



**UNIVERSIDAD DE ORIENTE
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES
CENTRO DE ESTUDIOS DE BIOTECNOLOGÍA INDUSTRIAL**

**“Obtención de un reactivo monoclonal
anti-D *in vitro*”**

**Tesis en Opción al Título Académico de Máster en Biotecnología.
Mención Biotecnología Industrial**

Autora: Lic. Geisa Abijana Lora

**Tutores: Dr.C René Antonio Rivero Jiménez
MSc. Irasema Pérez Portuondo**

**Santiago de Cuba
2011**

“La ciencia es el alma de la prosperidad de las naciones y la fuente de todo progreso”

Louis Pasteur

A mis padres, por haberme guiado siempre en el camino del saber y en mi
formación como profesional.

A mi esposo por su apoyo incondicional.

A mi hijito querido.

A todos mis amigos.

A mis tutores, por su apoyo, y su elevada profesionalidad.

A Lic. Diana Barbón, por su ayuda en el CIM.

A mis compañeros del Grupo de Fermentación y Producción de Inóculos, de Control de Calidad, de Purificación, de Productos Terminados y a todos aquellos que de una forma u otra me han apoyado y soportado en LABEX-CIM.

A la Lic. Reina García y a la Dra. Amparo Macías Mirabal por su ayuda incondicional en momentos decisivos.

Al claustro de profesores de la Maestría de Biotecnología, así como a los trabajadores del CEBI.

A todos, muchas gracias.

GLOSARIO.

AcM: Anticuerpo Monoclonal

IHI: Instituto de Hematología e Inmunología.

CIM: Centro de Inmunología molecular.

LABEX: Laboratorios de Anticuerpos y Biomodelos Experimentales.

CECMED: Centro para el Control Estatal de la Calidad de los Medicamentos.

FDA: Food and Drug Administration. (Órgano regulatorio internacional USA).

SNC: Sobrenadante de cultivo.

Rh: Complejo proteico presente en la membrana de los eritrocitos.

Rh D: Antígeno D del sistema Rh.

Fenotipo D^U: Expresión débil del antígeno Rh_o (D).

IgM: Inmunoglobulina IgM.

IgG: Inmunoglobulina IgG.

PBS: Buffer fosfato salino.

BSA: Suero Albúmina Bovina.

SFB: Suero Fetal Bovino.

ELISA: "*Enzyme-linked ImmunoSorbent Assay*" (Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas).

PNO: Procedimientos Normalizados de Operación.

Avidez: Tiempo que media entre la mezcla del reactivo con los eritrocitos y la aparición de la aglutinación.

Potencia: Es el recíproco de la mayor dilución del reactivo que provoca una reacción de aglutinación de 1+.

Especificidad: Capacidad del producto para identificar correctamente las muestras del antígeno en cuestión.

Intensidad: Grado de aglutinación al minuto de haber mezclado el reactivo y la suspensión de hematíes.

RESUMEN

La producción de antisueros policlonales anti-Rh (D) para la tipificación de sangre es una tarea muy laboriosa y depende de seres humanos sensibilizados que actúan como donantes. Para la obtención del reactivo monoclonal anti-D *in vitro*, se obtuvieron en frascos de cultivo estándar sobrenadantes de dos líneas celulares: la HM-92 secretora de IgM, y la D-90/17 secretora de IgG, y se caracterizaron biológicamente la cinética de crecimiento y los sobrenadantes obtenidos, mediante la determinación de potencia, intensidad y avidéz de la reacción de hemaglutinación frente a un panel de eritrocitos D +, D^U y D -. Los resultados revelaron títulos de 256 y 512 frente a eritrocitos D +; 512 y 1024, frente a D^U y una avidéz entre 6 y 8 segundos con intensidad de 4+, para los sobrenadantes IgM e IgG, respectivamente. Se realizaron tres formulaciones con diferentes tipos de preparación de buffer para obtener el mejor candidato de formulación mediante potencia y prueba del D^U. Para la preparación del reactivo final (mezcla IgG + IgM), se comparó con un reactivo de referencia (CENTIS Diagnósticos) y se calculó la dilución óptima de anticuerpos que cumplieran con un avidéz entre 6 y 7 segundos y una intensidad de 3+. Finalmente se prepararon tres lotes “cero” con las especificaciones de calidad de la OMS y el CECMED, y se obtuvo el producto *ior Hemo-CIM anti-D* por primera vez en Cuba. Se realizó una evaluación económica donde se mostraron las ventajas de obtener el producto bajo las condiciones ensayadas.

ABSTRACT

Polyclonal anti-Rh (D) production for blood typing is very laborious and depends on human beings aware that act as donors. To obtain a monoclonal anti-D reagent *in vitro*, were obtained in standard culture flasks supernatants of two cell lines: the HM-92 secreting IgM and IgG secreting D-90/17, were characterized biologically kinetics growth and the supernatants obtained by determining the power, intensity and avidity of the hemagglutination reaction against a panel of D + red cells, D^U and D -. The results revealed 256 and 512 titles compared to D + red cells, 512 and 1024, compared with D^U and avidity between 6 and 8 seconds with an intensity of 4+, for IgM and IgG supernatants, respectively. Three formulations were made with different types of preparation of buffer to obtain the best candidate formulation and testing of power by D^U. To prepare the final reagent (mixed IgG + IgM) was compared with a reference reagent (CENTIS Diagnostics) and calculated the optimal dilution of antibody avidity comply with 6 to 7 seconds and an intensity of 3+. Finally, three "zero" batches were prepared with the quality specifications of the WHO and CECMED, and the product *ior Hemo-CIM anti-D* was obtain for the first time in Cuba. Economic evaluation was performed which showed the benefits of getting the product under test conditions.

INDICE

Capítulos	Páginas
I. Introducción	1
II. Revisión bibliográfica	4
II.1. Antígeno Rh D	4
II.1.2 Bases moleculares	5
II.1.3 Clasificación	7
II.1.4 Fenotipos D débiles y D parciales	8
II.2 Anticuerpos Monoclonales	9
II.2.1 Formas de obtención de los Anticuerpos Monoclonales	9
II.2.2 Medios de Cultivo	11
II.2.3 Cinética de crecimiento	12
II.2.4 Anticuerpos Monoclonales hemoclasificadores	15
III. Material y Métodos	19
III.1 Líneas celulares	19
III.2 Medio de cultivo	19
III.3 Condiciones de cultivo	19
III.4 Ensayo de la Cinética de crecimiento	20
III.5 Obtención de los sobrenadantes de los lotes productivos	20
III.6 Técnicas Analíticas	21
III.6.1 Determinación de la viabilidad y concentraciones celulares	21
III.6.2 Concentración de proteínas específicas.	21
III.6.3 Criterio de Pureza.	22
III.6.4 Evaluación actividad biológica	23
III.6.4.1 Sobrenadante de cultivo anti-D y anti-D ^U	23
III.6.4.2 Formulado y Producto Terminado	25
III.7 Ensayo de Formulación	25
III.8 Producto Terminado	26
III.9 Propuesta de escalado del proceso productivo	26

Capítulos	Páginas
IV. Resultados y Discusión	27
IV.1 Cinética de Crecimiento	27
IV.2 Caracterización de los sobrenadantes de cultivo de los lotes productivo	29
IV.3 Formulación	32
IV.4 Producto Terminado	33
IV.5 Propuesta de escalado del proceso productivo	34
V. Conclusiones	38
VI. Recomendaciones	39
Bibliografía	40
Anexos	

I. INTRODUCCIÓN

Si bien conseguir la excelencia es meta de todas las especialidades médicas, la medicina transfusional ha sido una de las que más medidas ha adoptado en los últimos años para lograrla. Ello se debe a que esta especialidad se sitúa en el punto de mira de la sociedad en general y a que las transfusiones sanguíneas siguen presentando riesgos, aunque sean mínimos, para la salud de los receptores. Desde que comenzó la pandemia de SIDA a mediados de los años ochenta, muchos aspectos de la práctica de la especialidad han sido sometidos a un control exhaustivo¹.

Desde su descubrimiento hacia finales del siglo XX, los anticuerpos han sido considerados moléculas con una enorme potencialidad analítica debido a su exquisita especificidad. Pero fue solo después de la introducción por Köhler y Milstein en 1975 de la técnica para producir *in vitro* anticuerpos con una especificidad predeterminada, que éstos reactivos pusieron de manifiesto su tremenda versatilidad práctica. La posibilidad de producirlos en grandes cantidades y en forma pura y además el estar bien caracterizados, ha permitido que los anticuerpos monoclonales sean objeto de múltiples aplicaciones. Las más tempranas, a fines de los años setenta y principios de los ochenta, se relacionaron con pruebas de histocompatibilidad y reconocimiento de moléculas de diferenciación en células normales o tumorales y con el reconocimiento de epítomos específicos en virus, bacterias y otros microorganismos, etc. Ello redundó en un conocimiento más detallado de distintas subpoblaciones celulares, de los diferentes estadios de diferenciación celular en diversos tejidos, en un mejor tipaje celular, en una mejor identificación de microorganismos y de sus variedades tanto para diagnóstico como para epidemiología^{2,3,4}.

Las dos clasificaciones más importantes para describir grupos sanguíneos en humanos se sustentan en los antígenos A y B, y en el factor Rh.

El grupo sanguíneo Rh constituye el sistema de hemoclasificación más importante en la medicina transfusional después del sistema ABO y es uno de los grupos sanguíneos humanos más complejos⁵.

Desde hace casi 20 años los reactivos utilizados en la tipificación sanguínea son de tipo monoclonal. Para el reconocimiento de antígenos eritrocitarios conformados por carbohidratos, como los del sistema ABO, los anticuerpos monoclonales se obtienen a través de hibridomas logrados de la fusión de células linfoides B de ratón sensibilizado y líneas celulares especiales de mieloma de ratón. Sin embargo, la producción de anticuerpos contra los antígenos del sistema Rh no puede ser obtenida por esta vía, porque el ratón no es capaz de discriminar los epítopes específicos de dicho sistema. De ahí que inicialmente se fuera incursionando en la “inmortalización” de linfocitos B de individuos sensibilizados para lograr clones específicos⁶.

La optimización de la medicina transfusional en el mundo y en el país ha solicitado del desarrollo de la biotecnología la introducción de técnicas de biología molecular en la detección de antígeno Rho (D)¹.

El reactivo hemoclasificador anti-Rh es ampliamente usado en bancos de sangre y laboratorios clínicos para la evaluación cualitativa de la hemorragia feto materna, detección de antígenos débiles y en la tipificación del antígeno D eritrocitario como prueba pre-transfusional de cabecera. Debido a que en el mundo se utilizan reactivos monoclonales (de mayor calidad que los reactivos policlonales) para estos fines surge la necesidad imperiosa de disponer de dicho reactivo de producción nacional. En nuestro país existe una producción de antisueros policlonales anti-Rh (D) por parte de los Bancos de Sangre, y la mayor o principal dificultad para obtener éstos reactivos es que se producen a partir de donantes humanos inmunizados, que por lo general, no detectan determinadas expresiones parciales del antígeno D y que sus producciones no están normalizadas a nivel nacional^{7,8}.

La tecnología de producción de AcM *in vitro* es privativa de países de primer mundo y en Cuba cuentan con ella pocos centros del polo científico del oeste de La Habana. LABEX al contar con Licencia de Producción para producir dichos reactivos y con el personal capacitado, recursos materiales e instalaciones, se da a la tarea de demostrar que es una alternativa *in vitro* para la producción de este hemoclasificador ya que se obtienen sobrenadantes con mayores volúmenes y títulos de anticuerpos.

El presente trabajo resulta de gran aplicación en el Sistema Nacional de Salud, en la tipificación de la sangre y en el programa de Sangre Segura del MINSAP.

Tomando en consideración los elementos planteados anteriormente se formuló el siguiente problema:

Cuba no cuenta con un reactivo hemoclasificador monoclonal anti-Rh₀ (D) de producción nacional normalizado y registrado ante el CECMED.

La demanda actual del reactivo hemoclasificador según Sistema Rh supera las 4 200 000 determinaciones anuales en el país. La misma se satisface a través de sueros policlonales de origen humano producidos en Bancos de Sangre y mediante la compra del reactivo en el exterior.

En función de este problema se formuló la siguiente hipótesis de trabajo:

“Es posible desarrollar un proceso productivo de un hemoclasificador anti-D monoclonal cubano *in vitro* cuyo desempeño cumpla los requisitos regulatorios vigentes”.

Con la finalidad de dar respuesta a esta hipótesis de trabajo, se propuso como objetivo general:

- Diseñar un proceso productivo de un reactivo hemoclasificador anti-D, por la tecnología de AcM *in vitro* que permita satisfacer la demanda nacional y que cumpla con los requisitos regulatorios del producto.

Para su cumplimiento se trazaron los objetivos específicos siguientes:

1. Caracterizar la cinética de crecimiento de las líneas celulares implicadas en el desarrollo del reactivo hemoclasificador anti-D.
2. Caracterizar los sobrenadantes de cultivo obtenidos a partir de las líneas celulares implicadas en el desarrollo del reactivo hemoclasificador anti-D.
3. Diseñar una formulación para el reactivo hemoclasificador anti-D que cumpla con las regulaciones vigentes.
4. Mostrar las ventajas desde el punto de vista económico de la producción del hemoclasificador anti-D.

II. REVISION BIBLIOGRAFICA

II.1 Antígeno Rh D

El antígeno RhD descrito por primera vez en 1939, es superado solamente en importancia por los antígenos del grupo ABO⁷. Este fue el segundo gran hallazgo en inmunohematología después del descubrimiento de los grupos sanguíneos ABO⁹.

La terminología Rh se deriva de la contracción de la palabra Rhesus. Cuando comenzaron a caracterizar las primeras reacciones transfusionales entre donantes y receptores humanos se pensó que la misma coincidía con el rechazo que se observaba en varios sueros animales al ser enfrentados con eritrocitos procedentes de la sangre del mono Rhesus. Debido a esta confusión se denominó erróneamente este antígeno como Factor Rhesus^{10,11}.

El complejo Rh se expresa como un complejo proteico en la superficie de los eritrocitos (a diferencia del sistema ABO, cuyos determinantes antigénicos son carbohidratos) y posee varios antígenos con capacidad inmunogénica. Entre estos se destaca el antígeno RhD. El antígeno D es el producto de la expresión del gen RHD, el cual posee una cantidad de variantes alélicas que en la actualidad se encuentran por decenas y que, desde el punto de vista clínico tienen importancia^{5,11,12}.

