

Artículos originales cortos

Inmunización primaria *in vitro* de linfocitos de ratón para la obtención de hibridomas B

E. FERRA¹, I. LÓPEZ¹, C. DUARTE¹, C. SANTIZO², N. BARANOSKY², J. GAVILONDO-COWLEY² y N. ARTEAGA¹

¹ Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología de Camagüey. Circunvalación y Avenida Finlay, Camagüey, Cuba

² Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología, Apartado 6162, Ciudad de La Habana, Cuba

Recibido en junio de 1988

RESUMEN

Las células esplénicas de ratones BALB/c se sometieron a un proceso de inmunización primaria en cultivo, empleando como antígeno el factor de crecimiento epidérmico humano recombinante, y el sobrenadante de cultivos mixtos de timocitos de ratón como fuente estimuladora de activación y progresión. En algunos experimentos se evaluó el efecto del sobrenadante de células endoteliales humanas (HECS) durante el período de inmunización. Las células inmunizadas se hibridaron con el mieloma P3/x63-Ag8-653 para obtener hibridomas.

Por microscopía electrónica de transmisión se siguieron los cambios morfológicos de los linfocitos durante los cinco días de inmunización *in vitro*, siendo estos característicos de la transformación de células quiescentes en altamente secretoras.

Se demostró que la secreción de anticuerpo específico durante el período de inmunización no podía ser evaluada mediante un sistema ELISA con el antígeno, a causa de la gran reactividad cruzada inespecífica de IgM policlonales.

El HECS estimuló, tanto la frecuencia de hibridación como la formación de hibridomas específicos. Se incluyó una batería de antígenos no relacionados durante el ensayo de los sobrenadantes de los hibridomas, con vistas a descartar las células secretoras de IgM de amplia reactividad cruzada. Todos los hibridomas específicos producían anticuerpos del tipo IgM.

SUMMARY

BALB/c mouse splenic cells were submitted to primary immunization in culture, using recombinant human epidermal growth factor as antigen, and the supernatant of a mouse thymocyte culture as source for polyclonal activation and progression factors. In some experiments, the presence of human endothelial cell supernatant (HECS) during the immunization period was evaluated. The immunized cells were subjected to fusion with the P3/x63-Ag8-653 myeloma for the obtention of hybridomas.

The morphological changes that occur on lymphocytes during the five-day *in vitro* immunization were followed by transmission electron microscopy, being characteristic of the transformation of quiescent to secretor cells. The production of specific antibodies during the immunization period could not be monitored with an ELISA with the antigen, due to the unspecific reactivity of polyclonal "sticky" IgM.

It was seen that HECS stimulated both hybridization efficiency and specific hybridoma formation. A battery of unrelated antigens was always employed for the screening of hybridoma supernatants so as to rule out cells secreting unspecific cross reacting IgM. All specific hybridomas secreted IgM antibodies.

INTRODUCCION

En los últimos años se han desarrollado aceleradamente procedimientos de inmunización primaria y secundaria *in vitro*; estas técnicas son de especial importancia para la obtención de anticuerpos monoclonales (AcM) murinos, cuando la naturaleza del inmunógeno es tal (autoantígenos, sustancias inductoras de tolerancia o supresión), que se presentan dificultades para lograr una respuesta inmunológica efectiva *in vivo*, y para la generación de hibridomas B humanos, caso en el cual la inmunización *in vivo* no siempre puede ser controlada o efectuada, por razones éticas (Borrebaeck, 1986, 1988; Boss, 1986; Hoffman y Hirst, 1985; Jonak y Kennett, 1984; Lagacé y Brodeur, Schelling, 1986; Takahashi *et al.*, 1987; Wasserman *et al.*, 1986; Yamaura *et al.*, 1985).

En un artículo anterior (Gavilondo *et al.* 1988), nosotros empleamos la inmunización primaria *in vitro* para la obtención de anticuerpos monoclonales de ratón contra el interferón humano recombinante tipo γ y el factor de crecimiento epidérmico humano recombinante (rh-EGF). Demostramos que este procedimiento permitía obtener una mayor proporción de hibridomas específicos a partir de un número inicial similar de células esplénicas, cuando se comparaba con experimentos simultáneos realizados *in vivo*.

