

Estudio de los tumores sólidos desarrollados por los ratones durante la producción de Anticuerpos Monoclonales

Dasha Fuentes Morales, Ramiro R. González Pumarino, Bárbara O. González Navarro, Natacha Negrín Rodríguez.

Centro Nacional para la Producción de Animales de Laboratorio, CENPALAB. Finca Tirabeque, Km 2½ Carretera al Cacahual, Bejucal. La Habana. Cuba. E. mail: mail@cenpalab.inf.cu

Los ratones constituyen un elemento fundamental para la producción de líquido ascítico rico en anticuerpos monoclonales (AcM). Durante este proceso suelen aparecer tumores sólidos que afectan directamente el volumen de producción, por lo que el objetivo de este trabajo consistió en estudiar estas neoformaciones para establecer sus características y de esta manera poder predecir las afectaciones en la producción a escala industrial de líquido ascítico. Se utilizó la información de 12 250 animales de ambos sexos agrupados en 12 lotes de producción de los hibridomas CB-HEP.1, ior r3 e ior t1, determinando el momento de aparición, la incidencia de tumores por sexos e hibridomas, así como sus características anatomopatológicas. Se demostró que los tumores comienzan a aparecer a partir del día 14 postinoculación, llegando a afectar al 3,4% de los animales el día 20 postinoculación, existiendo diferencias significativas ($p < 0,05$) en la frecuencia de aparición en los machos respecto a las hembras (4,4% vs 2,3%). Además, se observó mayor incidencia del hibridoma CB-HEP.1, seguido de ior t1 e ior r3 (3,9%, 1% y 0,3%, respectivamente). El análisis histopatológico reveló que se trata de una discrasia de células plasmáticas, es decir, mielomas que van creciendo pudiendo llegar a ocupar toda la cavidad peritoneal y limitar la recolección y producción del líquido ascítico.

Palabras claves: ratones; producción de ascitis; tumores sólidos.

Introducción

El uso masivo de los anticuerpos monoclonales (AcM) en la investigación, el diagnóstico y la terapéutica de enfermedades del hombre ha creado la necesidad de estrategias y métodos adecuados para su producción y purificación en cantidades y calidad suficientes para cada aplicación específica (1). La obtención de estos compuestos ha estado muy estrechamente vinculada, desde sus inicios, con la producción intensiva de grandes volúmenes de ascitis tumoral por la propagación de hibridomas murinos en ratas y ratones (2).

La cavidad peritoneal del ratón y la rata representan un sitio idóneo para la producción de AcM debido a la posibilidad de formación de un fluido ascítico en respuesta al crecimiento tumoral, cuyo volumen puede estar entre 2 y 10 mL por ratón y una concentración de AcM entre 5 y 15 mg/mL (3).

Uno de los factores que afectan la producción de líquido ascítico es la presencia de formaciones sólidas, adherentes, de consistencia dura, que van ocupando toda la cavidad peritoneal y provocan una

disminución de la producción, por lo que el objetivo de este trabajo es estudiar las características de estas formaciones para estimar las pérdidas que se producirán con el uso de determinado sexo e hibridoma durante el proceso productivo.

Materiales y Métodos

Animales

Se emplearon ratones de la línea BALB/c/cenp de ambos sexos, de 11 a 13 semanas de edad y un peso mínimo de 22 g las hembras y 24 g los machos, clínicamente sanos y de categoría higiénico sanitaria libres de patógenos específicos (SPF), producidos y certificados por la División de Roedores Gnotobióticos del CENPALAB.

Los animales fueron distribuidos al azar en grupos de 500 ratones de cada sexo; posteriormente a cada grupo se le asignó el hibridoma utilizando métodos aleatorios, de modo que existiesen cuatro réplicas de cada hibridoma con animales de ambos sexos.

Condiciones de mantenimiento

Los animales se alojaron en cajas plásticas de polipropileno tipo T3 procedentes de la EINPUD, a razón de 10 ratones por caja, con tapas de rejillas de metal inoxidable cambiables. Las cajas se identificaron mediante tarjetas y se mantuvieron en salas protegidas por barreras físicas, en condiciones controladas, con temperatura 22 ± 2 °C, humedad relativa 65-80%, 12 cambios de aire/hora y un fotoperíodo de 12/12 h.