La raza humana se divide en, los que poseen el antígeno Rh (Rh positivo) y los que no (Rh negativo). Posteriormente, Fisher y Race publicaron en su trabajo sobre los antígenos Rh, la propuesta de la nomenclatura del CDE del grupo de sistema sanguíneo Rh¹⁰. El antígeno principal en el grupo sanguíneo Rh es el antígeno "D" expresado por la proteína D del Rh. Dependiendo del grupo étnico alrededor del 3 % al 25 % de la población humana carece de antígeno Rh D. Al mismo tiempo se detectó el antígeno D débil, y se le llamó antígeno D^U. La diferencia entre D y el antígeno D^U es que este último es débilmente inmunogénico y difícil de detectar. Alrededor del 0,2 % al 1 % de los individuos blancos llevan antígeno D débil⁹. Otros, en cambio, presentan una variación cualitativa en la expresión de dicho antígeno, denominados como D parcial. Dentro de este grupo se encuentra la categoría D^{VI}, caracterizada por poseer una mínima cantidad de epítopes¹⁰.

Aproximadamente el 15 % de los individuos de raza blanca y el 8 % de los individuos de raza negra carecen del antígeno D y son fácilmente estimulados cuando reciben este antígeno, ya sea por transfusión o durante el parto, produciendo anti-D^{10,13}.

II.1.2 Bases Moleculares

El locus *RH* está compuesto por dos genes estructurales y adyacentes denominados *RHD* y *RHCE* que codifican dos proteínas transmembranales del eritrocito, RhD y RhCcEe respectivamente. Estos genes están formados por 10 exones cada uno y presentan un alto grado de homología. Poseen una longitud de 60 kb^{14,15,16}, se encuentran uno a continuación del otro direccionalmente enfrentados y están separados por un segmento de ADN de 30000 kb solamente. Las proteínas que codifican (RhD y RhCE respectivamente) poseen la misma longitud de 417 aminoácidos. En dependencia de los alelos presentes RhD y RhCE difieren en unos 32 a 35 aminoácidos que se hayan dispersos a lo largo de la cadena polipeptídica^{17,18,19}. De estos solamente 7 aminoácidos están presentes en la región extracelular de la proteína, pero distribuidos en diferentes lazos, afectando diferentes posiciones entre ambas. Los monómeros RhD y RhCcEe se expresan como una proteína integral de membrana la cual posee 12 segmentos (hélices) transmembrana y 6 lazos extracelulares por lo que un número restringido de aminoácidos son los que están comprometidos con las regiones de reconocimiento de los anticuerpos anti-D^{20,21,22} (Figura 1).

D parcial: La estructura del locus génico RH favorece fuertemente la generación de alelos híbridos de los tipos RHD-CE-D y RHCE-D-CE a partir de los genes RHD y RHCE. Se han descrito más de 20 alelos D parciales y el tamaño de los segmentos en las variantes alélicas oscilan desde unas pocas pares de bases hasta más de 10000. Esta variante fenotípica no presenta un patrón único y está mayormente definida por los lazos extracelulares de la proteína, resultando en 8 grupos fenotípicos diferentes descritos. Más de 10 variantes D parciales están causadas por mutaciones simples con cambio de sentido localizadas en los lazos

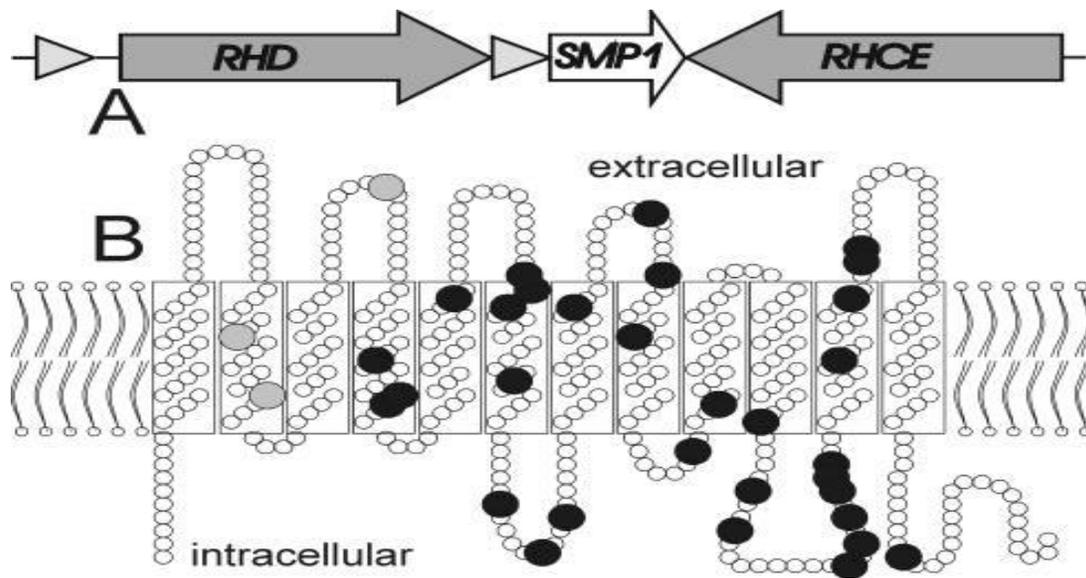


Figura 1. Estructura del locus génico RH y de la proteína Rh.

(A) El locus génico RH se encuentra ubicado en el brazo corto del cromosoma 1. Los dos genes RH, *RHD* y *RHCE*, tienen orientaciones opuestas y se enfrentan uno al otro por sus extremos 3'. Un tercer gen, *SMP1*, está ubicado entre *RHD* y *RHCE*. El gen *RHD* está enmarcado por dos regiones altamente homólogas llamadas cajas *Rhesus* (triángulos grises) con una orientación idéntica.

(B) La proteína RhD en la membrana del eritrocito. Las posiciones de los aminoácidos que difieren entre la proteína RhD y la proteína RhCE del alelo C están dispersas a través de la proteína (círculos negros y grises). Si la proteína RhCE procede del alelo C hay tres posiciones de aminoácido que no difieren con la proteína RhD (círculos grises). La proteína Rh forma 12 hélices transmembranas y 6 lazos extracelulares. Solamente los lazos extracelulares 3, 4, y 6 contienen aminoácidos que difieren entre C y D.

extracelulares. Los fenotipos de estos D parciales son muchos más diversos que los fenotipos originados por conversión génica y están determinados por la localización y el tipo de sustitución. Generalmente resultan afectados menos epítopes que en aquellos D parciales originados por conversión génica. Varios D parciales comprenden sustituciones de aminoácidos dispersas por la proteína. Estos son frecuentemente difíciles de discriminar por métodos serológicos, incluyendo la detección con anticuerpos monoclonales, por lo que provocan problemas en el diagnóstico clínico^{5,11,14}. La lista de variantes alélicas que conforman los fenotipos con expresión normal, parcial, débil o negativo se actualizan regularmente y las mismas pueden encontrarse en el sitio web "Rhesus Base"²³. En el caso de la variante fenotípica D débil las variantes alélicas se han distribuido en 8 grupos, los alelos de un mismo grupo afectan los mismos lazos extracelulares de la proteína y muestran resultados similares en las pruebas serológicas^{15,16,22}.

D débil: La mayoría de las publicaciones sobre variantes D débiles o D^w (conocidas antiguamente como D^u) refieren mutaciones con cambio de sentido en sus alelos RHD. Más de 20 variantes fenotípicas de D^w han sido encontradas. Al contrario de lo que ocurre con la variante D parcial, las mutaciones con cambio de sentido se encuentran exclusivamente localizadas en las regiones transmembrana e intracelular de la proteína²² (Figura 2). Muchas de estas mutaciones provocan una depresión de la expresión génica o los nuevos aminoácidos sustituyentes dificultan la correcta inserción de la proteína en la membrana trayendo consigo un bajo nivel de expresión del antígeno en la superficie. Los individuos D^w pueden ser falsamente caracterizados como D (-) si no se emplean reactivos con alta capacidad de reconocimiento al aplicar métodos serológicos^{5,11,14}. Esto trae consigo que erróneamente se les recomiende transfusiones de sangre Rh D (-) la que es relativamente escasa. Existen variantes extremas del fenotipo D^w donde el nivel de expresión del antígeno RhD es muy bajo, como es el caso de la variante D_{el} en las cuales el número de sitios antigénicos en la membrana del eritrocito no sobrepasa los 30 cuando normalmente el número sobrepasa los 4000¹⁶. No obstante son capaces de generar respuesta anti-D en receptores transfusionales RhD (-)^{18,24,25}.

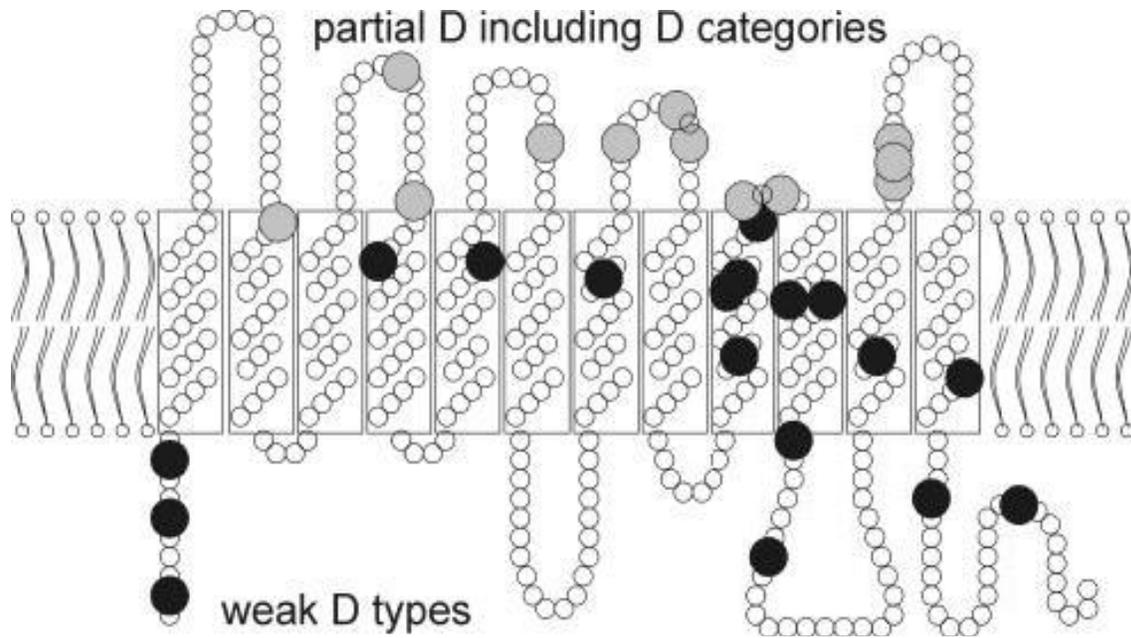


Figura 2. Expresión de alelos aberrantes con mutaciones puntuales con cambio de sentido.

Las posiciones de los aminoácidos afectadas en el fenotipo D^w se muestran en círculos negros, aquellas afectadas en la variante D parcial, incluyendo variantes de la categoría D se muestran en círculos grises. Las sustituciones de aminoácidos en el D^w están localizadas en los segmentos de proteína transmembrana e intracelular, mientras los localizados en el D parcial están localizados en los lazos extracelulares.

El sistema Rh presenta un gran interés clínico en obstetricia y medicina transfusional debido a la participación de sus aloanticuerpos en la destrucción inmune de los eritrocitos^{17,26}.

La transfusión de sangre RhD positiva a un receptor RhD negativo puede resultar en una producción de Anti-D, por lo que determinar correctamente el grupo Rh es fundamental para una práctica transfusional segura^{7,27,28}.

II.1.3 Clasificación

El sistema Rh es el grupo sanguíneo más complejo y polimórfico de la membrana del glóbulo rojo; es importante en la transfusión y de la medicina clínica, ya que está involucrado en la enfermedad hemolítica del recién nacido, reacciones transfusiones, enfermedades autoinmunes anemias hemolíticas, y de reacciones hemolíticas no inmunes de origen^{8,14,29}. Está compuesto por más de 49 antígenos definidos por métodos serológicos siendo los más importantes D, C, c, E y e. Estos antígenos pueden presentar alteraciones en su expresión dando origen a fenotipos débiles, parciales o delecionados, como productos de las variantes alélicas de los genes RH y que, desde el punto de vista clínico pueden agruparse en los grupos siguientes¹⁷.

Grupo RhD débil: Pertenecen a este grupo aquellos individuos cuyos eritrocitos expresan variantes alélicas del antígeno D, las que provocan un nivel de expresión menor a los del grupo Rh D (+). En este el número de sitios de expresión por célula sobrepasan los 4000, mientras en los casos más drásticos del grupo Rh-D débil el número de sitios de expresión puede no rebasar los 30. Eritrocitos Rh-D débiles pueden ser falsamente clasificados como Rh-D (-), por lo que al ser transfundidos en individuos Rh-D (-) pueden provocar reacciones transfusionales^{9,30,31}.

Grupo Rh-D parcial: Pertenecen a este grupo aquellos individuos cuyos eritrocitos expresan variantes alélicas del antígeno D, las cuales pueden ser reconocidas como Rh-D (+), no obstante, si un individuo Rh-D parcial recibe una transfusión de sangre Rh-D (+) reaccionará anticuerpos contra los antígenos Rh-D del donante provocando una reacción transfusional^{30,31}.

II.1.4 FENOTIPOS D DEBILES Y D PARCIALES

Desde 1946, *Stratton* describió la existencia de hematíes que reaccionaban más débilmente con los antisueros anti-Rh (D) que las células D *normales* y les llamó hematíes D^U, (actualmente D débiles) el primer problema era si se debía designar a un fenotipo D^U como Rh o Rh - y surgieron los términos *alto grado* y *bajo grado*, para la clasificación serológica de los fenotipos D^U. Ya en 1953²⁴ se describió el primer ejemplo inequívoco de una aloinmunización anti-D en un individuo D positivo, y a partir de este momento, se reconoció que los hematíes de ciertas personas pueden carecer de porciones del *mosaico* D, y estos individuos podrían resultar inmunizados contra epítopes del antígeno D que ellos no poseen. Las células D^U podrían tener todos los epítopes del antígeno D normal, pero en una densidad más baja o podrían ser tanto cualitativa como cuantitativamente diferentes del D normal, y de ser así, se designan como D parcial. En 1992, el D^U fue renombrado como "débil" D " (premio Nobel en el 2003 a Peter Agre y colegas)³². Hoy se sabe, gracias a los AcM, que el antígeno D cuenta con más de 30 epítopes. Dos grupos de investigadores han categorizado a los hematíes con antígenos D parciales (variantes de D): *Wiener* y *Unger*, que los clasificaron como RhA, RhB, RhC, RhD, y *Tippett* y *Sanger* que los clasificaron en categorías I-VI, pero ahora se excluye la categoría D^I, y se incluyen la categoría D^{VII} y otras como la DFR, DBT, R0Har, HMI y HMii. Ambos estudios visualizan al antígeno D como una estructura tipo mosaico con fenotipos parciales de D que carecen de una o más partes del mosaico D normal. Es probable que los fenotipos D parciales sean más frecuentes en los individuos de la raza negra que en otras poblaciones, en otros países, del 5 al 10 % de los D^U son D parciales (variantes de D)^{7,22}.