Tanto la frecuencia de aparición de híbridos, como la detección de hibridomas secretores de anticuerpos específicos, después de la fusión, eran dependientes de la dosis de antígeno, y todos los hibridomas estables obtenidos secretaban anticuerpos del tipo IgM, indicando que en nuestras condiciones de cultivo, o no producía un *switch* de clase, o no lográbamos "rescatar" mediante fusión los linfocitos B secretores de IgG.

En el presente trabajo valoramos la posible influencia del sobrenadante de células endoteliales humanas (HECS, Astaldi *et al.*, 1980) sobre la frecuencia de hibridización y la eficiencia de obtención de hibridomas específicos. También reportamos los cambios morfológicos detectables en células linfoides durante el proceso de inmunización *in vitro*.

MATERIALES Y METODOS

Inmunógeno

El factor de crecimiento epidérmico humano recombinante (rh-EGF) proveniente de levaduras y altamente purificado (95%) mediante HPLC, fue suministrado por la planta piloto del CIGB Habana.

Medio condicionado por timocitos (TCM)

El TCM se preparó tal como ha sido reportado anteriormente (Gavilondo, 1987; Gavilondo *et al.*, 1988) y se almacenó a -80°C hasta su uso. En estas condiciones el producto es estable, al menos seis meses.

Inmunización primaria *in vitro* (IVPI)

El procedimiento para la IVPI con células esplénicas de ratón, aparece detallado en otras publicaciones (Gavilondo, 1987; Gavilondo, *et al.*, 1988); las células esplénicas provenientes de ratones BALB/c vírgenes se sometieron a una incubación de cinco días en una mezcla 1:1 de medio RPMI 1640 suplementado con 10% de suero bovino (sin calostro, Cubavet) y TCM, conteniendo 0,2 - 5,0 microgramos del antígeno por mililitro. En algunos experimentos, a esta mezcla se le añadió 3% de sobrenadante de células endoteliales humanas (HECS, Astaldi *et al.*, 1980), suministrado por el Centro de Investigaciones Biológicas de La Habana.

Fusión

Las células esplénicas provenientes de la inmunización *in vivo* y la IVPI se hibridaron en proporción 5:1 con la línea Sp2/0-Ag-14 (Shulman *et al.*, 1978) a temperatura ambiente, mediante fusión con polietilenglicol 1450 (Sigma) al 45%. Los detalles de la técnica aparecen en publicaciones previas (Gavilondo, 1987; Gavilondo, *et al.*, 1988).

Las células se sembraron a razón de 1,0 millón por mililitro en medio selectivo HAT, conteniendo 3% de HECS, a razón de 150 microlitros por cada pozo, en placas de microtitulación (Costar No. 3596).

Luego de 10 días, la aminopterina se retiró progresivamente del medio de cultivo y los sobrenadantes se ensayaron para la presencia de anticuerpos específicos cuando las células cubrieron aproximadamente 2/3 del área de cultivo.

Ensayo inmunoenzimático tipo ELISA

Para el tamizaje de los animales y los sobrenadantes de los cultivos de linfocitos e hibridomas, se empleó un sistema tipo ELISA. Se recubrieron placas de microtitulación de poliestireno (Dynatech) durante 18 horas a 4°C, y en cámara húmeda, con 100 microlitros por pozo de una solución conteniendo cinco microgramos de rhEGF / ml de tampón carbonato-bicarbonato, pH 9,6. Los pozos se bloquearon con 1% de leche descremada en solución salina tamponada con fosfatos, pH 7,2 (SSTF), durante dos horas, a 37°C y se añadieron 100 µl de las muestras a ensayar, por pozo, procediéndose a su incubación durante tres horas, a 37°C.