El agua se suministró en biberones de 500 mL, con pipeta de acero inoxidable, mientras que el alimento pelletizado, fórmula EMO 1001 (ALYco, CENPALAB) fue colocado en la tolva de la caja a razón de 5 g diarios/animal. Como encamado se utilizó bagazo de caña desmeollado. Todos estos materiales fueron esterilizados mediante autoclave a 121 °C durante 20 min.

Hibridomas

CB-HEP.1: Hibridoma murino, específico para la obtención del anticuerpo que reconoce al antígeno S de superficie del virus de la Hepatitis B, cultivado en medio RPMI 1640 (SIGMA, EE UU), suplementado con 8% de Suero Fetal Bovino (SFB) (HyClone, EE UU).

ior r3: hibridoma murino específico para la obtención del anticuerpo que bloquea el receptor egf humano, cultivado en medio RPMI 1640.

ior t1: hibridoma murino específico para la obtención de un anticuerpo monoclonal antiCD6, cultivado en medio RPMI 1640.

Producción de ascitis

A los ratones se les aplicó por vía intraperitoneal Petrolato Líquido Pesado (MediCuba, Habana, Cuba) a razón de 0,5 mL/animal. Transcurridos 10 días, cada animal fue inoculado por esta vía con 10^6 células del hibridoma CB-HEP. 1 (Grupo 1), $2,5 \times 10^5$ de ior r3 (Grupo 2) ó $1,5 \times 10^6$ de ior t1 (Grupo 3). Los animales fueron observados a partir del octavo día posterior a la inoculación, realizando

extracciones de líquido ascítico en días alternos, durante las cuales se detectó, por palpación, la presencia de formaciones sólidas en la cavidad abdominal.

Se determinó el momento de aparición de los tumores y su incidencia por extracciones, por sexos y por hibridoma.

Estudio anatomopatológico

Se envió al laboratorio de Anatomía Patológica una muestra de los animales afectados, los cuales fueron anestesiados con éter y posteriormente sacrificados por dislocación cervical. Se examinó la superficie corporal, los orificios, la cavidad craneal, torácica y abdominal y todos los órganos. Se tomaron muestras de los tumores, las cuales fueron fijadas en formol neutro al 10%, incluidas en parafina, cortadas y coloreadas con Hematoxilina-Eosina para determinar las características morfológicas de las neoformaciones.

Procesamiento de los datos

Se empleó el paquete estadístico SPSS, Statistical Package for Windows, 1992 (4), estableciendo un nivel de confianza del 95% en la interpretación de los resultados. Para determinar si hubo diferencias significativas entre grupos y sexos se realizó la prueba de χ^2 y test de Fisher.

Resultados y Discusión

Los ratones BALB/c han sido usados tradicionalmente para la producción de ascitis debido a su gran capacidad para desarrollar tumores líquidos en la cavidad peritoneal (5); a pesar de esta característica típica de la línea algunos animales desarrollan tumores sólidos durante el proceso productivo (Tabla 1).

Como se aprecia en la Tabla 1, los tumores se comienzan a detectar por palpación a partir del día 14 postinoculación y se van desarrollando hasta ocupar toda la cavidad peritoneal, llegando a afectar al 3,4% de los animales el día 20 postinoculación.

Tabla 1. Incidencia (%) de tumores sólidos según el sexo y el tiempo transcurrido después de la inoculación

	Día 8	Día 10	Día 12	Día 14	Día 16	Día 18	Día 20
Hembras	0	0	0	0,64 ^a	1,33 ^a	1,90 ^a	2,32 ^a
Machos	0	0	0	1,48 ^b	2,70 ^b	3,61 ^b	4,41 ^b
General	0	0	0	1,05...	2,06...	2,76...	3,87...

Está demostrado que mediante la inyección intraperitoneal de varias sustancias irritantes, como el adyuvante de Freund y el aceite mineral se producen tumores de células plasmáticas en ratones (6), los cuales han sido empleados para producir AcM usando la técnica del hibridoma (7). Sin embargo, si el tumor formado por el hibridoma crece como una masa sólida, entonces el AcM sólo estará presente en la sangre del ratón, con la desventaja de que únicamente se pueden recuperar entre 0,5 y 1 mL de suero, con un rango de concentraciones entre 5 y 15 mg/mL (8). Esta situación trae consigo serios inconvenientes durante la producción industrial de líquido ascítico, ya que se desean obtener cantidades importantes de AcM y los animales que presentan los tumores en forma sólida deben ser desechados de la producción, provocando pérdidas económicas proporcionales a la magnitud de la afectación en la masa animal.

