

Inmunización primaria *in vitro* para la obtención de anticuerpos monoclonales de ratón contra antígenos solubles

JORGE GAVILONDO-COWLEY

Laboratorio de Hibridomas, División de Vacunas y Medios de Diagnóstico, Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología, Apartado 6162, La Habana-6, Cuba

La posibilidad de obtención de hibridomas secretores de anticuerpos monoclonales (AcM) específicos, a partir de linfocitos B estimulados *in vivo*, puede verse limitada experimentalmente a causa de: *a)* tolerancia o pobre respuesta para el antígeno particular, *b)* respuesta selectiva a uno o a unos pocos de los componentes de la preparación inmunogénica, *c)* insuficiente cantidad de antígeno para realizar inmunizaciones que lleven a altos títulos de anticuerpos y, por ende, a un adecuado contenido de linfocitos específicos en el bazo, y *d)* dificultad para realizar una inmunización controlada, especialmente cuando se trata de obtener AcM humanos. Todo ello ha llevado al desarrollo progresivo de técnicas para la inmunización primaria o secundaria *in vitro*, que pueden contribuir a la solución de algunos de estos problemas (Borrebaeck, 1986; Boss, 1986; Hoffmann y Hirst, 1985; Jonak y Kennett, 1984; Lagacé y Brodeur, 1985; Luben y Mohler, 1980; Ness *et al.*, 1984; Reading, 1982, 1986; Schelling, 1986; Takahashi *et al.*, 1987; Wasserman *et al.*, 1986; Yamaura *et al.*, 1985).

La técnica de inmunización primaria *in vitro* que a continuación describimos, ha sido empleada con éxito por nosotros para la obtención de AcM de ratón contra moléculas recombinantes de muy diferentes características e inmunogenicidad, tales como el interferón humano *gamma* y el factor de crecimiento epidérmico humano (Gavilondo *et al.*, 1987). En ella se emplea el sobrenadante de cultivos mixtos de timocitos de ratón como fuente de las citoquinas necesarias para lograr una respuesta específica y la expansión clonal de las células B. Otras variantes pueden ser consultadas por los interesados en las publicaciones ya mencionadas.

Medio condicionado por timocitos de ratón (TCM)

1. Sacrifique por dislocación cervical y uno a uno, igual número de ratones de las líneas BALB/c y C57B1/6, preferiblemente hembras y de 6-8 semanas*.
2. Sumerja el animal en etanol al 70 por 100 y páselo al área de trabajo estéril. Proceda a extraer el timo con ayuda de tres juegos de tijeras y pinzas estériles, tal como sigue:

* En animales de mayor edad, principalmente de la línea BALB/c, se produce una rápida atrofia del timo y, consecuentemente, no es posible recuperar un adecuado número de células.