En Cuba la incidencia de fenotipos D parciales no se conoce con exactitud, sin embargo, un ejemplo se encontró en un estudio realizado en 529 pacientes con anemia drepanocítica realizado en el Instituto de Hematología e Inmunología (IHI), donde se detectaron 2 individuos definidos como variantes de D con expresión *normal* del antígeno D en los hematíes y anticuerpos anti-D (aloinmunizados) en el suero. Estos resultados indicaron una incidencia de variantes de D del 0,37 % en este grupo de enfermos, 18 veces más elevada que la informada por investigadores

en los Estados Unidos de América, Australia, la región sudoeste de Inglaterra, Francia y Holanda, en estudios realizados en poblaciones de donantes no seleccionados. La incidencia de categorías de D en la población de donantes de Cuba es alta, si tenemos en cuenta que alrededor del 40 % de los donantes cubanos se clasifican como no blancos^{1,7,33}.

Otro dato que tiene relevancia desde el punto de vista transfusional, está dado por un estudio de embarazadas Rh-negativas, donde se encontró una frecuencia de aloinmunización contra el antígeno D del 4,6 %, en la cual se definió que las transfusiones de sangre fueron la primera causa de esta aloinmunización. La calidad de los reactivos disponibles no es lo suficientemente homogénea y no es capaz de detectar a las variantes parciales del antígeno D en la población de donantes D^U^{7,34,35}.

Sobre la incidencia de fenotipos D débiles y parciales se realizó un estudio en 4 339 donantes de sangre de Guanabacoa, y se encontró que el 0,11 % de fenotipos D débiles en los blancos y no se encontraron variantes D en este grupo racial; sin embargo, en los no blancos la frecuencia de D^U fue de 0,43 % y la de D parciales fue del 0,16 %. Se sabe que entre los individuos con fenotipos D parciales las expresiones más inmunogénicas son las categorías D^{IV}, D^V y D^{VII}, que son detectables como D positivos por los reactivos convencionales clase IgG, mientras que la categoría D^{VI} es la menos inmunogénica y esto provoca errores en la clasificación de estos donantes. Sólo poseen 3 epítopes (según el modelo de los 9 epítopes) de los identificados para el antígeno D^{7,33}.

II.2 Anticuerpos Monoclonales

II.2.1 Formas de obtención de los anticuerpos monoclonales

Si una sustancia extraña (un antígeno) se inyecta en el cuerpo de un ratón o un humano, alguna de las células B de su sistema inmune se transformará en células plasmáticas y empezarán a producir anticuerpos que se unirán a ese antígeno. Cada célula B produce un solo tipo de anticuerpo, pero diferentes linfocitos B producirán anticuerpos estructuralmente diferentes que se unen a distintas partes del antígeno. Esta mezcla fisiológica natural de anticuerpos es conocida como anticuerpos policlonales.

Para producir anticuerpos monoclonales, primero se extraen células B del bazo de un animal que ha sido expuesto al antígeno. Estas células B son fusionadas con células tumorales de mieloma múltiple (un tipo de cáncer) que pueden crecer indefinidamente en cultivo celular. Esta fusión hace a las membranas celulares más permeables. Estas células fusionadas híbridas, llamadas hibridomas pueden multiplicarse rápida e indefinidamente, puesto que son células tumorales después de todo y pueden producir gran cantidad de anticuerpos. Los hibridomas son suficientemente diluidos y cultivados para obtener un número diferente de determinadas colonias, las cuales producen sólo un tipo de anticuerpo. Los anticuerpos de diferentes colonias son analizados para conocer su capacidad de unirse a un antígeno determinado, por ejemplo con un tipo de test llamado ELISA, y para seleccionarse y aislarse de la manera más efectiva^{36,37,38}.

Se conoce la tecnología necesaria para la producción de anticuerpos en ausencia de inmunización del animal. Es la denominada tecnología de los anticuerpos recombinantes. Los avances en la tecnología génica han facilitado en gran medida la manipulación genética, producción, identificación y conjugación de fragmentos de anticuerpos recombinantes, obteniéndose nuevos anticuerpos multivalentes y multiespecíficos^{39,40,41}.

Los investigadores Niels K Jerne, Georges Köhler y César Milstein, describieron la técnica que permitía el cultivo de hibridomas o células híbridas de linfocitos B con células plasmáticas tumorales de mieloma múltiple. Con esta fusión de dos células, una programada para producir un anticuerpo específico pero que no se multiplica indefinidamente (linfocito) y otra inmortal con gran capacidad de crecimiento pero que no produce inmunoglobulina (célula de mieloma), se combina la información genética necesaria para la síntesis del anticuerpo deseado y una capacidad de síntesis proteica, permitiendo su multiplicación indefinida tanto *in vitro* como *in vivo*^{42,43}.

En el año 2010, los anticuerpos monoclonales han cumplido 30 años desde su invención dejando de ser una curiosidad biológica para ser una forma de tratamiento y diagnóstico muy importante en diversas enfermedades. Existen más de 17 anticuerpos monoclonales aprobados por la FDA, pero el número de

anticuerpos monoclonales en fase de ensayo clínico es elevado y representan un 30 por ciento de todos los compuestos en investigación en el 2005. Muy importante para tratamientos de distintas enfermedades como artritis reumatoide, distintos cánceres, enfermedad de Crohn, etc.

II.2.2 Medios de cultivo

Los medios de cultivo para células están diseñados para proporcionar un ambiente químico-físico óptimo para sustentar el crecimiento celular. A partir de los años 50 Harry Eagle, comenzó a desarrollar técnicas de cultivo en términos de medio de cultivo, obteniendo un medio basal mínimo Eagle's Minimum Elemental Medium (EMEM), con la reducción de un número de componentes definidos a concentraciones mínimas los cuales habían mostrado ser esenciales para el crecimiento⁴⁴. Suplementar este medio basal con suero, demostró ser importante desde el punto en que proveía factores indefinidos pero necesarios para el mantenimiento y desarrollo del cultivo. De ahí se desarrollaron otras formulaciones como Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM), Ham's F12 (F12), RPMI-1640, incluso combinaciones entre ellas como el DMEM/F12⁴⁵. Más tarde se desarrollaron estudios dirigidos a dar respuesta a interrogantes tales como el efecto de la concentración de nutrientes en el crecimiento y/o la producción, así como sobre el rendimiento biomasa/nutrientes o producto/nutrientes, todo lo cual se ha demostrado, varía de una línea celular a otra e incluso para la misma línea en sistemas de cultivo diferentes⁴⁶. Las formulaciones de los medios de cultivo se basan principalmente en una mezcla de nutrientes indispensables como son aminoácidos, vitaminas, lípidos, azúcares, sales inorgánicas, factores de crecimiento, entre otros aditivos. Las concentraciones de sales del medio hacen que el mismo sea isotónico y tenga aproximadamente una osmolaridad de 300 mOsm/kg lo cual es óptimo para la mayoría de las líneas celulares. Se incluye generalmente el bicarbonato de sodio como tampón en combinación con el CO₂ y el HEPES para un control más estricto permitiendo reducir el CO₂ al 2 %^{47,48}.

Resulta de suma importancia la naturaleza y concentración de las fuentes de carbono y nitrógeno pues afectan el balance energético y el metabolismo celular. En función de esto, las formulaciones de medios de cultivo contienen uno o más

carbohidratos como fuente de energía y carbono y un número de aminoácidos que satisfaga los requerimientos del crecimiento celular. El diseño de medios de cultivos que conlleven al uso más eficiente de los aminoácidos y la glucosa, así como a la disminución de los efectos tóxicos del lactato y el amonio¹⁹, ha sido el foco de numerosos trabajos en el campo del cultivo de células animales en los últimos años^{49,50,51}.

II.2.3 Cinética de crecimiento

Cuando se habla de la cinética se refiere a la velocidad con que ocurre la transformación que representa el proceso de fermentación y esta se obtiene determinando experimentalmente la concentración de cada componente deseado en diferentes tiempos del proceso.

Esquemáticamente, se pueden distinguir bien las distintas fases del crecimiento celular en un proceso de fermentación con un modo de operación del tipo discontinuo o en templa (batch) (Figura 3).

Fase de adaptación o Lag: Se produce inmediatamente después de la inoculación. La célula se adaptan a las nuevas condiciones de cultivo, existe aumento de tamaño de la célula pero no hay división. Esta es una fase no productiva, por eso afecta la productividad del proceso. Esta fase depende mucho de las condiciones ambientales en que antes estaban las células. En esta fase $\mu = 0$; donde μ es la velocidad específica de crecimiento.

Fase exponencial: La célula crece a la máxima velocidad específica de crecimiento y es la etapa más importante del crecimiento desde el punto de vista tecnológico. Las condiciones de temperatura, pH y concentración de todos los nutrientes y productos deben ser óptimas para el crecimiento.

En esta fase $\mu = \mu_{max} = \text{constante}$ (Figura 4).

Fase de aceleración negativa: En esta fase continúa el crecimiento pero la velocidad específica disminuye respecto a la que existía en la fase logarítmica. También se conoce como fase de limitación. Las causas por las cuales se alcanza esta fase pueden ser varias; entre las posibles se encuentran la concentración baja

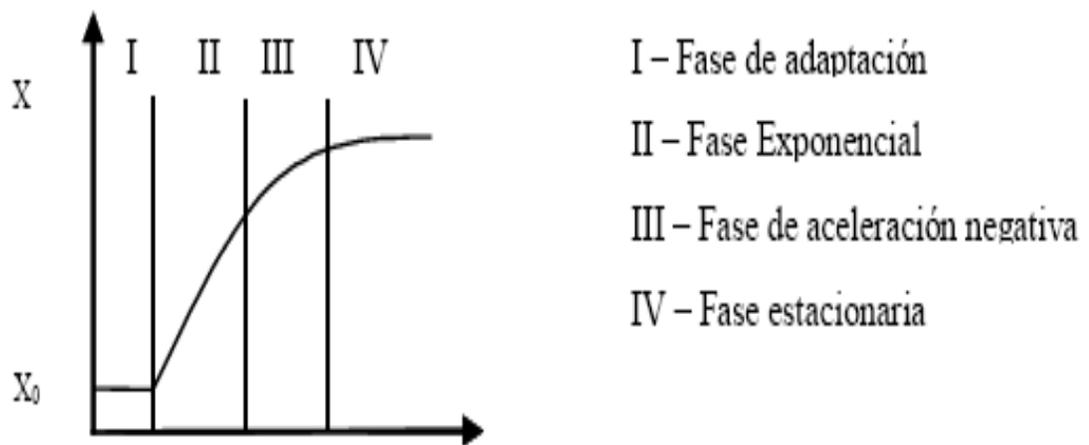


Figura 3. Fases de crecimiento en un proceso de fermentación en batch.

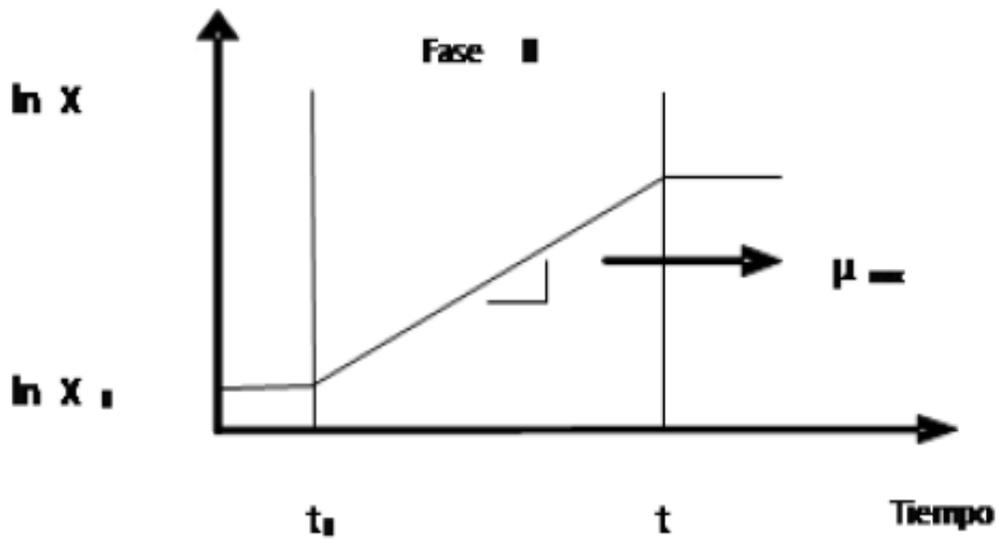


Figura 4. Grafico logarítmico en la fase exponencial.

de uno o varios nutrientes, la concentración elevada de algún producto tóxico. En esta fase $0 < \mu < \mu_{max}$

Fase estacionaria: No hay un crecimiento de la concentración celular, debido a condiciones desfavorables en el cultivo. Aquí se igualan las velocidades específicas de crecimiento y de muerte. Por lo tanto el número de células vivas permanece aproximadamente constante en el tiempo. En esta fase $\mu = 0$.

La velocidad específica de crecimiento (μ) es función de la concentración de células por unidad de volumen (X) y puede ser definida como:

$$\mu = \frac{dX}{Xdt} = d(\ln X)/dt$$

La expresión anterior representa matemáticamente la pendiente en cualquier punto de la curva del $\ln X$ contra el tiempo y se puede plantear además que en la fase Lag es aproximadamente igual a cero, en la fase de crecimiento exponencial se mantiene casi constante y aproximadamente igual a la μ_{max} (velocidad específica de crecimiento máxima), y en la fase estacionaria es aproximadamente igual a cero, e incluso puede tomar valores negativos⁵². Desde el punto de vista técnico-productivo las tres últimas fases son las más importantes.

El comportamiento cinético de una población está determinado por un conjunto de factores genéticos y ambientales. Entre estos últimos se destacan las condiciones de operación (composición del medio, temperatura, pH y otras) y la modalidad de cultivo, entre las que distinguimos el cultivo por lotes (discontinuo o en batch), el cultivo continuo, el cultivo incrementado⁵³.

Temperatura

Al igual que en las reacciones químicas, desempeña un papel fundamental en la cinética del proceso de fermentación⁵⁴. Las células que crecen a una temperatura inferior a la óptima tienen retardado su crecimiento y por tanto reducida la producción celular, es decir su productividad. Por otro lado, si la temperatura es demasiada alta, pero no letal, se puede inducir una respuesta de estrés al choque térmico con la consiguiente producción de proteasas celulares que ocasionan una

disminución en el rendimiento de los productos proteicos. La influencia de la temperatura en la mayoría de los casos es muy importante, por lo que se debe lograr su control durante el proceso de fermentación.