Se observa la incidencia (%) de los tumores por sexos, comprobando la existencia de diferencias significativas ($p < 0,05$) entre hembras y machos, con mayores valores en los últimos (2,32% y 4,41%, respectivamente). Estas diferencias pueden ser debidas a factores hormonales propios del sexo; sin embargo, en la literatura no existen reportes anteriores con relación a este aspecto.

Este hallazgo reviste una gran importancia, ya que la utilización de machos para la producción industrial de líquido ascítico resulta más económica que el uso de hembras, debido a que las últimas, por las características propias de su curva de crecimiento [9], necesitan 4 semanas más para alcanzar un peso similar al de los machos; sin embargo como se aprecia en la Tabla, los tumores sólidos afectan más comúnmente a los machos, provocando disminución en la producción de líquido ascítico.

Teniendo en cuenta que durante el proceso productivo de líquido ascítico rico en AcM a escala industrial no existen diferencias significativas, en cuanto al volumen producido ni en la concentración de anticuerpos entre ambos sexos (10) y a pesar de que los machos presentan un 2,09% más de incidencia de tumores sólidos que las hembras; resulta factible, desde el punto de vista económico el uso de este sexo, debido a su mayor precocidad, lo cual compensa las pérdidas que se producen por los tumores.

En la Figura 1 se puede apreciar la incidencia de tumores por hibridoma, detectando diferencias significativas ($p < 0,05$) entre los tres grupos, con el mayor valor para CB-HEP.1 (3,87%), seguido de ior t1 (1%) y de ior r3 (0,3%). Esto demuestra que los tumores sólidos pueden ser propagados por la inyección intraperitoneal de sustancias irritantes que actúan como estimulantes del sistema retículo endotelial (incluyendo monocitos/macrófagos), sin embargo, su frecuencia de aparición depende del hibridoma en cuestión (11).

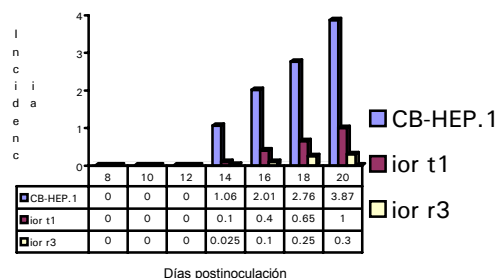


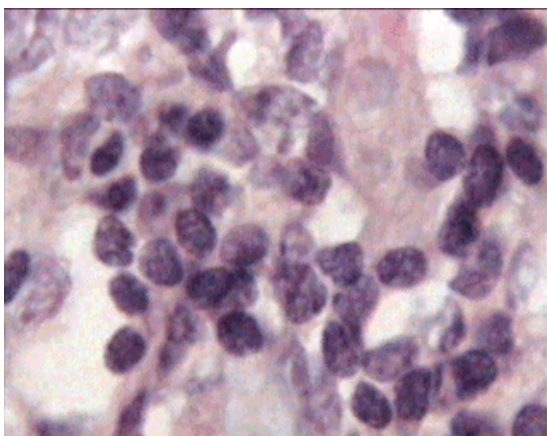
Figura 1. Incidencia de tumores sólidos por hibridoma.

Para evitar la producción de estos tumores se ha propuesto ajustar la concentración de células de hibridoma a inocular para lograr un balance entre la no producción de grandes masas sólidas asociadas a la ascitis y el mayor prendimiento posible, teniendo en cuenta que cada hibridoma puede manifestar características especiales (12).

Al realizar el estudio anatomopatológico de los ratones se comprobó la presencia en la cavidad abdominal de múltiples masas tumorales adheridas al peritoneo, de consistencia sólida, cuyo tamaño osciló entre 1 y 5 cm de diámetro. Microscópicamente estas formaciones se clasificaron como mieloma múltiple (mieloma de células plasmáticas), en las que se apreció el acúmulo anormal de estas células. En la mayoría de los casos las células neoplásicas parecieron células plasmáticas maduras de aspecto normal, pero pudo observarse toda la gama de inmadurez desde células muy indiferenciadas semejantes a precursores linfoides, hasta formas intermedias entre linfocitos y células plasmáticas (Figura 2) (13, 14).