- fije las extremidades del animal mediante agujas, con el lomo del ratón hacia la tabla de disección;
 - limpie con un algodón empapado en alcohol al 70 por 100 el cuello, el tórax y el abdomen;
 - con el primer juego de instrumentos tome la piel del tórax, haga un ligero corte superficial a nivel de la base del esternón y decole para cortar hasta las dos regiones axilares un amplio *flap* que exponga la caja torácica;
 - lave el campo con etanol al 70 por 100 y con el segundo juego de instrumentos, corte los músculos y las costillas desde la base del esternón, de forma similar a la ya descrita, y deposite el *flap* sobre la cabeza del animal; luego de esta maniobra, el timo aparece como un órgano bilobulado blanquecino en la zona superior anterior del corazón;
 - mediante el tercer juego de instrumentos, proceda a liberar la glándula, preferiblemente mediante tijeras curvas, y cuidando de no perforar la tráquea subyacente;
 - sumerja la glándula recién extraída en un tubo de centrífuga de 50 ml, conteniendo 25 ml de "medio de lavado" (ML; este puede ser cualquier medio de cultivo con antibióticos; en nuestro caso empleamos medio RPMI 1640, con 1 g/l de NaHCO₃, 3 g/l de HEPES y 80 microgramos/ml de gentamicina);
 - proceda con el siguiente animal.
3. Con unos fórceps estériles coloque los timos sobre una malla metálica de 60 mesh y libere las células hacia una placa de petri que contenga ML, mediante presión con el émbolo de una jeringuilla plástica y goteo ocasional de ML sobre los residuos de cápsula y grasa. Transfiera la suspensión celular a un nuevo tubo de centrífuga de 50 ml.
 4. Pipetee repetidamente esta suspensión (6-7 veces) hasta disociar los grumos celulares, complete con ML hasta 50 ml y centrifugue 10 minutos a temperatura ambiente y 1 100 rpm en una centrífuga de mesa.
 5. Deseche el sobrenadante y resuspenda el "pellet" con 25 ml de ML. Diluya convenientemente (10 veces) una alícuota de esta suspensión con Trypan Azul y estime el número total de células en una cámara contadora común, empleando aumento 40x.
 6. Complete hasta 50 ml con ML y centrifugue como fue recomendado antes. Resuspenda el "pellet" en suficiente medio de cultivo (MC; medio RPMI 1640, suplementado con 1 g/l de NaHCO₃, 3 g/l de HEPES, 2 mM de L-glutamina, 1 mM de piruvato de sodio, 0,05 mM de 2-mercaptoetanol, 8-10 por 100 de suero bovino* y 40 microgramos/ml de gentamicina) como para lograr una suspensión de cuatro millones de timocitos por ml de MC. Divida alícuotas de 50 ml de esta suspensión en frascos de 75 cm², e incube horizontalmente a 37°C y 5 por 100 de CO₂).
 7. Luego de 48 horas, coseche el medio y elimine las células y desechos mediante centrifugación a 500 g por 10 minutos. Filtre el TCM por 0,2 micras y conserve en alícuotas de 15 ml a -70°C**.

* El suero bovino debe ser preseleccionado para una adecuada estimulación en la fase de generación de los hibridomas y su cultivo posterior (Gavilondo, 1987).

** El TCM conservado de esta forma es estable por meses.

Inmunización primaria *in vitro*

1. Sacrifique por dislocación cervical, uno a uno, cuatro ratones BALB/c, no inmunizados, preferiblemente hembras.
2. Sumerja el animal en etanol al 70 por 100 y páselo al área de trabajo estéril. Proceda a extraer el bazo con ayuda de tres juegos de tijeras y pinzas estériles, tal como sigue:
 - fije las extremidades del animal mediante agujas, con el abdomen del ratón hacia la tabla de disección y ligeramente recostado sobre el lado derecho;
 - limpie con un algodón empapado en alcohol al 70 por 100 todo el lado izquierdo del animal;
 - con el primer juego de instrumentos tome la piel, aproximadamente a un centímetro de la zona subcostal y haga una incisión superficial perpendicular al eje del animal. Decole hasta visualizar el bazo a través de la pared muscular y peritoneal;
 - lave el campo con etanol al 70 por 100 y empleando otro juego de instrumentos, corte la pared para exponer el bazo, que aparece como un órgano elongado y rojo oscuro, sobre el estómago;
 - con el tercer juego de instrumentos, libere el bazo, cuidando no perforar el estómago;
 - sumerja el bazo recién extraído en un tubo de centrifuga de 50 ml, conteniendo 25 ml de ML;
 - proceda con el siguiente animal.
3. Con unos fórceps estériles, coloque los bazos sobre una malla metálica de 60 mesh y libere las células de manera semejante a la descrita para los timocitos. Transfiera la suspensión celular a un nuevo tubo de centrifuga de 50 ml.
4. Pipetee repetidamente esta suspensión (6-7 veces) hasta disociar los grumos celulares; complete con ML hasta 50 ml y centrifugue 10 minutos a temperatura ambiente y 1 100 rpm en una centrifuga de mesa.
5. Deseche el sobrenadante y resuspenda el "pellet" con 25 ml de ML. Diluya convenientemente (10 veces) una alícuota de esta suspensión con Trypan Azul y estime el número total de células en una cámara contadora común, empleando aumento 40x.
6. Complete hasta 50 ml con ML y centrifugue como fue recomendado antes. Resuspenda el "pellet" en suficiente medio de inmunización (MI; 50 por 100 de MC, 50 por 100 de TCM, y 1-30 $\mu\text{g}/\text{ml}$ del antígeno en cuestión*, prefiltrado por 0,2 μm) hasta lograr una suspensión de 10 millones de células esplénicas por ml de MI. Divida alícuotas de 15 ml de esta suspensión en frascos de 25 cm^2 , e incube horizontalmente a 37°C y 5 por 100 de CO_2 .
7. A partir del tercer día es posible observar un cambio en la coloración del medio, producto del metabolismo celular. Al quinto día, la inspección en el microscopio invertido revela abundantes células adherentes, de apariencia macrofágica, a las cuales están "anclados" grupos de elementos de morfología linfoblastoide, con diámetros unas dos veces superiores