Después de varios lavados con SSTF-Tween-20 al 0,05%, las placas se incubaron una hora a temperatura ambiente, con 100 microlitros de IgG de carnero anti IgG de ratón (cadena pesada, Sigma), conjugada con peroxidasa, o IgG de carnero anti Igs totales de ratón, conjugada con peroxidasa (Sigma) en SSTF-leche 0,5%. La reacción se reveló con 100 µl de ortofenilendiamina al 0,04% en tampón citrato, pH 5,5, conteniendo 0,04% (v/v) de una solución de peróxido de hidrógeno al 30%. La formación de color se detuvo con ácido sulfúrico 2,5 M y se evaluó a 492 nm en un Multiskan Titertek.

Se empleó como control positivo el AcM CB-EGF.1, obtenido a partir de animales inmunizados *in vivo* en una fusión anterior (Gavilondo *et al.*, 1988) y como negativos diferentes sobrenadantes de hibridomas secretores de AcM con otras especificidades. En algunos experimentos se emplearon otros antígenos en el recubrimiento, utilizando condiciones similares a las ya descritas. Estos fueron: interferon α 2 humano recombinante, interferon γ humano recombinante (ambos suministrados por la planta piloto del CIGB Habana) y seroalbúmina bovina (Sigma).

Se consideraron positivos para anticuerpos específicos los sobrenadantes de los cultivos de hibridomas, que en tres pruebas consecutivas de ELISA (con 48 horas de intervalo) con rh-EGF arrojaron valores de absorbancia tres o más veces por encima de los del control negativo, y que no reaccionaban con los antígenos no relacionados.

Microscopía electrónica de transmisión (MET)

En algunos experimentos se cosecharon células esplénicas sometidas a diferentes tiempos del proceso de IVPI, que se lavaron con SSTF y se fijaron con glutaraldehído. Los "pellets" fueron lavados de nuevo en SSTF, se deshidrataron en etanol, se incluyeron como sugerido por Spurr, contrastándose con tetróxido de osmio empleando el tampón de Mellonigs. Después de la preparación de los cortes, las muestras se observaron en un microscopio electrónico de transmisión JEOL JEM-2000EX.

RESULTADOS Y DISCUSION

Cambios morfológicos durante el proceso de IVPI

A partir de las primeras 48 horas del proceso de inmunización *in vitro*, se observa la progresiva formación de "colonias" de células de aspecto linfoblastoide, que aparecen flotando o unidas a las células adherentes con características macrofágicas (figura 1). Esta activación de linfocitos y células presentadoras de antígeno se produce rápidamente gracias a la mezcla de citoquinas y linfocinas existentes en el TCM añadido.

Cuando se analizan las características de las células linfoides a la microscopía electrónica de transmisión (figuras 2a-d), es posible detallar mejor los cambios morfológicos que acompañan al proceso de activación. Puede observarse una progresiva transformación de linfocitos "maduros" en células con un aparato secretor bien desarrollado: se produce, con el tiempo de cultivo, una disminución de la relación núcleo/citoplasma, un aumento ostensible del número de mitocondrias, y el desarrollo del retículo endoplasmático rugoso y el complejo de Golgi. La presencia de células con estas características desde las 48 horas de cultivo, concuerda con el aumento paulatino de anticuerpos en el sobrenadante, lo que será discutido en detalle más adelante.

