

Empleo de ratones híbridos de primera generación OFBALB(F1) en la producción de fluido ascítico rico en anticuerpos monoclonales

A. ALFARO, O. HERRERA, F.O. CASTRO y K. COSME

División de Hibridomas y Modelos Animales, Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología. Apartado 6162. Ciudad de La Habana, Cuba

Recibido en marzo de 1990

Aprobado en junio de 1990

RESUMEN

Se aparearon ratones machos BALB/c con hembras de la línea heterocigótica OF-1. La progenie híbrida obtenida (OFBALBF1) fue evaluada con respecto a: 1) número de crías por camada, 2) velocidad de crecimiento, 3) capacidad de producción de ascitis tumoral a partir de hibridomas secretores de anticuerpos monoclonales (AcM). Se estudiaron los mismos parámetros para ratones consanguíneos BALB/c. El número de crías por parto en el cruce OFBALB(F1) fue significativamente superior que en la línea BALB/c ($12,4 \pm 2,1$ vs $6,0 \pm 0,8$ $P < 0,001$).

Los ratones híbridos OFBALB(F1) alcanzan un peso de 23-28 g en un tiempo de 8 semanas contra 14-16 g para los BALB/c en el mismo período de tiempo. Dos hibridomas secretores de AcM fueron empleados para la producción de ascitis tumoral en ratones híbridos OFBALB(F1) y BALB/c. El porcentaje de prendimiento de los hibridomas fue mejor en los ratones BALB/c. Los rendimientos en términos de volumen de ascitis por animal fueron hasta 2,88 veces superiores en los ratones OFBALB(F1), sin diferencias en la secreción y especificidad de los AcM. Estos resultados sugieren el empleo de ratones híbridos de primera generación OFBALB(F1) en la producción de grandes volúmenes de ascitis tumoral, con un considerable ahorro de animales y un sustancial incremento de la productividad de los mismos.

SUMMARY

BALB/c male mice were mated with OF-1 females to produce first generation cross-bread offspring

(OFBALBF1). The following parameters were studied: 1) litter size; 2) growth rate, and 3) capability of producing tumor ascites containing monoclonal antibodies (MAbs). BALB/c animals were mated as control, and the same parameters were studied. The average litter size was greater for the OFBALB(F1) cross ($12,4 \pm 2,1$ vs $6,0 \pm 0,8$ $P < 0,001$).

Hybrid mice grew faster than BALB/c. They reached 23-28 g in 8 weeks of life (14-16 weeks for the BALB/c). Two hybridoma cell lines were injected intraperitoneally into these mice to produce ascitic fluid rich in MAbs. The percent of tumor takes was greater in the BALB/c line than in the hybrid cross-bread. The volume of ascites produced was up to 2,88 times higher in the OFBALB(F1) mice. Antibody titers and activity did not differ between mouse types. The use of cross-bread F1 mice is of great value for the production of ascites, as it offers considerable economic advantages over the use of syngenic BALB/c mice.

INTRODUCCION

En la actualidad la producción de ascitis tumoral rica en anticuerpos monoclonales (AcM) se lleva a cabo básicamente en ratones BALB/c, genéticamente compatibles con la mayoría de los hibridomas generados. Los indicadores reproductivos de la línea consanguínea BALB/c, tales como número de crías por parto y al destete, no son altos, lo que unido

a su lento crecimiento y carestía, ha conducido a que varios grupos empleen los cruzamientos híbridos de primera generación más prolíferos y vigorosos, y que puedan producir un mayor volumen de fluido ascítico sin detrimento en la concentración y especificidad de los AcM (Brodeur y Tsang, 1986; Stewart *et al.*, 1989; Castillo, R. comunicaciones personales). Con estos fines se han apareado hembras de líneas muy prolíferas (C57BL6, SW, IOR/Hab, MFI, etcétera) con machos BALB/c.

En este trabajo se reporta la obtención de una línea híbrida de primera generación OFBALB(F1), con mejores indicadores reproductivos y de crecimiento que la línea isogénica BALB/c y capaz de producir hasta 2,88 veces más fluido ascítico tumoral que ésta.

MATERIALES Y METODOS

Animales

Como parentales para la producción del híbrido OFBALB(F1) se aparearon ratones hembras OF-1 de 8 semanas de edad, con machos BALB/c (CENPALAB, La Habana) de probada fertilidad. En cada apareamiento se controló el número de crías nacidas vivas y destetadas. Los animales fueron mantenidos en instalaciones para animales libres de patógenos específicos, con acceso libre a pienso y agua estériles. Semanalmente se pesaron las crías separadas por sexo y se registró el dato.

Para la producción de ascitis fueron empleados animales híbridos OFBALB(F1) de 8 semanas; el peso promedio de las hembras fue de $23 \pm 2,1$ g y el de los machos $28 \pm 3,2$ g. Como control se utilizaron ratones BALB/c de 14 semanas ($21 \pm 1,5$ g las hembras y $25 \pm 2,1$ g los machos).