Con el desarrollo de este estudio se demostró que el 3,4% de los ratones estudiados desarrolló tumores sólidos en el proceso de producción de ascitis, los cuales aparecen significativamente con mayor frecuencia en los machos (4,4%) que en las hembras (2,3%). Estas formaciones se clasifican anatomopatológicamente como mielomas múltiples y su incidencia depende del hibridoma inoculado a los ratones.

Figura 2. Mieloma múltiple (mieloma de células plasmáticas), en las que se observa toda la gama de inmadurez, desde células muy indiferenciadas semejantes a precursores linfoides hasta formas intermedias entre linfocitos y células plasmáticas. Hematoxilina Eosina.



Referencias

1. Ortiz E., Alvarez DM., Riverón L., Frías M. Influencia del sexo y el peso de ratones BALB/c en la obtención de Anticuerpos Monoclonales. *Revista Salud Animal*. 1996; 18: 83-85.
2. Perryman LE., Mason PH. Production of Monoclonal Antibodies in Horses. *Monoclonal Antibody. Current Protocols in Immunology*. 1995, 1:45.

3. Abbas AK., Lichtman, AH and Pober JS. Anticuerpos y Antígenos. Capítulo 3 en: *Inmunología Celular y Molecular*. Segunda Edición. Madrid. Interamericana. McGraw-Hill 1995:38-71.
4. Statistical Package Scientific System, SPSS for Windows, Released 5.0.1, License # 651544. October 9, 1992. SPSS Inc.
5. Sinkovics JG., Dreesman GR. Monoclonal antibodies of hybridomas. *Review of Infectious Diseases*. 1983; 18:9-34.
6. Potter M., Robertson CL. Development of plasma-cell neoplasm in BALB/c mice after intraperitoneal injection of paraffin-oil adjuvant, heat-killed *Staphylococcus* mixture. *J. Nat. Cancer Inst.* 1960; 25:847-861.
7. Mc Guill, MW.; Rowan AN.. Refinement of Monoclonal Antibody Production and Animal Well-being. *ILAR NEWS*. 1989; 31:7-11.
8. Gavilondo J. Aspectos básicos y avances recientes en la tecnología de producción de Anticuerpos Monoclonales. *Interferón y Biotecnología*. 1987; 4:1-16.
9. IFFA CREDO. Animaux de Laboratories. Institute Francais de la Fievre aphteuse-Centre de recherche et d'élevage du domaine des oncins Lyon, France. 1986.
10. Fuentes D., González R., Arroyo R. Influencia del sexo y la edad de ratones BALB/c en la producción de líquido ascítico rico en Anticuerpos Monoclonales. *Revista Salud Animal*. 2002; 23:62-64.
11. Gavilondo J.V. *Anticuerpos Monoclonales*. Ciudad de la Habana. Editorial Elfos Scientiae. 1995.
12. Castillo R. y Gavilondo JV. Producción *in vivo* de Anticuerpos Monoclonales. En: Curso postcongreso Tecnología de Obtención y Producción de Anticuerpos Monoclonales Murinos. La Habana, 1989.
13. Robbins SL., Cotrans RS. Patología estructural y funcional. Segunda parte. Tercera Edición. Edición Revolucionaria .1988.
14. Rowlatt C., Chesterman FC. Tumours of the intestines and peritoneum. In: Turusov, V.S., ed., *Pathology of tumours in Laboratory Animals Vol. 2 (Tumours of the mouse)*, International Agency for Research on Cancer, Lyon. 1990: 169-192.

A Study of Solid Tumors developed by mice during the production of Monoclonal Antibodies

Abstract

Mice are one of the most important elements in the production of ascitic fluid. Solid tumors can occur during this process. The objective of this work was to characterize such tumors, in order to predict their effect on production. The information used, was obtained from the study of 12 250 animals, both males and females, grouped into 12 production batches of CB-HEP.1, ior r3 and ior t1 hybridomas. The time of tumor emergence, the incidence by sex and hybridoma type, as well as their anatomopathological characteristics were determined. Tumors were evident starting on day 14th after the inoculation, affecting 3.4% of mice by the 20th day post-inoculation. There were significant differences ($p < 0.05$) between sexes (4.4% males and 2.3% females). In addition, a higher solid tumor incidence (3.87%) was detected with the CB-HEP.1 hybridoma. The histological analysis showed a plasmatic cell dyscrasia.

Key words: Mice, ascitis production, solid tumors.