Biotecnología aplicada, Vol. 7, No. 1, 102-105 (1990)

Procedimiento para obtener anticuerpos monoclonales mediante el transplante de hibridomas *in vivo*

R. CASTILLO y A. VELOSO

Departamento de animales y tumores experimentales (DATE). Instituto Nacional de Oncología y Radiobiología (INOR), 29 y E, Vedado, Ciudad de La Habana, Cuba

Recibido en septiembre de 1989
Aprobado en noviembre de 1989

INTRODUCCION

La inmortalización de células linfoides B mediante su hibridación con células de un mieloma en cultivo y las posibilidades de clonar estos hibridomas, permiten obtener cantidades ilimitadas de anticuerpos monoclonales (AcM) secretados por cada estirpe de hibridomas (Kohler y Milstein 1975; Gavilondo, 1984).

Después que se ha generado el hibridoma secretor del AcM deseado, el paso inmediato es la producción de suficiente cantidad de anticuerpos para su total caracterización, y posteriormente, su empleo y distribución. Para ello, pueden usarse dos métodos; el cultivo masivo *in vitro* y la propagación *in vivo* de los hibridomas, con el propósito de recolectar y procesar sobrenadantes y líquido ascítico maligno (LAM), respectivamente, ambos ricos en AcM (Díaz, 1987; Hoogenraad, *et al., 1983, 1986).*

Las concentraciones del AcM en el LAM desarrollado en la cavidad peritoneal, al igual que en el suero del animal portador del hibridoma trasplantado, alcanza niveles hasta 1 000 veces mayores que los obtenidos en el sobrenadante del medio de cultivo (Galfre y Milstein, 1982).

En este trabajo se mencionan los detalles generales de la técnica relacionada con el trasplante y crecimiento de los hibridomas en ratón y la recolección de las células y del LAM rico en AcM. Con el ajuste individual de varios de estos parámetros, pudiera alcanzarse una mayor optimización en la producción de AcM secretados para cada hibridoma en particular. Para este fin, varias referencias pueden ser consultadas en este trabajo.

Antes de proceder a la descripción de los procedimientos, es necesario tener en cuenta dos aspectos importantes: el estado microbiológico del material de laboratorio y del animal, y el estado genético del animal.

Estado microbiológico del material de laboratorio y del animal

Toda contaminación microbiológica conspira contra el buen crecimiento celular, tanto *in vitro* como *in vivo*. De ahí, la necesidad de trabajar en condiciones de esterilidad. Esto adquiere un mayor rigor cuando se trata del uso del AcM con fines terapéuticos en el humano, donde se

requieren animales con un estado microbiológico que responda a una categoría libre de gérmenes patógenos específicos (SPF) o libres de gérmenes (GF), que evite cualquier trasmisión de enfermedad del animal al hombre, fundamentalmente de tipo viral.

Estado genético del animal

Es necesario que el ratón seleccionado para el trasplante del hibridoma responda al mismo fondo genético del híbrido generado, es decir, si el hibridoma fue obtenido a partir de células de mieloma y linfocitos B sensibilizados, ambas provenientes de ratón BALB/c, la línea para hacer crecer este hibridoma debe tener un fondo genético BALB/c. De no producirse esta compatibilidad genética, el injerto del hibridoma será rechazado, a menos que se utilicen animales inmunodeprimidos de tipo congénito con carácter hereditario, cuyo mejor representante es el ratón atímico (*nude mice*), o con inmunodeficiencia por inducción, para lo cual se utilizan la ciclofosfamida a razón de 0,025 mg/g de peso, 24 horas antes del inóculo del hibridoma o la irradiación a dosis única de 5 gray (Gy), cuerpo entero.

Por otro lado, los ratones híbridos entre líneas con genofondo compatible al hibridoma y otras líneas de elevada fertilidad, son una variante muy utilizada para incrementar el rendimiento y la productividad en la recolección de LAM rico en AcM, además de disminuir considerablemente el costo de producción del animal (Brodeur y Tsang, 1986).

En ocasiones, si no se cuenta con un ratón inmunodeprimido, se hace obligatoria la producción de un ratón híbrido para hacer crecer un hibridoma determinado, es decir, si el mieloma procede del ratón BALB/c y las células linfoides del bazo son de otra línea murina, por ejemplo, C3H, entonces el hibridoma producido de dicha fusión debe ser necesariamente inoculado en un ratón híbrido (BALB/c x C3H) F1.