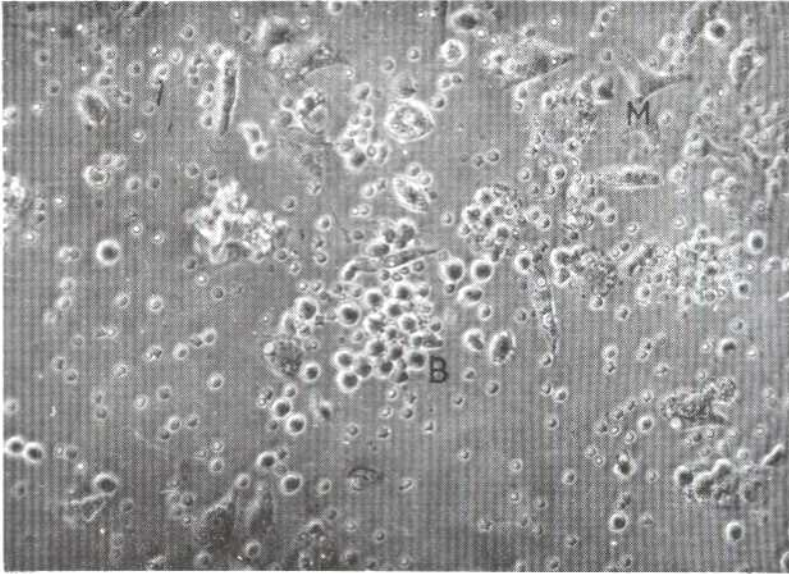


FIG. 1. Inmunización primaria *in vitro* de células esplénicas de ratón. (B) colonia incipiente de células linfoblastoides, en asociación con células macrofágicas adheridas a la superficie de cultivo. Se ven el campo otras células adherentes (A) y linfocitos. Microscopio invertido.

En estas condiciones de IVPI, una proporción de las células no adherentes cosechadas a los cinco días, son blastos jóvenes derivados de linfocitos B activados clonalmente (Borrebaeck, 1986). Las citoquinas que contiene el TCM -Interleuquina-2 (IL-2), factor de reemplazamiento de células T (TRF) y factor de crecimiento de células B (BCGF) (Borrebaeck, 1986)-, y otros factores secretados por las propias células esplénicas durante el cultivo, son los causantes de esta activación policlonal.

ELISA para el seguimiento del proceso de IVPI

En un trabajo reciente, Erkman *et al.*, 1987 han sugerido la conveniencia de evaluar el progreso del proceso de IVPI mediante un sistema ELISA indirecto, con el antígeno en fase sólida.

En algunos experimentos nosotros muestreamos los sobrenadantes durante la IVPI para la presencia de anticuerpos contra rh-EGF, encontrando un aumento progresivo de la presencia de inmunoglobulinas reactivas, con el tiempo de cultivo. No obstante, y como se detalla en la figura 3, estos sobrenadantes, desde las primeras horas de iniciado el cultivo, dan reactividad en el ELISA no sólo con el antígeno con que se inmuniza, sino también con muchos otras moléculas no relacionadas.

La explicación para este fenómeno, recientemente discutida en detalle en un simposio dedicado al tema (Borrebaeck, 1988), parece estar en la presencia de IgM de amplia reactividad (IgM pegajosas o *sticky*) cuya secreción es inducida durante la estimulación policlonal que se desarrolla en el cultivo, bajo la influencia del TCM.

Si aceptamos que la proporción de linfocitos inmunizados específicamente, es necesariamente baja, y existen otras IgM policlonales en los sobrenadantes, entonces en la práctica no es generalizable el uso de estos sistemas para seguir el curso de la inmunización, a menos que se demuestre que este tipo de reactividad cruzada no aparece.