Híbridomas

Los híbridomas utilizados fueron el 48/1/5, secretor de un AcM contra el antígeno de superficie del virus de la hepatitis B (HBsAg) y el 1F1/B6/C5, productor de un AcM contra el interferón alfa 2 humano recombinante (Duarte *et al.*, 1987).

Grupos experimentales y producción de ascitis tumoral

Se conformaron grupos de 25 animales de cada sexo y línea (OFBALBF1 y BALB/c) para cada híbridoma. Los animales recibieron por vía intraperitoneal (i.p.) 0,5 ml de aceite mineral (día cero) y 10 días más tarde se inocularon por la misma vía con 3×10^6 células (híbridoma 48/1/5) ó 5×10^6 células (híbridoma 1F1/B6/C5) en 1 ml de medio DMEM.

Los ascitis fueron recolectados por punción abdominal en días alternos a partir del día 20. El fluido ascítico se centrifugó a 3500 rpm durante 15 minutos, se colectó y congeló el sobrenadante hasta su uso.

Estadísticas

Los datos se procesaron estadísticamente mediante Anova de clasificación simple y test "t" de comparación de medias.

RESULTADOS Y DISCUSION

Treinta y tres hembras reproductoras OF-1 fueron apareadas en una proporción 3:1 con 11 machos BALB/c. Se produjeron 30 partos; el promedio de crías nacidas vivas fue de $12,4 \pm 2,1$ (tabla 1). Como control se apareó la misma cantidad de hembras y machos BALB/c. El número de crías por parto fue 2 veces mayor en la línea OFBALBF1 que en la BALB/c. Las pérdidas de crías al destete fue mayor para la línea BALB/c (17 % vs 2 % para la línea OFBALBF1).

El peso de los animales, así como su incremento semanal, fue otro de los parámetros que se tuvo en cuenta. Como puede apreciarse en la tabla 1, la diferencia de peso entre los animales híbridos y los BALB/c es significativa desde el destete (tercera semana $P < 0,05$). En nuestras condiciones los ratones OFBALB(F1) alcanzan el peso idóneo para ser utilizados en la producción de ascitis a las ocho semanas (24-28 g). En la línea BALB/c se requieren, al menos, 12-14 semanas para alcanzar un peso similar.

Tabla 1
INDICACIONES REPRODUCTIVAS DE LAS LINEAS OFBALB(F1) Y BALB/c

Parentales	Crías por parto		Peso semanal		
	nacidas +DS	destetadas %	III g ± DS	VIII	
BALB/c	6,0* ± 1,20	83	machos	7,3 ^a ± 0,55	21,1 ^a ± 1,40
			hembras	6,9 ^a ± 0,46	18,7 ^b ± 1,10
OF-1 x BALB/c	12,4** ± 3,11	98	machos	8,7 ^b ± 1,55	28,0 ^c ± 3,23
			hembras	8,0 ^b ± 1,72	23,1 ^d ± 2,11

* vs

** P < 0,001

ab difieren significativamente P < 0,05

a b c d Letras distintas dentro de esa columna difieren significativamente, P < 0,001.

Los resultados que se obtienen al aparear hembras OF-1 con machos BALB/c son muy favorables para el establecimiento de una línea abierta de primera generación, cuyos individuos pudieran ser utilizados para la producción de ascitis tumoral.

En la tabla 2 se resumen los experimentos llevados a cabo en ratones OFBALB(F1) y BALB/c para comparar el rendimiento de fluido ascítico tumoral en ambas líneas al ser inoculados con hibridomas secretores de AcM.

Se emplearon dos hibridomas obtenidos en la División de Hibridomas y Modelos Animales del CIGB, uno secretor de AcM contra el HBsAg recombinante (48/1/5) y otro secretor de un AcM que reconoce al interferón alfa 2 humano recombinante (1F1/B6/C5). El porcentaje de prendimiento de estos dos hibridomas en ratones BALB/c (72,5%) fue superior al alcanzado en los ratones OFBALB(F1) (55,8%). Este fenómeno ha sido reportado por el grupo de Stewart *et al.* (1989), quienes encontraron diferencias significativas en el prendimiento tumoral entre los ratones BALB/c y los híbridos de primera generación, y pudiera ser explicado por la necesaria deriva genética de los caracteres

homocigóticos del BALB/c al ser introducidos en un genofondo heterocigótico. En la actualidad, están en curso experimentos de inmunosupresión de ratones OFBALB(F1) con vistas a tratar de elevar el prendimiento de los hibridomas.

La producción del fluido ascítico tumoral por animal fue significativamente superior en los ratones OFBALB(F1) (P < 0,001), tanto para las hembras como para los machos, llegando a ser 2,88 veces superior. En el caso del hibridoma 48/1/5, el volumen de ascitis por animal fue 4,5 veces mayor en los híbridos (P < 0,000001). Estos resultados coinciden con los reportados por Brodeur *et al.* (1984) y por Stewart *et al.* (1989). Se encontraron diferencias significativas en cuanto al rendimiento de ascitis por animal, no sólo entre las líneas analizadas: BALB/c y OFBALB(F1), sino entre los diferentes sexos dentro de la misma línea, tanto para el BALB/c como para el OFBALB(F1); (P < 0,02 machos vs hembras OFBALB(F1) y P < 0,03 machos vs hembras BALB/c).