A continuación describimos el procedimiento de obtención de hibridomas para el trasplante ratón-ratón o cultivo-ratón y del líquido rico en AcM para su posterior purificación. Mencionaremos finalmente las dos vías básicas utilizadas para el trasplante de los hibridomas en el ratón intraperitoneal (ip) e intraesplénica (ie).

OBTENCION DE HIBRIDOMAS PARA UN NUEVO TRASPLANTE

Existen dos fuentes básicas para obtener las células: a partir de la cavidad peritoneal de ratón *in vivo* y a partir del cultivo celular *in vitro*.

In vivo

Entre los 7-30 días después de la inoculación del hibridoma en el ratón (según las características de este) extraiga el LAM por punción abdominal (aguja No. 20), con una jeringuilla (5-10 ml) heparinizada (5 000 UI/ml) o por goteo en un tubo de centrífuga que contenga heparina (0,1 ml por cada 10 ml de LAM recolectado).

Se recomienda sumergir los tubos en un baño de hielo durante todo el proceso de recolección.

- Centrifuge el LAM durante 10 minutos a temperatura ambiente y 1 100 rpm, separe el sobrenadante y resuspenda el *pellet* celular con suero fisiológico o cualquier medio de cultivo.
- Realice además un control microbiológico del sobrenadante por los métodos bacteriológicos convencionales.
- Evalúe la actividad biológica y concentración del AcM en el sobrenadante.

In vitro

- Coseche los hibridomas y calcule la concentración celular.
- Evalúe la actividad biológica del AcM en el sobrenadante de cultivo por los métodos establecidos.
- Transfiera la suspensión celular a un tubo de centrífuga y centrifuge 10 minutos a temperatura ambiente y (1 100 rpm); separe el sobrenadante y resuspenda el *pellet* celular con medio de cultivo, ajustando la concentración al inóculo deseado, por animal.

OBTENCION DE LIQUIDO ASCITICO RICO EN AcM

Los pasos a seguir son los siguientes:

- Recolecte el LAM en días alternos, hasta la muerte del animal, tal como describimos anteriormente.
- Centrifuge a 4 000 rpm durante 20 minutos (1-2 veces).
- Recolecte el sobrenadante rico en AcM en un envase debidamente rotulado.
- Evalúe, a partir de una alicuota, la actividad biológica del AcM y su concentración.
- De no ser inmediata la purificación (en las 24 horas siguientes de la extracción) use un agente antimicrobiano (ejemplo: NaN_3 al 0,1 %) para evitar contaminación y almacene a -20°C.
- Los sobrenadantes de las subsiguientes extracciones pueden añadirse al ya congelado o envasarse por separado.
- Evite descongelar un mismo lote más de una vez, fundamentalmente para los AcM tipo IgM.

TRASPLANTE DE LOS HIBRIDOMAS EN EL RATON

Vía intraperitoneal

1. Separe un determinado número de ratones, preferiblemente machos y de 25-30 g.

2. De ocho a veinte días antes de la administración del hibridoma, inocule cada animal (use preferiblemente aguja No. 20) por vía ip con 0,3 - 0,5 ml de Pristane (2, 6, 10, 14 tetrametipentadecano), adyuvante incompleto de Freund o aceite mineral.

La previa inoculación de estos agentes químicos tiene como función principal la de producir una severa irritación en la cavidad peritoneal, que facilita la producción de abundante ascitis tumoral algunos días después de inoculados los hibridomas.

3. Para el trasplante de los hibridomas, desinfecte con alcohol al 70 % la zona de inoculación e inyecte ip (aguja No. 25-26) el número de células deseados. Generalmente se recomienda una concentración entre 0,5 – 5 x 10^6 células/ratón, en no más de 1 ml de suspensión. Agite regularmente el tubo que contiene la suspensión celular a inocular.

Entre los 7-30 días después del inóculo, estos ratones pueden ser nuevos donantes. No obstantes, es importante controlar la actividad biológica y/o concentración del AcM durante los pases continuos del hibridoma, tanto ratón-ratón, cultivo-ratón o cultivo-cultivo, ya que pueden ocurrir incrementos de variantes celulares negativas (no productoras del AcM), que sustituyen progresivamente a las variantes secretoras.