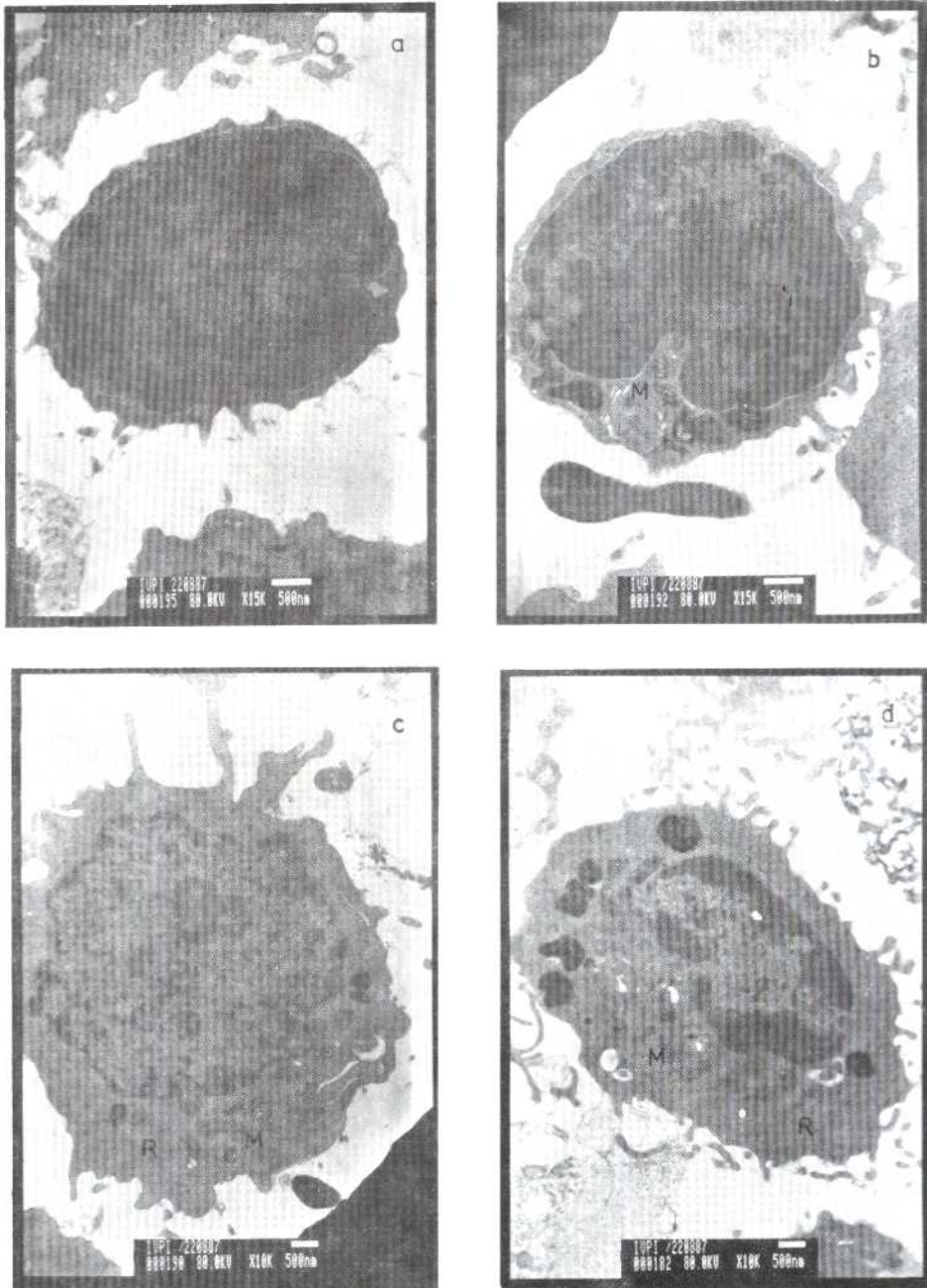


FIG. 2. Ultraestructura de linfocitos B a diferentes tiempos durante el proceso de inmunización *in vitro*: a) linfocito de activado (primer día de cultivo); b) linfocito en proceso de activación (48 horas de cultivo), con desarrollo incipiente de mitocondrias (M) y disminución de la relación núcleo/citoplasma; c) linfoblasto a las 72 horas de cultivo con abundantes mitocondrias y retículo endoplásmico rugoso (R); d) célula con características secretoras (cinco días en cultivo) exhibiendo abundantes mitocondrias y retículo endoplásmico rugoso en todo su citoplasma.