* Se han realizado inmunizaciones exitosas con concentraciones de antígeno inferiores a 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$, pero en estos niveles y por debajo de ellos se observa habitualmente una caída en la eficiencia de formación de hibridomas y en la proporción de estos que muestran especificidad. Al comenzar el trabajo con un antígeno soluble es conveniente hacer un experimento en el cual se empleen diferentes dosis de inmunización por frasco de 25 cm^2 , fijando cinco días de incubación. Una gran proporción de los hibridomas específicos generados por estos procedimientos de inmunización primaria secretan anticuerpos del tipo IgM; ello hace que en el tamizaje de los cultivos sea conveniente emplear antisueros polivalentes.

al de un linfocito. Otras células linfoblastoides aparecen en forma de "racimos" flotantes. También pueden observarse en el sobrenadante grandes células aisladas.

8. Disloque los blastos mediante pipeteo suave sobre la superficie de cultivo, o mediante un golpe seco de la palma de la mano en uno de los costados del frasco. Las células adherentes que permanecen en el frasco se desechan y las cosechadas en el sobrenadante están listas para la fusión*.

Fusión

A pesar de que los procedimientos de hibridación por fusión son extraordinariamente variados, y cada investigador los adapta a sus condiciones particulares, exponemos a continuación los métodos empleados por nosotros en los experimentos referidos al comienzo de este escrito.

1. Coloque los blastos en tubos de centrifuga de 50 ml y complete con ML. Coseche como habitual la línea celular "pareja de fusión" de su elección (en nuestro caso empleamos indistintamente el mieloma P3/x63.Ag8.653 o el hibridoma Sp2/0-Ag14). Centrifugue como fue recomendado anteriormente.
2. Deseche el sobrenadante y resuspenda los "pellet" con ML. Diluya convenientemente alícuotas de estas suspensiones con Trypan Azul y estime el número total de células en una cámara contadora común, empleando aumento 40x. Mezcle en un mismo tubo los linfocitos y la pareja de fusión en proporciones de 10:1 ó 5:1.
3. Centrifugue como se recomendó antes; deseche todo el sobrenadante, disloque el "pellet" con golpes suaves contra la superficie de trabajo del flujo laminar y añada 0,3-0,5 ml de solución de Polietilenglicol, precalentada a 37°C, gota a gota, durante un minuto (nosotros empleamos PEG 1450 al 42 por 100, en Dulbecco's Modified Eagle Medium, y con pH ligeramente alcalino).
4. Resuspenda las células inmediatamente con 5 ml de ML precalentado, gota a gota, y durante tres minutos. Añada 5 ml más de ML, deje reposar por cinco minutos a temperatura ambiente y centrifugue como fue mencionado antes. Durante los pasos 3 y 4, es importante mantener la suspensión celular en agitación constante mediante la mano, o preferiblemente con un mezclador tipo *vortex*, a muy baja velocidad de rotación.
5. Resuspenda el "pellet" en "medio selectivo" (MS: MC, suplementado con 0,03 mM de hipoxantina, 3 μ M de timidina y 0,4 μ M de aminopterina), hasta llegar a una concentración de un millón de células fundidas/ml de MS. Siembre 100 microlitros, o un ml de esta suspensión, en cada pozo de placas de 96 o 24 excavaciones, respectivamente. A causa de que las células adherentes originales permanecieron en el frasco de inmunización, es un requerimiento imprescindible la adición de "células alimentadoras" o medios condicionados a estos cultivos.