Brodeur y Tsang (1986), reportan semejantes resultados, no así Stewart *et al.* (1989), quienes plantean no haber encontrado diferencias en el rendimiento

Tabla 2
COMPARACION DEL PRENDIMIENTO Y LA PRODUCTIVIDAD DE LOS HIBRIDOMAS 1F1B6C5 Y 48/1/5 EN RATONES HIBRIDOS OFBALB(F1) Y BALB/c

Híbridoma	Ratones inoculados		Ratones preñados		Media ascitis por animal, ml ± DS	
	machos	hembras	machos	hembras	machos	hembras
BALB/c híbridoma						
1F1B6C5	25	25	16	20	5,16 ± 1,8	3,87 ± 1,6
48/1/5	25	25	15	20	4,41 ± 1,6	2,93 ± 1,2
% preñados			62	80		
media asc/ ratón*					4,78	3,40
media asc/ g de peso**					0,19	0,16
media asc/ BALB/c***					4,01	
OFBALB(F1) híbridoma						
1F1B6C5	25	25	16	16	10,74 ± 3,0	6,86 ± 2,1
48/1/5	25	25	12	13	20,95 ± 8,5	15,03 ± 3,2
% preñados			56	58		
media asc/ ratón*					15,84	10,94
media asc/ g de peso**					0,56	0,43
media asc/ OFBALB(F1)***					11,78	

* volumen medio de ascitis por ratón, independiente del híbridoma

** volumen medio de ascitis por gramo de peso, independiente del híbridoma

*** volumen medio de ascitis por línea, independiente del híbridoma y del sexo del animal

promedio de ascitis entre hembras y machos de sus líneas híbridas de primera generación.

El total de extracciones realizadas por animal no varió ($\bar{x} = 3,5$ OFBALB(F1) y $\bar{x} = 3,5$ BALB/c); en concordancia con este resultado tampoco se hallaron diferencias en la sobrevivencia de los híbridos y los BALB/c. El incremento de la productividad de los animales híbridos, por tanto, no está ligado a una mayor resistencia sino a un aumento de la productividad por

unidad de peso corporal (tabla 2), lo que pudiera estar relacionado con una mayor capacidad abdominal en los ratones OFBALB(F1), así como por su mayor peso corporal.

La concentración de AcM en los ascitis, así como su utilidad para el empleo en columnas de inmunoafinidad, fue evaluada para cada línea de ratón, sin que se encontrasen diferencias entre ambas (no se muestran los datos).

Tabla 3
RESUMEN DE LA PRODUCCION DE ASCITIS EN RATONES BALB/c Y OFBALB(F1)
EN EL PERIODO ENERO-MARZO 1990. HIBRIDOMA 48/1/5

Animales inoculados	Animales prendidos (%)	Volumen de ascitis centrifugado (VAC) ml	Media VAC ml/animal	
			inoculados	prendidos
BALB/C 545	431 (79,0)	753	1,381	1,747
OFBALB(F1) 542	225 (41,5)	2162	3,989	9,608

En la actualidad, en el CIGB se dispone de una colonia de 120 hembras reproductoras OF-1 en apareamiento continuo con machos BALB/c. El promedio de crías por parto es superior a los 11 animales y se están empleando cantidades importantes de estos híbridos OFBALB(F1) para la producción en escala de hasta litros por mes de ascitis tumoral rica en AcM (tabla 3).

El empleo de ratones híbridos de primera generación derivados de BALB/c permite la producción de elevados volúmenes de ascitis tumoral con una significativa economía de animales y con una gran productividad de ascitis por animal sin mermas en la calidad y especificidad de los AcM producidos. El crecimiento acelerado de los ratones OFBALB(F1) permite, por otra parte, una ganancia sustancial en el tiempo requerido para la producción de AcM. Es necesario

buscar formas de elevar el prendimiento de los hibridomas en los ratones OFBALB(F1).

REFERENCIAS

- BRODEUR, B.R.; P. TSANG y Y. LARVE (1984). Parameters affecting ascites tumor formation in mice and monoclonal antibody production. *J. Immunol. Methods* 71: 265-270.
- BRODEUR, B.R. y P. TSANG (1986). High yield production in ascites. *J. Immunol. Methods* 86: 239-242.
- CASTILLO, R. Comunicaciones personales.
- DUARTE, C.; M.E. FERNANDEZ DE COSSIO; G. SIERRA; E. PENTON; A. AGRAZ; G. FURRAZOLA y A. AGUILERA (1987). Anticuerpos monoclonales de ratón contra el interferón alfa 2 humano recombinante. Su empleo en la purificación y detección de antígenos. *Interferón y Biotecnología* 4 (3): 221-232.
- STEWART, F.; A. CALLENDER y D.J. GARMES (1989). Comparison of ascites production for monoclonal antibodies in BALB/c and BALB/c-derived cross bred mice. *J. Immunol. Methods*. 119: 269- 275.