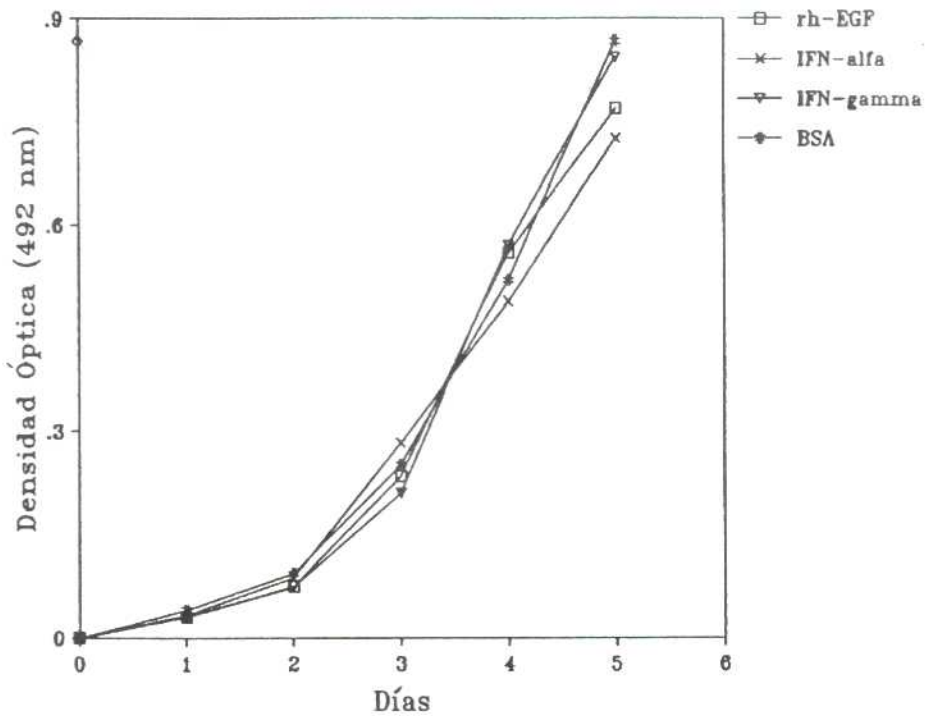


FIG. 3. Evaluación inmunoenzimática de la presencia de inmunoglobulinas específicas en el sobrenadante de los cultivos sometidos a la inmunización primaria *in vitro*: *abscisa*, tiempo de cultivo en días; *ordenada*, densidad óptica. IFN- γ : interferón gamma humano recombinante; rh-EGF: factor de crecimiento epidérmico humano recombinante IFN- α : interferón alfa 2 β recombinante; BSA: seroalbúmina bovina.

Otra consecuencia práctica indirecta de estos resultados es que el ensayo de los hibridomas obtenidos producto de la IVPI debe incluir, además del antígeno específico, una batería de antígenos no relacionados, que contribuirán con la exclusión de células secretoras de IgM de amplia reactividad.

IVPI y obtención de hibridomas secretores de IgM

Tal como habíamos encontrado en experimentos anteriores (Gavilondo, *et al.*, 1988), fue común recuperar alrededor del 25-30% del total de células originalmente sembradas (sin tener en cuenta las células adherentes que no se cosechan por permanecer ancladas a la superficie del frasco de cultivo) luego del proceso de IVPI; esta proporción, que en ocasiones puede llegar al 35% (Borrebaeck, 1986) parece depender de la calidad del suero y TCM empleados.

El número de células no adherentes, presentes después de la inmunización, parece no depender de la presencia del antígeno, pero la eficiencia de fusión y la aparición de hibridomas específicos, sí son dependientes de la presencia y concentración de este. En la tabla 1 se demuestra cómo el incremento de la concentración de rh-EGF condujo a un aumento de estos parámetros. Los hibridomas que se recuperan cuando no se añadió rh-EGF durante la IVPI, pueden derivarse de células B que responden ante algunas proteínas del suero bovino que comunmente se emplea en este proceso, o células ya activadas en el animal donante.

Tabla 1
 FRECUENCIA DE HIBRIDIZACION Y EFICIENCIA ESPECIFICA
 EN DIFERENTES CONDICIONES DE IVPI CON rh-EGF

Concentración del antígeno ($\mu\text{g/ml}$)	Frecuencia de hibridización (a) (%)	Eficiencia específica (b) (%)	Ensayo de anticuerpos (%)	
			α -IgG	α -Igs
0	2,1	0,0	0	0
0,2	39,1	17,9	0	100,0
1,0	53,1	13,7	0	100,0
1,0 + 3% HECS	82,3	28,5	0	100,0
5,0	42,2	12,3	0	100,0

a): Pozos con crecimiento de hibridomas/número total de pozos sembrados; media de dos experimentos independientes.

b): Cultivos con anticuerpos específicos en tres ensayos sucesivos/número de cultivos de hibridomas. Estimado mediante: (α -IgG) anticuerpos anti IgG de ratón conjugados con peroxidasa y (α -Igs) anticuerpos anti Igs de ratón, conjugados con peroxidasa; media de dos experimentos independientes.