El pH

La mayoría de las células crecen a pH cercano a la neutralidad, entre 5 y 9, lo cual no excluye que existan células que puedan soportar valores de pH extremos y se desarrollen.

Las células regulan su pH interno mediante un sistema de transporte de protones que se encuentra en la membrana citoplasmática, que incluye una bomba de protones ATP dependiente. El intervalo de pH óptimo para el desarrollo de las células es estrecho debido a que frente a un pH externo muy desfavorable se requiere un gran consumo de energía para mantener el pH interno. La influencia del pH es muy importante, y debe lograrse su control durante el proceso de fermentación, pues en el crecimiento celular en un fermentador se liberan metabolitos celulares al medio que pueden ocasionar un cambio en el pH del mismo.

El control o método de pH constante se basa en la observación del cambio de pH cuando se agota el sustrato. Al agotarse éste, el pH comienza a aumentar, principalmente como resultado del incremento de la concentración en el número de iones de amonio excretado por las células⁵⁵. Tradicionalmente los procesos de fermentación en producciones biofarmacéuticas se desarrollan a un pH de $7,00 \pm 0,2$ como pH de ajuste; entre estas producciones encontramos el cultivo de células de mamíferos.

Concentración de nutrientes

Anteriormente se habló de la influencia que puede tener la cantidad de un nutriente en el medio de cultivo sobre la cinética de crecimiento de las células. La relación más simple entre la concentración de un sustrato (limitante desde el punto de vista cinético) y la velocidad específica de crecimiento viene dada por la ecuación de Monod

$$\mu = \mu_{max} \left(\frac{S}{K_s + S} \right)$$

Donde: μ_{max} : Velocidad específica de crecimiento máxima (h^{-1}); K_s : Constante de saturación (g/L), S : Concentración de sustrato (g/L).

μ_{max} y K_s son parámetros del sistema célula-sustrato, K_s representa la concentración de sustrato que corresponde a una velocidad específica igual a la mitad de la velocidad específica máxima; S representa la concentración del sustrato que limita el crecimiento. En la práctica este sustrato casi siempre es la fuente de carbono y energía, en ocasiones el oxígeno.

La ecuación de Monod describe el valor de la velocidad específica de crecimiento (μ) en las fases logarítmica y de limitación (aceleración negativa) cuando el resto de los factores ambientales (temperatura, pH y otros) no ejercen una influencia marcada sobre μ .

Cuando la concentración de sustrato es mucho mayor que K_s (en la ecuación de Monod), μ es aproximado a μ_{max} ⁵⁴.

También hay una constante de inhibición del sustrato (K_I), para altas concentraciones de sustrato, que corresponde a un valor de velocidad específico de crecimiento igual a la mitad de la velocidad específica máxima.

II.2.4 Anticuerpos Monoclonales Hemoclasificadores

La producción de antisueros policlonales confiables y de alta calidad para la tipificación de la sangre es una tarea muy laboriosa, que tarda tiempo y depende de la inmunización de seres humanos altruistas que actúan como donantes especialmente sensibilizados, para a partir de su sangre, obtener este tipo de reactivo. En este principio se basa la producción de reactivos hemoclasificadores en Cuba y otros países y el autoabastecimiento de este tipo de reactivos es esencial para el funcionamiento adecuado del Sistema Nacional de Salud. Sin embargo, hay muchas dificultades para obtener reactivos policlonales normalizados a partir de donantes humanos, en particular los reactivos anti-Rh (D) y éstos, por lo general, no detectan a determinadas expresiones parciales del antígeno D⁷.

El suero hemoclasificador anti-D es uno de los diagnosticadores de grupo sanguíneos utilizados en la tipificación sanguínea en bancos de sangre y servicios

de transfusiones¹³. La mayoría de los anticuerpos anti-D son de la clase IgG conocidos con el término «incompletos» pues frecuentemente no aglutinan los glóbulos Rho D positivos suspendidos en medio salino, por lo que necesitan de agentes potenciadores para llevar a cabo la reacción de aglutinación. El potenciador más utilizado tradicionalmente es la albúmina sérica bovina que constituye entre 20 y 70 % del reactivo, lo que encarece significativamente su producción. Además en algunas ocasiones los potenciadores pueden producir aglutinación de glóbulos rojos sensibilizados *in vivo* y dan en el *test* de Rh falsa positividad⁵⁶.

Una vía alternativa de producción de hemoclasificadores se basa en la tecnología de hibridomas desarrollada por *Köhler* y *Milstein*, para la obtención de AcM murinos y/o humanos. La administración profiláctica postparto de la inmunoglobulina humana anti-Rh (D) en mujeres D-negativas ha provocado una reducción del número de mujeres aloinmunizadas por vía natural. Por eso hoy en día es más escasa la fuente de obtención de reactivos hemoclasificadores policlonales humanos anti-Rh (D), pues ahora descansa únicamente en la inmunización de donantes voluntarios (especiales) con los riesgos que este tipo de proceder genera. Pero en la preparación de los AcM contra el antígeno Rh (D), se han observado dificultades adicionales, ya que son difíciles de obtener a partir de sistemas en roedores, por la poca inmunogenicidad de este antígeno en dichas especies. Sin embargo, se ha incursionado con éxito en la generación de AcM anti-Rh (D) humanos, los reactivos anti-D de última generación se obtienen del cultivo *in vitro* de los heterohibridomas humano/murinos^{7,57}. Su producción no depende de donaciones de sangre, es menos laboriosa, tiene menor contenido de albúmina y no posee anticuerpos contaminantes.

Los reactivos monoclonales anti-D se comenzaron a producir a partir de los años 80. Los primeros que se obtuvieron fueron de la clase IgG y no revelaron diferencias notables con los tradicionales policlonales, pero cuando se empezaron a obtener Anticuerpos Monoclonales del tipo IgM, se lograron títulos muy superiores y se aumentó el número de variantes del antígeno D no reconocidas hasta entonces. Actualmente se pueden encontrar en el mercado reactivos anti-D basados en un AcM anti-D (del tipo IgM), o formulados con dos AcM (IgM + IgG)^{58,59,60}.

Una de las dificultades en la clasificación parcial de los hematíes D es la escasez de reactivos adecuados, los cuales se han obtenido del suero de individuos con fenotipos parciales de D que se han aloimmunizado anti-D, o a través de los AcM. Aunque los primeros AcM humanos clase IgG obtenidos en el mundo no fueron superiores a los sueros policlonales y fallaban en la detección de los fenotipos D débiles y de las variantes D, la obtención de AcM clase IgM anti-D estables, como los clones MAD-2 y FOM-133 provocó un cambio radical en la serología del sistema Rh. Estos AcM dieron lugar a reactivos con altos títulos de anticuerpos, que trabajan bien tanto a temperatura ambiente como a 37 °C, que unidos a los AcM clase IgG, desarrollados al final de la década del 80, han convertido a los hemoclasificadores basados en AcM humanos en los productos de elección para la clasificación sanguínea en el sistema Rh^{7,38,41}.

En relación con los requerimientos de especificidad, por la complejidad del antígeno Rh(D), muchos consideran que un buen hemoclasificador no se debe elaborar sobre la base de un solo AcM, sino que es preferible una mezcla, por lo que hay que evaluar mediante la prueba de antiglobulina (prueba de Coombs) la presencia de la variante D^U en casos críticos del estudio del grupo Rh(D) negativo y utilizar células D^U en el panel celular, para la generación de reactivos basados en AcM anti-Rh(D), con vistas a monitorear su calidad. Con la nueva generación de AcM reactivos anti-Rh (D) se ha incrementado la proporción de individuos previamente reconocidos como D^U (débil D, positivo por prueba de antiglobulina indirecta) que ahora son agrupados por pruebas directas de hemaglutinación como Rh (D) francamente positivos. Sin embargo, el primer requisito de un reactivo anti-Rh (D) debe ser que de forma segura y sin ambigüedades aglutine a los hematíes que aparentemente expresan un complemento completo de epítopes D, por lo cual la mayoría de los expertos considera que la prueba de antiglobulina indirecta no es ya esencial para la detección de los débiles D positivos (D^U), siempre que se usen AcM que reconozcan a esta expresión, aunque para obtener la licencia o registro sanitario no es necesario que los reactivos anti-Rh(D) detecten a todas las variantes de hematíes D débiles o parciales^{7,61,62}.

Los aportes de la biología molecular al entendimiento de la complejidad antigénica del sistema Rh y los avances alcanzados en la serología, gracias a los AcM, han permitido tener hoy un mejor conocimiento de este sistema de grupos sanguíneos. En este sentido, los AcM están contribuyendo decisivamente a la definición de algunos antígenos sanguíneos cuyas características estructurales son desconocidas y al conocimiento de la expresión de los antígenos sanguíneos en los diversos tejidos y su relación con la significación funcional de estos antígenos, que obviamente nada tiene que ver con las transfusiones, y probablemente está muy relacionado con los procesos de diferenciación y crecimiento celular⁷.

El empleo de los anticuerpos monoclonales (AcM) con título elevado en lotes idénticos y producidos en grandes cantidades, constituye un gran aporte para la serología de los grupos sanguíneos al abrir la posibilidad de obtener reactivos que reconocen las variantes débiles, además de evitar las inmunizaciones de donantes voluntarios, las cuales plantean muchos problema éticos por el riesgo de transmisión de determinadas infecciones por vía sanguínea (VHB y VHC, HTL-I/II, citomegalovirus, VIH) y por la frecuencia con que aparecen en estos donantes enfermedades del tipo autoinmune. Con esta tecnología se reducen los costos técnicos, pues se elimina la evaluación de un gran número de pequeñas donaciones requeridas para la producción de los antisueros policlonales⁶³.

III. MATERIAL Y METODOS

La investigación y producción del reactivo se ejecutó en el Laboratorio de Anticuerpos y Biomodelos Experimentales (LABEX). Se utilizaron las instalaciones correspondientes a los grupos de Fermentación y Producción de Inóculos, de Control de Calidad y de Aseguramiento y Productos Terminados diseñadas según normas ISO 9001⁶⁴. El tiempo comprendido en la obtención del producto fue desde Enero 2008 hasta Junio del 2010. Se trabajó en coordinación con el Centro de Inmunología Molecular (CIM), donde se realizaron diferentes técnicas para la caracterización de los sobrenadantes y con el Instituto de Hematología e Inmunología (IHI), en el asesoramiento de técnicas y procedimientos y en la liberación externa de los sobrenadantes de cultivo y del producto terminado.

III.1 Líneas celulares

Para el desarrollo del reactivo se emplearon 2 líneas celulares secretoras de los anticuerpos empleados (Anexo 1 y 2) como materia prima activa (MPA):

- Línea celular HM-92: heterohibridoma humano-ratón secretor de IgM_{hu} anti-Rh₀ (D).
- Línea celular D-90/17: heterohibridoma humano-ratón secretor de IgG_{hu} anti-Rh₀ (D^u)

III.2 Medio de cultivo

Las dos líneas celulares empleadas fueron cultivadas en medio RPMI-1640 suplementado con Suero Fetal Bovino (SFB) al 8 %.

III.3 Condiciones de cultivo

Las dos líneas celulares cultivadas fueron sometidas a las mismas condiciones de cultivo: Cultivo estacionario a 37 °C y CO₂ al 5 %.

Se utilizaron materiales de cultivo desechables de la firma Greiner Bio-One. Para los ensayos cinéticos se emplearon frascos de cultivo estándar de 25 cm² (volumen máximo de trabajo 10 mL). Para la obtención de los sobrenadantes de cultivo de los lotes productivos se utilizaron frascos de cultivo estándar de 225 cm² (volumen máximo de trabajo 140 mL)^{65,46}.

III.4 Ensayo de la Cinética de crecimiento

El ensayo de la cinética de crecimiento fue similar para ambas líneas celulares. Se sembraron 10 frascos de cultivo con 10 mL cada uno a una concentración de $0,3 \times 10^6$ células/mL. A partir del momento de siembra y cada 24 horas se tomó uno de los frascos de cultivo sembrados y se determinó viabilidad del cultivo, así como concentración de células vivas, muertas y totales. De cada frasco de cultivo analizado se centrifugaron 5 mL de cultivo a 1000 r.p.m durante 5 minutos. El sobrenadante se transfirió a un vial estéril y se conservó a 4 °C (no más de 1 mes) hasta su caracterización experimental. Cada frasco utilizado fue desechado posteriormente.

III.5 Obtención de los sobrenadantes de los lotes productivos

El proceso de producción de los lotes productivos se diseñó empleando el modo de cultivo por lote, determinando el período de tiempo entre la siembra y la cosecha de los sobrenadantes de cultivo a partir de los resultados obtenidos durante la caracterización cinética. El diseño del proceso fue similar para la obtención de los sobrenadantes de cultivo anti-D y anti-D^U. Se descongeló un criovial portador del hibridoma a partir de un banco celular conservado en nitrógeno líquido (-196 °C) y las células fueron expandidas en cultivo celular hasta obtener una cantidad igual o superior a 42×10^6 células con una viabilidad superior al 70 %. Se sembró un frasco de cultivo de 225 cm² con 140 mL a una concentración celular de $0,3 \times 10^6$ células/mL, y el cultivo se mantuvo en incubación durante 7 días (168 horas). Posteriormente se colectó el cultivo y se clarificó mediante centrifugación a 1000 r.p.m durante 10 minutos, las células fueron desechadas y a los sobrenadantes de cultivo se les adicionó Azida Sódica al 0,1 % como preservante y se conservaron a 4 °C.

III.6 Técnicas Analíticas

III.6.1 Determinación de la viabilidad y concentraciones celulares

La viabilidad y las concentraciones celulares fueron determinadas por conteo en cámara de Neubauer. Se añadieron 100 uL de suspensión celular a 100 uL del

colorante vital tripán azul al 0,4 % y la mezcla se aplicó a la cámara de Neubauer. Se sumaron por separado las células vivas, muertas y totales de cada cuadrante de la cámara y la cantidad de células totales se determinó como la suma de vivas y muertas⁶⁶ (Figura 5).

La concentración celular se calculó aplicando la fórmula siguiente:

$$X = S \div 400 \times Fd \times 10^6$$

Donde:

X: Concentración de células vivas, muertas o totales.

S: Suma de células vivas, muertas o totales.

Fd: Factor de dilución de la muestra en tripán azul (Inverso de la dilución).

Para el cálculo de la viabilidad se aplicó la fórmula siguiente:

$$Viab = Sv \div St \times 100\%$$

Donde:

Viab: Viabilidad del cultivo (En términos de porcentaje).

Sv: Suma de células vivas.

St: Suma total de células.

