos que al mismo tiempo se desee evaluar una posible contaminación del suero.
3. El suero no necesariamente tiene que inactivarse.
4. Las placas de microtitulaje pueden ser reutilizadas (degradación de residuos orgánicos con mezclas químicas y calor, fregado especial, esterilización con ^{60}Co o UV). En este caso es conveniente aumentar el número de pozos por muestra a 4 ó 6.
5. Es conveniente que el rango de células de hibridoma o mieloma por pozo esté entre 3 y 15, y en último caso 20. Por encima de este número es difícil evaluar el total de colonias. Por debajo de 3 se incrementa el error.
6. Se recomiendan las cuatro concentraciones de suero para tener una apreciación amplia del funcionamiento de este en esta tecnología y para otros usos colaterales. Si se desea, la

prueba puede limitarse solo a 1 ó 2 concentraciones (sin excluir 10%).

7. Es conveniente fabricar muestras de suero con combinaciones 1:1 de diferentes lotes. Ello es particularmente útil cuando se va a pasar un hibridoma a crecer de un lote a otro; en este caso se recomienda mezclar ambos sueros 1:1 durante los primeros 2-3 días de cultivo, luego 0.5:1,5 para finalmente hacer el cambio.

REFERENCIA

- Köhler, G. (1981): *The technique of hybridoma production. Immunological Methods*, Vol. II, Eds. I. Lefkovits, B. Pernis. Academic Press, New York, pp. 285-298.

Jorge V. Gavilondo Cowley
Departamento de Biología,
Instituto Nacional de Oncología y Radiobiología,
29 y E, Vedado, La Habana 4, Cuba

* * *

Síntesis química de un antígeno para el diagnóstico de la lepra

Al editor:

La lepra es una enfermedad endémica en los países en vías de desarrollo. En el mundo existen más de 15 millones de enfermos; en Cuba la padecen 5 587 personas. Actualmente el problema fundamental consiste en poder diagnosticar la enfermedad lo antes posible pues desde el momento en que ocurre el contagio hasta que aparecen los síntomas, pueden pasar varios años.

El diagnóstico mediante el inmunoensayo confrontó la dificultad de la existencia de numerosos antígenos comunes a todas las micobacterias. En 1982 fue descubierto (Hunter y col., 1982) un glicolípido fenólico específico del *Mycobacterium leprae*, dos años más tarde fue sintetizado químicamente el determinante antigénico en busca de una sustancia más hidrosoluble para emplearla en el test. Con el derivado obtenido por síntesis química se evitó la necesidad de cultivar los gérmenes en el armadillo, animal en el que se logra su multiplicación.

La síntesis inicial del antígeno (Fujiwara y col., 1984; Gigg y col., 1984), tenía como dificultades fundamentales la complejidad del trabajo y, además, que el antígeno final estaba acoplado a BSA a través de una aminación reductiva con cianoborohidruro de sodio, lo que destruye una parte del determinante antigénico. Con el objetivo de evitar esas dos dificultades, nos propusimos diseñar un esquema de síntesis nuevo, más sencillo, que llevara al alil glicosido del determinante antigénico. Paralelamente a la terminación de nuestro trabajo, han aparecido otros métodos de síntesis del antígeno (Fujiwara y col., 1985; Chatterjee y col., 1985; Gigg y col., 1985).