En esta misma tabla se observa que sólo obtuvimos hibridomas secretores de anticuerpos de tipo IgM, un fenómeno que ya habíamos reportado anteriormente para este antígeno (Gavilondo *et al.*, 1988). A pesar de que algunos autores reportan la recuperación de hibridomas secretores de IgG después de cinco días de inmunización *in vitro* (respuesta secundaria, Borrebaeck, 1986), nosotros no hemos podido encontrar las condiciones favorables para pasar de la respuesta primaria a este antígeno. Ello puede estar influido por: a) alta homología estructural entre EGF humano y murino (Cohen, 1987), aunque en ratones es posible generar una respuesta adecuada y se recuperan luego de la fusión hibridomas-secretores de AcM que reconocen, tanto EGF humano como de ratón (Gavilondo *et al.*, 1988, Feyre *et al.*, manuscrito en preparación); b) la calidad del proceso de activación, dependiente del TCM y del suero empleados, así como del tiempo total de cultivo.

Efecto del HECS sobre la IVPI y la fusión

El HECS contiene citoquinas y linfoquinas con un importante efecto de estimulación de la proliferación de los hibridomas murinos y humanos (Astaldi *et al.*, 1980; Astaldi, 1983; Cabrera *et al.*, 1987). En el HECS se han podido identificar: Interleuquina-1 (IL-1), factor estimulador de colonias (CSF) y factor de crecimiento de hibridomas (HGF o Interleuquina-6), este último, idéntico al interferón β 2, mientras que no parece contener IL-2 (Astaldi, 1983; Arden *et al.*, 1985; Brakenhoff *et al.*, 1987; Cabrera, L., comunicación personal).

En estos experimentos, decidimos evaluar el HECS durante el proceso de IVPI, por las facilidades de su obtención y empleo como aditivo, ya ampliamente ensayadas por nosotros para los procesos de hibridización, y como una fuente adicional de factores que podía complementar en calidad los lotes de TCM y suero bovino empleados.

En la tabla 1 se muestra que el HECS condujo a una mayor recuperación de células no adherentes al término de los cinco días de inmunización, y posteriormente a un incremento sustancial de la frecuencia de hibridización y de la eficiencia específica.

Con motivo de que la adición de HECS implicó también un mayor número de células adherentes y no adherentes a los cinco días de cultivo (resultados no presentados), se pudiera especular acerca de que el efecto observado sobre la eficiencia de fusión resulte de una mejor presentación antigénica, o de una estimulación de la secreción de factores estimuladores

por macrófagos y linfocitos T, con un consecuente aumento del número de linfocitos B durante el tiempo de cultivo y una mayor probabilidad de "recuperar" hibridomas específicos después de la fusión.

AGRADECIMIENTOS

Los autores desean agradecer la cooperación del Laboratorio de Microscopía Electrónica del Instituto de Oncología y Radiobiología de La Habana, en la preparación de los experimentos de microscopía electrónica de transmisión.