III.6.2 Concentración de proteínas específicas

A los sobrenadantes de cultivo del hibridoma anti-D^U se le determinó concentración de proteína específica mediante la técnica de ELISA tipo sándwich.

Se recubrieron placas para ELISA (Catálogo: 655101, Greiner Bio One) aplicando un reactivo policlonal anti-IgG humana (específico para cadena γ) producido en carnero (Catálogo: I-3382, Sigma), y se incubó 2 horas a 37 °C. Se lavaron los pozos tres veces con PBS 1X-Tween 20 al 0,05% en un lavador de placas automático (Wellwash 4 MK 2, Thermo electron corporation, China). Se aplicaron para cada muestra dos diluciones (1:1000-1:2000) por triplicado cada dilución. Las diluciones se realizaron en PBS 1X-Tween 20 al 0,05 %-BSA

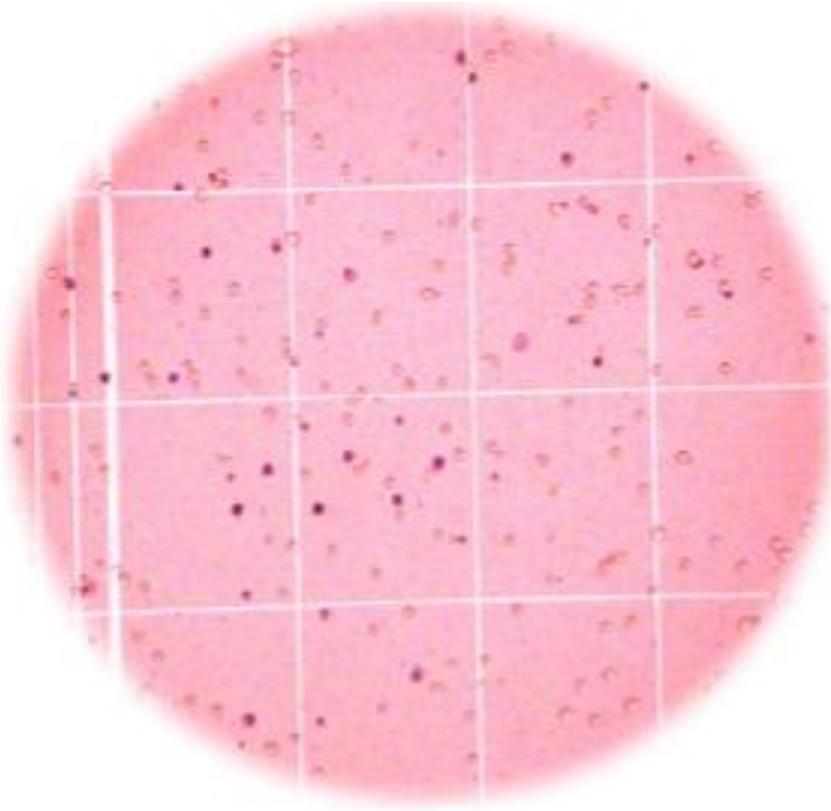


Figura 5. Vista al microscopio de un conteo en cámara de Neubauer.

Las células vivas se observan refringentes y las células muertas se tiñen en el interior de azul oscuro por el efecto del Tripán Azul.

0,25 %. Se incubaron las placas a 37 °C durante 1 hora. Se lavaron los pozos tres veces con PBS 1X-Tween 20 al 0,05 % y se aplicó un reactivo anti-IgG humana (específico para cadena γ) producido en carnero conjugado con Fosfatasa alcalina (Catálogo: A-3188, Sigma). Se incubó a 37 °C durante 1 hora. Los pozos se lavaron tres veces con PBS 1X-Tween 20 al 0,05 %. Se aplicó solución sustrato 6 mg de para-Nitrofenilfosfato (p-NPP) en 6 mL de Tampón Dietanolamina y se incubó a 25 °C durante 30 minutos en ausencia de luz. Se detuvo la reacción añadiendo Hidróxido de Sodio 3 M y se leyó la absorbancia a 405 nm en un lector de placa (DIAREADER UV ELx800, DIALAB, Austria). Para determinar la concentración de cada muestra, los valores de cada muestra fueron extrapolados a una curva patrón de BSA^{67,68}.

III.6.3 Criterio de Pureza

La pureza de los sobrenadantes de cultivo de los lotes productivos se comprobó por electroforesis en geles de poliacrilamida al 12,5 % con 1,5 mm de espesor, de muestras tratadas con Dodecil Sulfato de Sodio (SDS-PAGE por sus siglas en inglés) en condiciones no reductoras^{69,70}. La corrida electroforética se llevó a cabo en un equipo de electroforesis vertical Mini Protean 3[®] Cell (Bio-rad; Alemania). Los sobrenadantes de cultivo obtenidos en ambas líneas celulares, se diluyeron 1:2 en solución reguladora no reducida 2X y se aplicaron 5 μ L en cada pocillo. La técnica se ejecutó con el objetivo de visualizar las bandas de proteínas presentes en cada muestra.

Las bandas correspondientes de los sobrenadantes de cultivo se visualizaron con Azul Coomassie (Bio-rad; catálogo: 161-0436).

III.6.4 Evaluación actividad Biológica

III.6.4.1 Sobrenadante de cultivo anti-D y anti-D^U

Al sobrenadante de cultivo anti-D obtenido de la cinética de crecimiento y al de los lotes productivos se les determinó potencia, avidéz e intensidad mediante técnica de hemaglutinación directa frente a un panel de eritrocitos de grupo O de fenotipo Rh ccDee (R₀r) y fenotipo ccddee (rr) (negativo).

Al sobrenadante de cultivo anti-D^U obtenido de la cinética de crecimiento y al de los lotes productivos se les determinó potencia mediante técnica de hemaglutinación indirecta frente a un panel de eritrocitos de grupo O de fenotipo ccD^Uee.

Se utilizó el reactivo “anti-D Monoclonal” de Centis Diagnósticos® como reactivo de referencia en todas las técnicas realizadas⁶¹.

➤ Técnica de hemaglutinación directa en Tubo. Potencia.

Se utilizaron 3 muestras de hematíes de fenotipo ccDee (R_or), lavadas tres veces con solución salina fisiológica (SSF) a 1500 r.p.m por 10 minutos, para preparar una suspensión al 2 % de hematíes en SSF con albúmina al 2 %.

Luego se procedió a realizar diluciones dobles progresivas de las muestras en SSF con albúmina al 2 %. Se realizó una suspensión al 2 % de hematíes en SSF con albúmina al 2 % y se mezclaron 50 µL de dicha suspensión con 100 µL de las diluciones de las muestras a analizar. Se Incubaron 15 minutos a 37 °C. Se centrifugaron 1 min a 1000 r.p.m y se realizó la lectura en la escala de 1+ a 4+ (Se describe más adelante)^{61,62}.

➤ Técnica de hemaglutinación directa en láminas. Aidez e Intensidad.

Se enfrentaron en una lámina 50 µL de los sobrenadantes de cultivo (SNC) anti-D con 100 µL de suspensión de hematíes de fenotipo ccDee (R_or) al 50 % realizados en su propio plasma o suero. Se mezclaron con ayuda de un aplicador. Se incubó sobre la lámpara Rh hasta que se observaron los aglutinados y se tomó el tiempo con un cronómetro desde que se comenzó a mezclar hasta que aparecieron los aglutinados según inspección visual. Se leyó en la escala de 1+ a 4+ (Se describe más adelante). Se realizó esta misma operación pero con la suspensión de hematíes de fenotipo ccddee (rr) al 50 %^{61,62}.

➤ Técnica Antiglobulina Indirecta para la determinación del D^U.

Por otra parte se preparó una suspensión al 2 % de hematíes en SSF con albúmina al 2 % con tres muestras de hematíes de fenotipo ccD^Uee. Se realizaron diluciones

dobles progresivas de las muestras de sobrenadantes de cultivo a analizar, con albúmina al 2 % en SSF. Se mezclaron 50 μ L de la suspensión al 2 % de hematíes de fenotipo D^U en SSF con albúmina al 2 % con 100 μ L de las diluciones de las muestras. Se Incubaron 30 minutos a 37 °C. Pasado este tiempo se lavaron 3 veces con SSF 10 minutos a 1500 r.p.m. Se decantó y se le adicionó 100 μ L de Suero de Coombs de referencia a cada muestra, se centrifugó 1 minuto a 1000 r.p.m y se leyó en la escala de 1+ a 4+^{61,62}.

- Grado de reacción de aglutinación: Valores numéricos que se le asignan a la intensidad de la aglutinación⁶¹ y se expresan de la siguiente forma:

Cruces. Formas de aglutinación.

- 4+ Aglutinación total de los eritrocitos en un solo cúmulo grande en un fondo claro.
- 3+ 2 ó 3 aglutinados grandes en un fondo claro.
- 2+ Aglutinados pequeños, de igual tamaño, en un fondo rojo.
- 1+ Aglutinados muy pequeños, pero definidos, en un fondo rojo.
- ± Pequeños aglutinados no definidos, que pueden resultar dudosos. Esta reacción es negativa.
- 0 No aglutinación.

III.6.4.2 Formulado y Producto Terminado

A los tres lotes de formulados y productos terminados se les evaluó potencia, avidéz e intensidad y especificidad; además del efecto prozona para el producto terminado.

Para el caso de la potencia, avidéz e intensidad de los formulados se tomó una muestra por formulado y para el producto terminado se tomaron tres muestras de cada lote con dos muestras de eritrocitos de fenotipo OCcDee (R_{1r}); OccDee (R_{0r}) y para la determinación del D^U una muestra de fenotipo AccD^Uee y dos muestras de fenotipo OccD^Uee.

Para la especificidad del producto terminado se tomaron tres muestras de cada lote con eritrocitos de fenotipos: OCcdee (r'r); dos muestras Occdee (r'r); OccddEe; Accddee y Bccddee. La realización de éstas técnicas se describieron en el acápite **III.6.4.1.**

La determinación del efecto prozona se determinó con eritrocitos de fenotipo OCcDee (R₁r) en la técnica en tubo descrita en el acápite **III.6.4.1** con tiempos de incubación de 15, 30 y 60 minutos^{61,62}.

III.7 Ensayo de Formulación

Se realizaron tres formulaciones con diferentes tipos de preparación de buffer y diluciones de los sobrenadantes anti-D y anti-D^U de acuerdo a su titulación.

La formulación se realizó por dilución de las mezclas de sobrenadantes (IgG + IgM) en el buffer de formulación.

Se prepararon 3 Buffers distintos que para mayor comprensión se llamaron:

- **Buffer 1:** Buffer Fosfato Salino (PBS) 0,05 M pH 7,2; NaCl 0,1 M; BSA, 20 g/L; EDTA 2 Na 2,4 mM; Azida sódica, 1g/L
- **Buffer 2:** Buffer Fosfato: Na₂HPO₄, 4,66 g/L; KH₂PO₄, 4,60 g/L; NaCl, 17,86 g/L; EDTA Na₂, 3,72 g/L; EDTA Na₄, 4,162 g/L; Azida Sódica, 1 g/L; BSA, 27 g/L. La solución se ajustó a un pH 7,5.
- **Buffer 3:** Buffer Fosfato Salino (PBS) 0,1 M; BSA, 20g/L; Azida sódica, 1g/L.

Composición Buffer Fosfato Salino (PBS): NaCl, 80 g/L; KCl, 2 g/L; KH₂PO₄, 2 g/L; Na₂HPO₄, 11,5 g/L. La solución se ajustó a un pH 7,2-7,4.

III.8 Producto Terminado

El producto terminado se envasó en frascos de vidrio GL 18 con conjunto cuenta gota, dispensado en 5 mL para 100 determinaciones; previo proceso de filtración realizado con membrana de acetato de celulosa con un tamaño de poro de 0,2 μ (micras), para eliminar cualquier tipo de impurezas que se haya creado durante el proceso de formulación. Para el proceso de llenado se utilizó una llenadora

semiautomática Filamatic, bajo cabina de seguridad biológica a una temperatura de laboratorio controlada entre 20 - 22 °C^{71,72,73}.

III.9 Propuesta de escalado del proceso productivo

A partir de los resultados de los tres experimentos obtenidos a escala de laboratorio según recomendaciones del proveedor durante la caracterización cinética se realizó una propuesta de escalado a un sistema de botellas rotatorias con un volumen de 500 mL. El criterio de escalado utilizado en nuestro caso es en cuanto al volumen de sobrenadante de cultivo.

Los cálculos económicos se realizaron a partir de las fichas de costos y a través de una base de datos realizada con el programa informático Microsoft Office ACCESS 2007.

IV. RESULTADOS Y DISCUSION

IV.1 Cinética de Crecimiento

Se realizó un estudio con los heterohibridomas anti-D y anti-D^U con el objetivo de caracterizar la cinética de crecimiento celular y de producción del anticuerpo monoclonal. El ensayo cinético de ambas líneas celulares se realizó con cultivos estacionarios en frascos de cultivo estándares, ya que éstas son sensibles a regímenes de agitación relativamente altos.

Estudio de la cinética de crecimiento del Hibridoma anti-D

Durante la cinética de crecimiento en las primeras 24 horas el cultivo mostró una fase de adaptación en la que se registró un pobre crecimiento, esto se debe a que en este primer período las células están en función de adaptarse a las condiciones físicas, químicas y bioquímicas del medio, así como secretando factores de crecimiento autocrinos y paracrinos que potencien la actividad mitótica, por lo que la velocidad de crecimiento es nula o muy baja y no se registró aumento de la concentración celular, esto se le denomina fase de latencia^{19,54,55}. Posteriormente el cultivo pasó a la fase de crecimiento exponencial, en la cual las células, adaptadas e inmersas en un ambiente rico en nutrientes y en ausencia de factores limitantes del crecimiento alcanzaron la velocidad máxima de crecimiento. De igual manera la concentración de las células totales y de las células vivas alcanzó su valor máximo de $1,44 \times 10^6$ células/mL y $1,17 \times 10^6$ células/mL respectivamente al final de esta fase^{46,54}.

A las 96 horas el cultivo entró en fase de muerte, no se observó fase de meseta; la concentración de nutrientes consumidos por las células han alcanzado valores limitantes para el crecimiento del cultivo. Por otro lado, la acumulación de subproductos del metabolismo (desechos) inhibe la velocidad del crecimiento y provocan citotoxicidad, como es el caso del lactato y el amonio⁵⁵. Este ambiente adverso trajo consigo que los valores de viabilidad celular y de concentración de células vivas disminuyeran paulatinamente hasta el final del experimento, el cual fue predeterminado cuando la viabilidad celular llegó a valores por debajo del 20 %⁵⁴ (Figura 6).