* En virtud de que se recupera habitualmente del 20 al 25 por 100 del número original de células esplénicas sometidas a la inmunización, partiendo de cuatro ratones, es posible obtener unos 80 millones de linfocitos.

REFERENCIAS

- BOSS, B. D. (1986). *An improved In Vitro Immunization Procedure for the Production of Monoclonal Antibodies*. Meth. in Enzymology **121**: 27-33.
- GAVILONDO, J. (1987). *Preensayo de suero para la generación y cultivo de hibridomas de ratón*. Interferón y Biotecnología **4**: 63-65.
- GAVILONDO, J. *et al.* (1987). *In Vitro Primary Immunization for the Obtention of Mouse Monoclonal Antibodies Against Human Recombinant Gamma Interferon and Epidermal Growth Factor*. En: Proc. Int. Symp. on In Vitro Immunization in Hybridoma Technology, Tylosand, Suecia. Septiembre 7-8, 1987 (en prensa).
- HOFFMANN, M. K. y J. A. HIRST (1985). *Principles On In Vitro Immunization of Human B Lymphocytes*. En: Human Hybridomas and Monoclonal Antibodies. Plenum Press, pp. 277-289.
- JONAK, Z. L. y R. H. KENNETT (1984). *In Vitro Immunization of Mouse Spleen Cells*. En: *Monoclonal Antibodies and Functional Cell Lines*. Plenum Press, pp. 368-370.
- LAGACE, J. y B. R. BRODEUR (1985). *Parameters Affecting In Vitro Immunization of Human Lymphocytes*. J. Immunol. Meth **85**: 127-136.
- LUBEN, R. A. y M. A. MOHLER (1980). *In Vitro Immunization as an Adjunct to the Production of Hybridomas Producing Antibodies Against the Lymphokine Osteoclast Activating Factor*. Molec. Immunol. **17**: 635-639.
- NESS, J. V. *et al.* (1984). *Immunization In Vitro and Production of Monoclonal Antibodies Specific to Insoluble and Weakly Immunogenic Proteins*. PNAS **81**: 7897-7901.
- READING, C. L. (1982). *Theory and Methods for Immunization in Culture and Monoclonal Antibody Production*. J. Immunol. Meth. **53**: 261-291.
- READING, C. L. (1986). *In Vitro Immunization for the Production of Antigen-Specific Lymphocyte Hybridomas*. Meth. in Enzymology **121**: 18-27.
- SCELLING, M. (1986). *Increase of Hybridoma Formation by Addition of Dextran Sulphate to In Vitro Immunization System*. Hybridoma **5**: 159-161.
- TAKAHASHI, M. *et al.* (1987). *Production of IgG-producing Hybridomas by In Vitro Stimulation of Murine Spleen Cells*. J. Immunol. Meth. **96**: 247-253.
- WASSERMAN, R. L. *et al.* (1986). *In Vitro Stimulation Prior to Fusion Generates Antigen-Binding Human-Human Hybridomas*. J. Immunol. Meth **93**: 275-283.