REFERENCIAS

- AARDEN, L.; P. LANSDORP y E. DE GROOT (1985). "A growth factor for B cell hybridomas produced by human monocytes", en: *Lymphokines*, Vol. 10, Academic Press. New York, pp. 175-185.
- ASTALDI, G. (1985). *Use of human endothelial culture supernatant (HECS) as a growth factor for hybridomas*. Meth. Enzymology. **92**: 39-46.
- ASTALDI, G. C. B.; M. C. JANSSEN, P. M. LANDSDORPS, W. P. ZEIJLEMAKER y C. WILLEMS (1980). *Human endothelial culture supernatant (HECS): evidence for a growth-promoting factor bindin to hybridoma and myeloma cells*. J. Immunol. **126**: 1170-1177.
- BORREBAECK, C. A. K. (1986). *In Vitro Immunization for production of murine and human monoclonal antibodies: present status*. TIBTECH, pp. 147-153.
- BORREBAECK, C. A. K. (1988). *In vitro immunization in hybridoma technology*. Proceedings del Simposio Internacional sobre Inmunización *In Vitro* en la Tecnología de Hybridomas, Tylosand, Suecia, Septiembre 1987. Progress in Biotechnology, volumen 5, Elsevier Pub. co., Amsterdam, Oxford, New York.
- BOSS, B. D. (1986). *An improved in vitro immunization procedure for the production of monoclonal antibodies*. Meth. in Enzymology **121**: 27-33.
- BRAKENHOFF, J. P. J.; E. R. DE GROOT; R. F. EVERS; H. PANNENKOEK y L. A. AARDEN (1987). *Molecular cloning and expression of hybridoma growth factor in Escherichia coli*. J. Immunol. **139**: 4116-4121.
- CABRERA, L.; S. HERNANDEZ; A. VELANDIA y J. GAVILONDO (1987). *Características proliferativas de hibridomas B de ratón bajo diferentes condiciones de cultivo. Su relación con el tamizaje de factores de crecimiento específicos*. Interferón y Biotecnología **4**: 129-142.
- COHEN, S. (1987). *Epidermal growth factor*. *In Vitro Cell. Develop. Biol.* **23**: 239-246.
- ERKMAN, L.; G. SOLDATI; R. W. JAMES y A. C. KATO (1987). *Partial purification of lymphoblasts after in vitro immunization increases the yield in Ig-producing hybridomas*. J. Immunol. Meth. **98**: 43-52.
- HOFFMANN, M. K. y J. A. HIRST (1985). "Principles of in vitro immunization of human B lymphocytes", en: E. G. Engleman, S. K. H. Foung, J. Larrick y A. Raubitschek (Eds.), *Human Hybridomas and Monoclonal Antibodies*. Plenum Press, New York, London, pp. 277-289.
- GAVILONDO, J. (1987). *Inmunización primaria in vitro para la obtención de anticuerpos monoclonales de ratón contra antígenos solubles*. Interferón y Biotecnología **4**: 270-274.
- GAVILONDO, J.; I. LOPEZ; E. FERRA y C. DUARTE (1988). "In vitro primary immunization for the obtention of mouse monoclonal antibodies against human recombinant gamma interferon and epidermal growth factor", En: *In Vitro Immunization in Hybridoma Technology*. Progress in Biotechnology, volumen 5, Elsevier Pub. Co., Amsterdam, Oxford, New York, pp. 131-136.
- 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.; U. K. LAEMMLI y D. PETIJOHN (1984). *Immunization in vitro and production of monoclonal antibodies specific to insoluble and weakly immunogenic proteins*. PNAS **81**: 7897-7901.
- READING, C. L. (1986). "In vitro immunization for the production of antigen-specific lymphocyte hybridomas", en: J. Langone, H. Vunakis (Eds.), *Methods in Enzymology*, Vol. **121**, Academic Press, New York, pp. 18-27.
- SHELLING, M. (1986). *Increase of hybridoma formation by addition of dextran sulphate to In Vitro immunization system*. Hybridoma **5**: 159-161.

- SHULMAN, M.; C. D. WILDE y G. KOHLER (1978). *A better line for making hybridomas secreting specific antibodies*. *Nature* **276**: 269-270.
- TAKAHASHI, M.; S. FULLER y J. G. R. HURREL (1987). *Production of IgG-producing hybridomas by in vitro stimulation of murine spleen cells*. *J. Immunol. Meth.* pp. 247-253.
- WASSERMAN, R. L.; R. D. BUDENS y E. S. THAXTON (1986). *In vitro stimulation prior to fusion generates antigen-binding human-human hybridomas*. *J. Immunol. Meth.* **93**: 275-283.
- YAMAURA, N.; M. MAKINO; L. WALSH; A. BRUCE y B. K. CHOE (1985). *Production of monoclonal antibodies against prostatic acid phosphatase by In Vitro immunization of human spleen cells*. *J. Immunol. Meth.* **84**: 105-116.