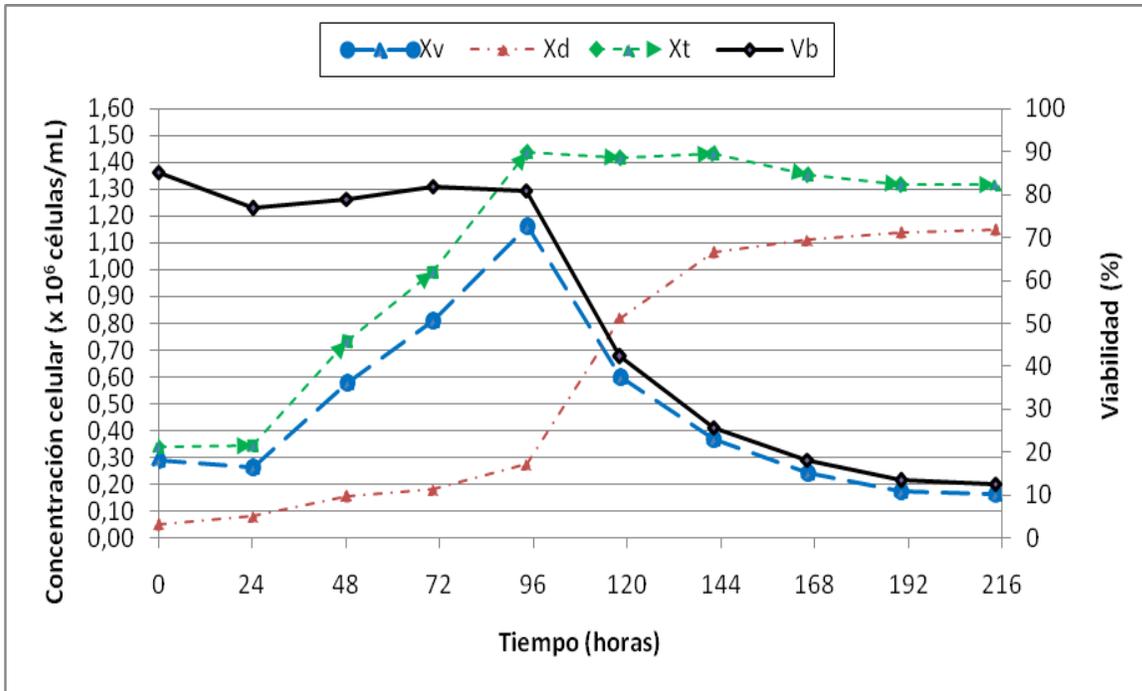


Figura 6. Comportamiento de la cinética de crecimiento del cultivo celular clase IgM clon HM-92 vs tiempo.

Xv- Concentración de células vivas

Xd- Concentración de células muertas

Xt- Concentración de células totales

Vb- Viabilidad

La cinética de producción de anticuerpos de IgM mostró un incremento de los títulos de hemaglutinación durante el transcurso de la fase de crecimiento exponencial y en las 48 horas posteriores a esta, en la parte inicial de la fase de muerte del cultivo (Figura 7), momento en el que se alcanzaron los mayores títulos de hemaglutinación (1024). Los incrementos en los títulos durante este período de tiempo coincidieron con un aumento de la intensidad y de la avidéz, las cuales alcanzaron sus valores máximos (avidéz máxima: 5 segundos; intensidad máxima: 4+) 72 horas después de culminada la fase de crecimiento exponencial (Tabla 1). Estos resultados permitieron inferir que la producción de anticuerpos ocurrió durante las primeras 168 horas, y que la secreción de los mismos no estuvo vinculada únicamente a la fase de crecimiento exponencial.

La caída de los títulos de hemaglutinación al final del ensayo cinético podría deberse a la degradación de la IgM por la acción de proteasas endógenas liberadas por las células al morir y perder la integridad de la membrana plasmática. La disminución de las variables medidas en las pruebas de hemaglutinación al final de la fase de muerte coincide con resultados obtenidos por otros investigadores en años recientes⁵¹.

Estudio de la cinética de crecimiento del Híbrido anti-D^U

Durante el crecimiento del cultivo celular clase IgG clon D-90/17 (Figura 8), se observó durante las primeras 24 horas una fase de latencia similar a la del cultivo anterior con un crecimiento más pobre. Posteriormente se apreció la fase de crecimiento exponencial del cultivo, donde la concentración de células totales y células vivas alcanzaron un valor máximo de $0,98 \times 10^6$ células/mL y $0,85 \times 10^6$ células/mL respectivamente.

Un aspecto fundamental que se apreció es la no asociación entre la producción de IgG y la fase de crecimiento exponencial. El aumento de la concentración de IgG luego de terminada la fase exponencial pudiera estar causado por la liberación de las proteínas contenidas en el citoplasma una vez que las células muertas pierden su integridad por ruptura de la membrana citoplasmática. Este aspecto aunque no fue medido ha sido ampliamente reportado en la literatura⁷⁴.

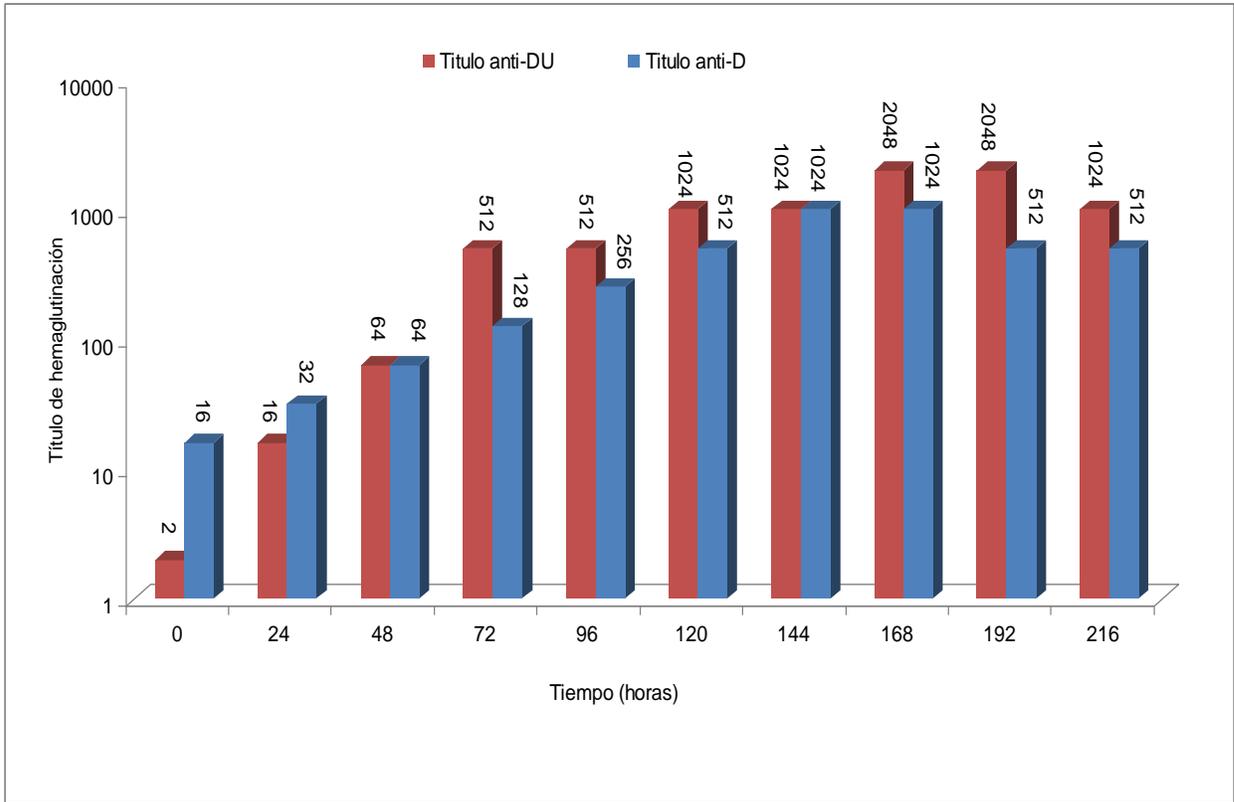


Figura 7. Cinética de producción de los AcM IgM anti-D e IgG anti-D^U (Potencia).

Tabla 1. Cinética de producción del AcM IgM anti-D. Aidez e Intensidad.

Tiempo en Horas	Aidez (s)	Intensidad	Referencia Aidez/ Intensidad
24	120	±	6s /3+
48	12	2+	6s /3+
72	8	3 +	7s /3+
96	8	3 +	6s /3+
120	7	3 +	6s /3+
144	6	3 +	7s /3+
168	5	4 +	6s /3+
192	5	4 +	6s /3+
216	5	4 +	6s /3+
240	5	4 +	6s /3+

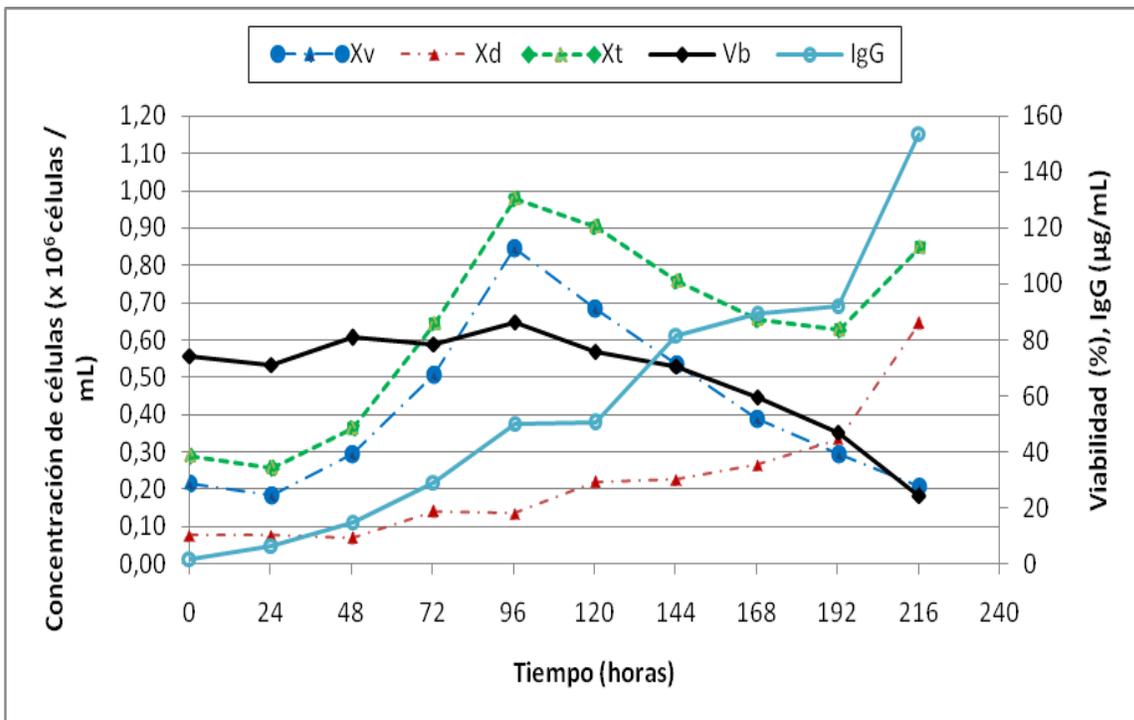


Figura 8. Comportamiento de la cinética de crecimiento del cultivo celular clase IgG clon D-90/17 vs tiempo.

Xv- Concentración de células vivas

Xd- Concentración de células muertas

Xt- Concentración de células totales

Vb- Viabilidad

IgG- Concentración de IgG

A las 96 horas el cultivo entró en fase de muerte, no se observó fase de meseta; lo cual pudo deberse a que la concentración de nutrientes consumidos por las células han alcanzado valores limitantes para el crecimiento del cultivo. Por otro lado la acumulación de subproductos del metabolismo (como el lactato y el amonio) pudo inhibir la velocidad del crecimiento y provocar citotoxicidad⁵⁵. Este ambiente adverso trajo consigo que los valores de viabilidad celular y de concentración de células vivas, disminuyeran paulatinamente hasta el final del experimento, el cual fue predeterminado cuando la viabilidad celular llegó a valores por debajo del 20 %⁵⁴.

La cinética de producción de anticuerpos de IgG mostró un incremento de los títulos de hemaglutinación durante el transcurso del ensayo hasta las 168 horas (Figura 8), momento en que se alcanzaron los mayores títulos de hemaglutinación (2048). La concentración de IgG mostró un aumento permanente durante todo el ensayo, hasta alcanzar un valor máximo de 153,7 µg/mL a las 216 horas (día 9). Como se pudo observar, el aumento de la concentración de IgG en las últimas 48 horas del ensayo no se reflejó en incrementos en los títulos de hemaglutinación^{51,54,60}.

La caída de los títulos de hemaglutinación al final del ensayo cinético podría deberse a la degradación de la IgG por la acción de proteasas endógenas liberadas por las células al morir y perder la integridad de la membrana plasmática. La disminución de las variables medidas en las pruebas de hemaglutinación al final de la fase de muerte coincide con resultados obtenidos por otros investigadores en años recientes⁵¹.

IV.2 Caracterización de los sobrenadantes de cultivo de los lotes productivos

Los sobrenadantes de cultivo se caracterizaron mediante técnicas inmunohematológicas (hemaglutinación en tubos y láminas) para determinar la potencia, avidéz e intensidad de los anticuerpos frente a sus respectivos antígenos y mediante técnicas bioquímicas como ELISA⁶⁷ para determinar la concentración de anticuerpos en el sobrenadante de cultivo y electroforesis en gel de poliacrilamida SDS-PAGE⁷⁰ para visualizar la pureza de los mismos.

Caracterización del sobrenadante de cultivo anti-D

El sobrenadante de cultivo anti-D, que contenía la inmunoglobulina humana IgM la cual reconoce al Ag Rh_o (D), fue caracterizado desde el punto de vista inmunohematológico mediante la técnica hemaglutinación directa en tubos para determinar la potencia, para este caso se consideró el título como la mayor dilución donde se observó la aglutinación de 1+. Al evaluar los lotes se observó un título de 512 en el primer lote y 256 para el segundo y tercer lote, siendo elegidos estos títulos por reaccionar con las tres células escogidas (Tabla 2). Todos los lotes fueron comparados con la referencia cumpliéndose con las regulaciones internacionales, pues este sobrenadante es diluible 1:2 para formular el producto final y cumplir con los requisitos regulatorios establecidos. Al evaluar la avidéz del sobrenadante anti-D se observó que osciló en un tiempo entre 6 y 8 segundos con una intensidad de 3+, comparado con la referencia (Tabla 3), cumpliendo así con los requisitos de calidad establecidos por el CECMED^{61,62,75}. Otros autores han caracterizado sobrenadantes de cultivo anti-D del tipo IgM, pero los títulos reportados han sido inferiores⁶ al obtenido bajo las condiciones realizadas en este trabajo y en otros se hallaron similares resultados⁷⁶.