Vía intraesplénica

1. La selección del animal receptor, manipulación y ajuste de la concentración de hibridomas a inocular por ratón responde a los mismos criterios mencionados excepto para el agente irritante (Withe y Rosalie, 1983).

2. Para anestesiar al animal, prepare la siguiente mezcla:

2,5 ml de calipsol
2,0 ml de diazepán
(7-cloro-2,3-dihidro-1-metil-2-oxo-5-fenil-1h-1,4 benzodiazepina).
0,5 ml de atropina tropiltropato.

Esta mezcla puede ser utilizada hasta 48 horas después, almacenada a 4°C.

Inyecte 0,1 ml de la mezcla por la vía ip.

3. Una vez anestesiado el animal, proceda a la inoculación ie con ayuda de tres tijeras y tres pinzas, de la manera siguiente:

- Coloque el animal en posición que garantice la manipulación del lado izquierdo del abdomen.
- Desinfecte con alcohol al 70 el tórax y el abdomen.
- Con el primer juego de instrumentos tome la piel del abdomen y haga una pequeña incisión superficial (10 mm) inmediatamente después de la última costilla del flanco izquierdo.
- Con el segundo juego de instrumentos, pince y eleve ligeramente la pared peritoneal y con la tijera haga una incisión semejante a la anterior.
- Con ayuda de un fórcep abra la incisión cuidadosamente y con la tercera pinza (sin dientes) inmovilice el bazo (evite exponerlo totalmente fuera de la cavidad) y por uno de sus vértices inocule lentamente la suspensión celular (use jeringuilla de 1 ml con aguja No. 25-26), en un volumen no mayor de 0,1 ml.

Coloque el bazo en la cavidad con ayuda de los fórceps y suture con puntos simples (use *catgut* triple "o", por planos, ambos planos a la vez).

Entre los 4-7 días la herida está totalmente sana y a partir de los 30 días (en dependencia de las características del hibridoma) se obtienen masas tumorales en el bazo y en otras regiones de la cavidad peritoneal. Eventualmente se presenta una pequeña cantidad LAM rico en AcM. Los hibridomas que conforman la masa tumoral pueden separarse mecánicamente después de disecar estas mediante un homogeneizador de tejidos.

Esta vía solo se justifica en los casos donde se requiera el rescate de alguna estirpe de híbridos importantes, pero de los cuales se disponga un bajo número (con $\geq 10^3$ hibridomas se puede obtener un crecimiento tumoral).

REFERENCIAS

BRODEUR, B.R. y P.S. TSANG (1986). *High yield monoclonal antibody production in ascites.* J. Immunology Methods **86**: 239-245.

DIAZ, M.E. (1987). *Estudio sobre la obtención del fluido ascítico maligno a partir de hibridomas en ratones BALB/c y sus híbridos.* Tesis de Diploma, INOR-UH.

GALFRE, G. y C. MILSTEIN (1982). *Preparation of monoclonal antibodies; strategies and procedures.* Chapter I, V. Houba, WHO, Geneve and S.H. Chan, WHO Inmunology Research & Training Center, Singapore, Switherland.

GAVILONDO, J. (1984). *Anticuerpos monoclonales. Producción y aplicación.* Rev. Cub. Invest. Biomed. **3**: 98-111.

GORDON, L. (1986). *Continuous hybridoma growth and monoclonal antibody production in hollow fiber reactors separator.* Biotechnol. Bioengeneer. **28**: 50-60.

HOOGENRAAD, N.; T. HELMAN y J. HOOGENRAAD (1983). *The effect of pre-inyection of mice with pristane on ascites tumor formation and monoclonal antibody production.* J. Immunol. Methods **61**: 317-320.

HOOGENRAAD, N. y C. WRAIGH (1986). *The effect of pristane on ascites tumor formation and monoclonal antibody production.* Meth. Enzymol., **121**: 375-381.

KOHLER, G. y C. MILSTEIN (1975). *Continous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity.* Nature, **256**: 495-496.

WITHE, P. y B. ROSALIE (1983). *Improved efficient of hibridoma ascites production by intrasplenic inoculation in mice.* J. Natl. Cancer Inst. **70**: 575-577.