Al sobrenadante anti-D se le determinó la pureza por la técnica de electroforesis en gel de poliacrilamida SDS-PAGE^{69,70} (Figura 9). En el carril 3 se añadió el sobrenadante anti-D observándose la ausencia de banda en la posición de la IgG comparando con el patrón de IgG ubicado en el carril 1 por lo que se puede plantear que no hay IgG en el sobrenadante, en cambio se observó una banda retrasada con respecto a la IgG la que se supuso que correspondía a la IgM esperada pues tiene un peso molecular mayor (960 kDa) que la inmunoglobulina IgG (150 kDa) por lo que su migración se esperaba fuera menor en el gel. Este resultado fue similar al mostrado por Gagnon y colaboradores en el 2008⁷⁷.

Este heterohibridoma antes de su adquisición en el extranjero, fue evaluado por el Laboratorio de Referencia Internacional de Sangre del Reino Unido (Bristol). Se determinaron todos los parámetros de calidad como: Isotipo, pureza,

Tabla 2. Caracterización del sobrenadante IgM anti-Rh_o (D).

		Diluciones. (Requerimiento: hematíes R _{0r} ≥ 64).										
Muestras		P	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	1/128	1/256	1/512	1/1024
SNC IgM (1)	R _{0r} 1	4+	4+	4+	4+	4+	3+	3+	3+	2+	1+	0
	R _{0r} 2	4+	4+	4+	4+	3+	3+	3+	2+	2+	1+	0
	R _{0r} 3	4+	4+	4+	4+	4+	3+	3+	3+	2+	1+	0
SNC IgM (2)	R _{0r} 1	4+	4+	4+	4+	3+	3+	3+	2+	1+	0	0
	R _{0r} 2	4+	4+	4+	4+	3+	3+	2+	1+	1+	0	0
	R _{0r} 3	4+	4+	4+	4+	3+	3+	3+	2+	1+	0	0
SNC IgM (3)	R _{0r} 1	4+	4+	4+	4+	3+	3+	2+	1+	1+	0	0
	R _{0r} 2	4+	4+	4+	3+	3+	3+	2+	1+	1+	0	0
	R _{0r} 3	4+	4+	4+	4+	3+	3+	2+	2+	1+	0	0
Referencia	R _{0r} 1	4+	4+	4+	4+	3+	3+	3+	3+	1+	0	0
	R _{0r} 2	4+	4+	4+	3+	3+	3+	3+	2+	1+	0	0
	R _{0r} 3	4+	4+	4+	4+	3+	3+	2+	2+	1+	0	0

Tabla 3. Avidéz e Intensidad Sobrenadante anti-D.

Lotes	Fenotipos enfrentados: (Requerimiento: $\geq 2+$) (Requerimientos: 0)				
	OccDee (R_or)		OccDee (R_or)		Occddee (rr)
	Intensidad	Avidéz	Intensidad	Avidéz	
1	3+	8s	3+	8s	0
2	3+	8s	3+	8s	0
3	3+	8s	3+	7s	0
Referencia	3+	6s	3+	7s	0

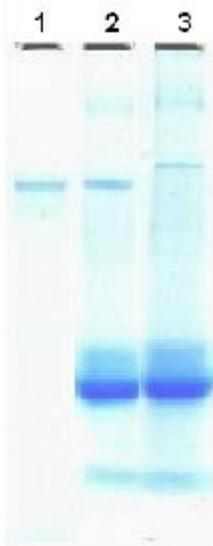


Figura 9. Electroforesis en gel de poliacrilamida en SDS-PAGE. Sobrenadantes de cultivo anti-D y anti-D^U.

Carril 1: Patrón de referencia. IgG humana purificada. (AcM hR3 purificado)

Carril 2: Sobrenadante de cultivo de IgG anti-D^U.

Carril 3: Sobrenadante de cultivo de IgM anti-D.

especificidad, potencia y avidéz, las tres últimas frente a un panel eritrocitario (Anexo 1). Los resultados obtenidos en este trabajo fueron similares a los alcanzados por el Laboratorio de Referencia Internacional.

Se visualizaron además, otras bandas a lo largo del carril, las que se correspondieron con las proteínas presentes como la albúmina y otros componentes del medio de cultivo suplementado con suero. Estos componentes presentes en el sobrenadante no influyeron en la actividad biológica; al contrario, se consideran como potenciadores de la misma, pues en la formulación de estos reactivos se incluye albúmina sérica bovina tal como plantearon Bradley y colaboradores^{78,79,80}.

Caracterización del sobrenadante de cultivo anti-D^U

El sobrenadante de cultivo anti-D^U que contiene la inmunoglobulina humana IgG la cual reconoce al Ag Rh_o (D^U) fue caracterizado desde el punto de vista inmunohematológico mediante la técnica hemaglutinación indirecta en tubos para determinar potencia (Tabla 4). Como se observó el título obtenido fue de 1024 para el primer y segundo lote y de 512 para el tercer lote, siempre comparado con la referencia, cumpliéndose con las regulaciones vigentes^{61,62,75}. Generalmente los títulos de los anticuerpos IgG son superiores a los de IgM por lo que este sobrenadante es diluible 1:16. Otros autores han caracterizado sobrenadantes de cultivo anti-D del tipo IgG, pero los títulos reportados han sido inferiores⁵ al obtenido bajo las condiciones realizadas en este trabajo y en otras publicaciones se hallaron similares resultados^{76,81}.

Al evaluar pureza mediante la técnica de electroforesis en gel de poliacrilamida SDS-PAGE^{69,70} (Figura 9) se observó, que el sobrenadante de cultivo ubicado en el carril 2 mostró una única banda en la misma altura de la IgG del patrón utilizado y ubicado en el carril 1, no se observó ninguna otra banda que pudiera asociarse a otras inmunoglobulinas por lo que se tomó como criterio de pureza de este sobrenadante. Este resultado fue similar al mostrado por Gagnon y colaboradores en el 2008⁷⁷.

Tabla 4. Caracterización del sobrenadante IgG anti-Rh₀ (D^U).

		Diluciones. (Requerimiento: hematíes fenotipo D^U ≥ 1:32 con 1+)													
Lotes	Muestras	P	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	1/128	1/256	1/512	1/1024	1/2048	1/4096	
SNC IgG (1)	OccD ^U ee	3+	3+	3+	3+	3+	3+	3+	3+	2+	2+	1+	0	0	
	OccD ^U ee	3+	3+	3+	3+	3+	3+	3+	2+	2+	1+	1+	0	0	
	OccD ^U ee	3+	3+	3+	3+	3+	3+	3+	3+	3+	2+	1+	1+	0	
SNC IgG (2)	OccD ^U ee	3+	3+	3+	3+	3+	3+	3+	2+	2+	1+	1+	0	0	
	OccD ^U ee	3+	3+	3+	3+	3+	3+	3+	2+	1+	1+	1+	0	0	
	OccD ^U ee	3+	3+	3+	3+	3+	3+	3+	3+	2+	2+	1+	0	0	
SNC IgG (3)	OccD ^U ee	3+	3+	3+	3+	3+	3+	3+	3+	2+	1+	1+	0	0	
	OccD ^U ee	3+	3+	3+	3+	3+	3+	3+	2+	2+	1+	0	0	0	
	OccD ^U ee	3+	3+	3+	3+	3+	2+	1+	0	0	0	0	0	0	
Referencia	OccD ^U ee	3+	3+	3+	3+	2+	2+	1+	0	0	0	0	0	0	
	OccD ^U ee	3+	3+	3+	3+	2+	2+	1+	0	0	0	0	0	0	
	OccD ^U ee	3+	3+	3+	3+	3+	2+	2+	1+	0	0	0	0	0	

Este heterohibridoma al igual que el anterior, antes de su adquisición en el extranjero, fue evaluado por el Laboratorio de Referencia Internacional de Sangre del Reino Unido (Bristol). Se determinaron todos los parámetros de calidad como: Isotipo, pureza, especificidad y potencia, éstas últimas frente a un panel eritrocitario (Anexo 2). Los resultados obtenidos en este trabajo fueron similares a los alcanzados por el Laboratorio de Referencia Internacional.

Además se visualizaron otras bandas a lo largo del carril, las que se correspondieron con las proteínas presentes como la albúmina y otros componentes del medio de cultivo suplementado con suero. Estos componentes presentes en el sobrenadante no influyeron en la actividad biológica; al contrario, se consideran como potenciadores de la misma, pues en la formulación de éstos reactivos se incluye albúmina sérica bovina tal como plantearon Bradley y colaboradores^{78,79,80}.

IV.3 Formulación

Los formulados se realizaron acorde con el título de cada sobrenadante, con los tres buffer de formulación. Se obtuvo un formulado final con título mayor de 32 al enfrentarlos con eritrocitos de fenotipo Rh: ccDee (R₀r) para el caso de los anticuerpos IgM y con un título mayor de 2 para los anticuerpos IgG⁶¹ de manera que al mezclarlos el reactivo cumpla con las especificaciones para el cual fue diseñado.

Estudio de formulación con los diferentes Buffer

Se estudió un lote con tres formulaciones, una para cada buffer ensayado para el caso de los anticuerpos IgM (Tabla 5). Los resultados mostraron que la potencia de la tercera formulación presentó el mayor título 512, y la segunda formulación el menor título 128. Entre la primera y la tercera formulación hubo una diferencia de una dilución, la reacción fue más intensa en la tercera formulación. La segunda formulación se muestra con respecto a las otras, disminuida en una y dos diluciones y su intensidad es menor comparada con las restantes.

Tabla 5. Estudio de formulación realizado con un lote utilizando 3 Buffer diferentes.

Formulaciones	Muestras	P	Diluciones. (Requerimiento: hematíes Ror ≥ 64).								Potencia.	
			1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	1/128	1/256	1/512	1/1024
(1)	R _{0r} 1	4+	4+	4+	4+	4+	3+	3+	3+	1+	0	0
	R _{0r} 2	4+	4+	4+	4+	3+	3+	3+	2+	1+	0	0
	R _{0r} 3	4+	4+	4+	4+	4+	3+	3+	3+	1+	0	0
(2)	R _{0r} 1	4+	4+	4+	3+	3+	2+	2+	1+	0	0	0
	R _{0r} 2	4+	4+	4+	3+	3+	2+	2+	1+	0	0	0
	R _{0r} 3	4+	4+	4+	3+	3+	2+	1+	1+	0	0	0
(3)	R _{0r} 1	4+	4+	4+	4+	4+	4+	3+	2+	1+	1+	0
	R _{0r} 2	4+	4+	4+	4+	4+	4+	3+	2+	1+	1+	0
	R _{0r} 3	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	3+	2+	1+	0
Referencia	R _{0r} 1	4+	4+	4+	4+	4+	4+	3+	3+	1+	1+	0
	R _{0r} 2	4+	4+	4+	4+	4+	4+	3+	2+	1+	1+	0
	R _{0r} 3	4+	4+	4+	4+	4+	3+	2+	2+	1+	1+	0

Respecto a los anticuerpos IgG enfrentados a fenotipos D^U ocurrió algo similar, la tercera formulación presentó un título de 64 con una intensidad superior que el resto de las formulaciones, seguida de la primera formulación que presentó un título de 32 con similar intensidad y por último la segunda formulación con un título de 16 con una intensidad menor comparada con las 2 restantes (Tabla 6).

Selección de la Formulación final

A partir del estudio de formulación realizado se escogió como candidato de formulación la preparación del Buffer 3: Buffer Fosfato Salino (PBS) 0,1 M pH 7,2 -7,4; BSA, 20 g/L, Azida sódica, 1 g/L, que le confirió al reactivo una mayor potencia e intensidad de la reacción. La albúmina es una proteína de gran tamaño y peso molecular, que favorece la reacción de aglutinación por su carga eléctrica y crea alrededor de los eritrocitos un efecto electrostático que permite a los anticuerpos acercarse más y unir varios de ellos, pero además, ayuda a conservar la estructura primaria de los anticuerpos involucrados en este tipo de reacción. Por eso también actúa como preservante a la hora de formular los reactivos⁷. Los resultados obtenidos fueron equivalentes con estudios realizados por diferentes autores en los que se destacan Thorpe⁷⁶ y Bradley⁷⁸. Otras firmas comerciales españolas como Spinreact⁸², Linear Chemicals⁸³ y de Argentina: gtLab⁸⁴ y Weiner Lab⁶⁰, entre otras, utilizan formulaciones similares a las empleadas en este trabajo.

Los tres lotes formulados fueron caracterizados nuevamente. Se encontró un título de 512 (Tabla 7), una avidéz que osciló entre 7 y 8 segundos con una intensidad de 3+ (Tabla 8), cumpliendo con las regulaciones internacionales⁶¹. Al probarlas frente a eritrocitos D^U, se observó que los tres lotes formulados al igual que la referencia empleada, presentaron títulos de 64 (Tabla 9) cumpliéndose con los requisitos regulatorios⁶¹.

Tabla 6. Estudio de Formulación Coombs indirecto.

Formulaciones	Muestras	Diluciones.								
		P	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	1/128	1/256
(1)	OccD ^U ee	3+	3+	2+	2+	2+	1+	1+	0	0
	AccD ^U ee	3+	3+	2+	2+	2+	1+	1+	0	0
	OccD ^U ee	3+	3+	2+	2+	1+	1+	0	0	0
(2)	OccD ^U ee	3+	3+	2+	2+	1+	1+	0	0	0
	AccD ^U ee	3+	3+	2+	2+	1+	1+	0	0	0
	OccD ^U ee	3+	3+	2+	1+	1+	0	0	0	0
(3)	OccD ^U ee	3+	3+	2+	2+	2+	1+	1+	1+	0
	AccD ^U ee	3+	3+	3+	2+	2+	2+	1+	0	0
	OccD ^U ee	3+	3+	2+	2+	2+	1+	1+	1+	0
Referencia	OccD ^U ee	3+	3+	2+	2+	2+	2+	1+	1+	0
	AccD ^U ee	3+	3+	2+	2+	2+	2+	1+	1+	0
	OccD ^U ee	3+	3+	2+	2+	2+	2+	1+	0	0

Tabla 7. Caracterización de los formulados frente a eritrocitos R₀r.

Lotes	Muestras	Diluciones Requerimiento: $\geq 32+$ con 2+ (Potencia)										
		P	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	1/128	1/256	1/512	1/1024
1	1	4+	4+	4+	4+	4+	4+	3+	2+	1+	1+	0
2	1	4+	4+	4+	4+	4+	4+	3+	2+	1+	1+	0
3	1	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	3+	2+	1+	0
Referencia	1	4+	4+	4+	4+	4+	4+	3+	2+	1+	1+	0

Tabla 8. Avidéz e Intensidad de los formulados frente a fenotipos R_or.

Fenotipos enfrentados (Requerimiento: ≥ 2+)					
Lotes	Muestras	OccDee (R_or)		OccDee (R_or)	
		Intensidad	Avidéz	Intensidad	Avidéz
1	1	3+	7s	3+	8s
2	1	3+	8s	3+	7s
3	1	3+	7s	3+	8s
Referencia	1	3+	6s	3+	7s

Tabla 9. Caracterización de los formulados frente a eritrocitos D^U.

Lotes	Muestras	Diluciones Requerimiento: ≥ 2 con 2+ (Potencia).								
		P	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	1/128	1/256
1	OccD ^U ee	3+	3+	2+	2+	2+	1+	1+	1+	0
	AccD ^U ee	3+	3+	3+	2+	2+	2+	1+	1+	0
	OccD ^U ee	3+	3+	2+	2+	2+	1+	1+	0	0
2	OccD ^U ee	3+	3+	2+	2+	2+	1+	1+	0	0
	AccD ^U ee	3+	3+	3+	2+	2+	1+	1+	0	0
	OccD ^U ee	3+	3+	2+	2+	1+	1+	1+	0	0
3	OccD ^U ee	3+	3+	2+	2+	1+	1+	1+	0	0
	AccD ^U ee	3+	3+	3+	2+	1+	1+	1+	0	0
	OccD ^U ee	3+	3+	2+	2+	1+	1+	1+	0	0
Referencia	OccD ^U ee	3+	3+	3+	3+	3+	2+	2+	1+	0
	AccD ^U ee	3+	3+	3+	2+	2+	1+	1+	1+	0
	OccD ^U ee	3+	3+	2+	2+	2+	1+	1+	0	0

IV.4 Producto Terminado

Después de ser filtrado y envasado el producto terminado fue caracterizado nuevamente en cuánto a potencia, avidez e intensidad y prueba del D^U. Los resultados obtenidos fueron similares al formulado antes del envasado por lo que el proceso de filtración y envasado no afectó la calidad del producto final^{61,75}.

También se evaluó la especificidad y efecto prozona⁶¹. Para ello el producto terminado se enfrentó a varios fenotipos negativos y dos fenotipos positivos siendo la reacción positiva contra los fenotipos positivos, no así con los otros que fueron negativos, lo cual demuestra la especificidad del producto. Los resultados coinciden con los obtenidos con la referencia empleada (Tabla 10).

Además se evaluó la intensidad de la reacción frente a dos fenotipos R₀r y R₁r arrojando como resultado 3+ en ambos casos al igual que la referencia empleada. Cuando se evaluó el efecto prozona el reactivo no mostró disminución de la aglutinación con el incremento del tiempo de incubación al enfrentarse a eritrocitos de fenotipos CcDee (R₁r) a diferentes tiempos 15, 30 y 60 min. En todos los tiempos fue 3+ al igual que la referencia empleada cumpliendo así con los requisitos regulatorios⁶¹ (Tabla 11) y con estudios realizados por consenso de varios laboratorios como el Instituto Nacional para Estándares Biológicos y Control y el Laboratorio de Referencia Internacional de Sangre del Reino Unido⁷⁶.

IV.5 Propuesta de escalado del proceso productivo

Las líneas de los sobrenadantes anti-D y anti-D^U no se pueden usar en sistemas agitados, sino en sistemas estacionarios o en sistemas de agitación con una velocidad de agitación entre 1-3 r.p.m, también en sistemas de fermentación de fibra hueca. En este trabajo se propone la utilización de un sistema de botellas rotatorias porque las características de cultivo son muy similares a los realizados en los experimentos de cinética de crecimiento.

La demanda nacional del producto anti-D es de 42 000 frascos o el equivalente a 4 200 000 determinaciones según estudio de mercado realizado por el CIMAB

Tabla 10. Especificidad del Producto Terminado.

Requerimientos:		Negativo					Intensidad: $\geq 2+$	
Lotes	Muestras	Occddee	OccddEe	Occddee	Accddee	Bccddee	OccDee (R _{0r})	OCCDee (R _{1r})
1	1	0	0	0	0	0	3+	3+
	2	0	0	0	0	0	3+	3+
	3	0	0	0	0	0	3+	3+
2	1	0	0	0	0	0	3+	3+
	2	0	0	0	0	0	3+	3+
	3	0	0	0	0	0	3+	3+
3	1	0	0	0	0	0	3+	3+
	2	0	0	0	0	0	3+	3+
	3	0	0	0	0	0	3+	3+
Referencia	1	0	0	0	0	0	3+	3+

Tabla 11. Prozona.

Fenotipo CcDee (R_{1r}). Requerimientos: $\geq 2+$ a 37 °C.				
Lotes	Muestras	15 min.	30 min.	60 min.
1	1	3+	3+	3+
	2	3+	3+	3+
	3	3+	3+	3+
2	1	3+	3+	3+
	2	3+	3+	3+
	3	3+	3+	3+
3	1	3+	3+	3+
	2	3+	3+	3+
	3	3+	3+	3+
Referencia	1	3+	3+	3+

(casa comercializadora del CIM) y el Grupo de Ventas y Distribución de LABEX-CIM. Teniendo en cuenta que para el sobrenadante de cultivo anti-D su dilución es 1:2 y para el sobrenadante anti-D^U su dilución es 1:16 entonces se necesitaría 231 000 mL de formulado para cubrir la demanda nacional.

Por lo anterior expuesto y la capacidad de 500 mL que tienen las botellas rotatorias utilizadas para obtener el sobrenadante anti-D^U, se propone un proceso productivo bimensual, el cual permitirá obtener tres cosechas de 3 L de sobrenadante de cultivo, lo que aseguraría cubrir la demanda nacional. Se necesitarían alrededor de 14 437,5 mL de sobrenadante de cultivo anualmente, por lo que se utilizarían 3 botellas rotatorias.

Para obtener el sobrenadante de cultivo anti-D y partiendo de la demanda nacional antes mencionada, se necesitaría producir 115 500 mL de sobrenadante de cultivo anti-D anualmente, por lo que se propone un proceso productivo bimensual, donde se utilizarían 21 días para expandir, a partir de esta expansión serían las cosechas cada 7 días, así se podrían obtener 20 L en el bimestre, necesitando para ello 10 botellas rotatorias de 0,5 L y obtener 5 L en cada cosecha.

El criterio de escalado en este caso fue el volumen de sobrenadante de cultivo pues las operaciones son iguales que en frasco de cultivo estacionario.

Los sobrenadantes de cultivo utilizados tienen una viabilidad por encima del 50 % debido a sus características, pero siguen produciendo anticuerpos. El proveedor recomienda sembrar a $0,3 \times 10^6$ células/mL y al tercer día duplicar el medio, esperar 10 días y cosechar. En este caso se cosechó el sobrenadante de cultivo al cuarto día después de la duplicación manteniendo las células. Se constató experimentalmente que ambas líneas tuvieron una viabilidad superior al 50 % como criterio para resembrar en las botellas rotatorias. El experimento se realizó por triplicado mostrándose la media de los valores obtenidos (Tabla 12 y 13).

Tabla 12. Experimentos realizados para la línea celular clase IgM clon HM-92 del heterohibridoma anti-D.

Experimentos	Viabilidad %	Potencia	Avidez e Intensidad
1	56	512	8s/3+
2	55	256	8s/3+
3	56	256	7s/3+

Tabla 13. Experimentos realizados para la línea celular clase IgG clon D90/17 del heterohibridoma anti-D^U.

Experimentos	Viabilidad %	Potencia
1	56	1024
2	55	1024
3	56	512

Valoración económica

El primer objetivo de una fermentación industrial es la obtención de un producto de calidad a un costo de producción tan bajo como sea posible. La necesidad de minimizar los costos de producción es el factor que controla la selección de las materias primas, la búsqueda de nuevas cepas y el mejoramiento de las tecnologías⁴⁹. También para asegurar la consistencia y reproductividad, especialmente en el proceso de producción industrial, es importante usar siempre materias primas con propiedades idénticas. Por lo tanto, esto es necesario en cada lote de producción, con el fin de emplear la misma línea celular y garantizar que las características de la célula no cambien a lo largo de los lotes⁸⁵.

Hay que tener en cuenta que todas las etapas de un proceso de fermentación deben estar íntimamente ligadas e integradas ya que es indispensable que el proceso sea optimizado globalmente. Cada etapa debe considerar la importancia e influencia de los procesos y operaciones anteriores y también de los siguientes para poder cumplir con ese concepto de integración.

Para analizar las ventajas desde el punto de vista económico de la obtención del reactivo hemoclasificador anti-D monoclonal en sistema de botellas rotatorias se determinó como indicador el volumen del sobrenadante de cultivo como se mencionó anteriormente así como el costo de producción de este reactivo.

Para lograr este objetivo se consultaron asesores del departamento de Economía de LABEX-CIM^{86,87}. Además se realizó una búsqueda minuciosa en Internet y datos del Grupo de Ventas y Distribución de LABEX-CIM, para conocer los diferentes precios existentes en el mercado internacional con relación a este reactivo.

Se tomaron como referencia los precios de las firmas comerciales Biotec, GF Diagnostika y Organon, donde un frasco de anti-D monoclonal de 100 determinaciones, se comercializa entre 9,2 hasta 32,36 USD, algunas firmas superan este precio, producirlo en LABEX con iguales características de calidad,

presentación y uso, tiene un costo unitario de \$ 9,23 en frascos de cultivo estándar y de \$ 1,80 en el sistema de botellas rotatorias. El país cuenta con una demanda de 42 000 frascos de 5 mL para 100 determinaciones, un total de 4 200 000 determinaciones (Tabla 14).

Al realizar el análisis costo-beneficio se consideró factible la utilización del sistema de botellas rotatorias pues el costo total anual sería de \$ 75 600,00 mientras que en el sistema de frascos de cultivo estándar es de \$ 387 660, una diferencia significativa es que LABEX disminuyera los costos y ahorraría en producir dicho reactivo. El país tiene un costo de importación de este reactivo de \$ 809 340 anualmente para cubrir la demanda nacional. El costo beneficio del producto en frascos de cultivo estándar es de \$ 745 920 y del sistema de botellas rotatorias de \$ 789 180, esto indicó que aplicando este último ahorraría al país un 97,5 % por concepto de sustitución de importaciones, utilizando LABEX el 2,5 % del costo actual de importaciones para producir dicho reactivo. Aún en condiciones actuales, también hay un ahorro del 92,16 %. También es válido aclarar que el ahorro sería aún mayor, se ahorraría por concepto de transportación de la importación de los reactivos, el cual es significativo y no se sumó en el costo de importación por no contar con este dato pues varía en dependencia del proveedor.

Tabla 14. Indicadores económicos para la producción del reactivo hemoclasificador anti-D monoclonal en frascos de cultivo estándar y en sistema de botellas rotatorias.

Indicadores	Frascos de cultivo estándar	Sistema de botellas rotatorias
Costo Unitario	\$9,23	\$1,80
Demanda Nacional (Frascos 5 mL)	42 000	42 000
Costo anual MN	\$324 240,00	\$55 440,00
Costo anual CUC	\$63 420,00	\$20 160,00
Costo anual Total	\$387 660,00	\$75 600,00
Costo Importación	\$809 340,00	\$809 340,00
Costo/Beneficio	\$745 920	\$ 789 180

V. CONCLUSIONES

- 1.** En ambas líneas celulares en la fase de crecimiento exponencial el cultivo celular alcanzó una mayor producción de anticuerpos por lo que son directamente proporcionales.
- 2.** La caracterización biológica de la cinética de crecimiento del cultivo celular clase IgM clon HM-92 y la clase IgG clon D90/17 demostró que al séptimo día se obtenía el mayor título de anticuerpos por la técnica de hemaglutinación directa en tubos y en láminas. En el caso de la IgG con títulos de 2048 y en el caso de la IgM con títulos de 1024.
- 3.** Los sobrenadantes producidos a partir del cultivo de las líneas celulares HM-92 y D-90/17 poseen la actividad biológica necesaria para la formulación de un reactivo monoclonal anti-D, cumpliendo con las especificaciones de calidad establecidos por las agencias regulatorias.
- 4.** Se diseñó una formulación a partir de la mezcla de los sobrenadantes IgM clon HM-92 e IgG clon D-90/17 cumpliendo con los requisitos de calidad del CECMED para la producción de un reactivo monoclonal anti-D.
- 5.** Teniendo en cuenta las consideraciones económicas analizadas, la producción del reactivo hemoclasificador anti-D en LABEX, resulta ventajosa para el país dado por el ahorro considerado en USD, sustituyendo importaciones y la posibilidad de cubrir la demanda nacional.

VI. RECOMENDACIONES

- 1.** Realizar el estudio de estabilidad y evaluación de desempeño del producto terminado para presentar registro del producto ante el CECMED y cumplir demanda nacional.
- 2.** Proponer a la dirección de LABEX-CIM el uso del sistema de botellas rotatorias como la alternativa más eficiente y ventajosa desde el punto de vista económico para su utilización en la producción del reactivo hemoclasificador anti-D para cumplir con la demanda nacional.

BIBLIOGRAFIA.

1. Franco E. El control de la calidad de los análisis Inmuno hematológicos en la Región de las Américas. *Pan Am J Public Health.* 2003; 13(3):176-182.
2. Montaña RF, Romano EL. Anticuerpos Monoclonales y su aplicación en Hematología. *Interciencia.*1995; 20(4): 194-203.
3. Salvatella FM. Antecedentes históricos de la medicina transfusional. *Rev Mex Med Tran.* 2008; 1(1):7-9.
4. Izaguirre AR, de Micheli A. En torno a la historia de las transfusiones sanguíneas. *Rev Invest Clín Mex.* 2002; 54(6):552-558.
5. Moore S, Green C. The identification of specific Rhesus-polypeptide-blood-group-ABH-active-glycoprotein complexes in the human red-cell membrane. *Biochem J.* 1987; 244: 735-741.
6. León González G, Cruz C. Obtención de heterohibridoma productor de anticuerpos monoclonales de tipo IgM contra el antígeno D del sistema Rh. Banco Municipal de Sangre, Caracas. *Invest Clín.* 2007; 48(1): 57 – 67.
7. Rivero Jiménez RA. Anticuerpos Monoclonales Anti-Rh (D): Antecedentes y Estado Actual. *Rev Cubana Hematología Inmunología Hemoterapia.* 1999; 16(1):30-37.
8. Salmoral GE, Antunovic AF, Reyes OH, Reguera EL. Eritroblastosis Fetal. *Revista de Posgrado de la VIa Cátedra de Medicina.* 2007; 172:16-21.

9. Kumar H, Mishra DK, Sarkar RS, Jaiprakash M. Difficulties in Immunohaematology: The Weak D Antigen. *MJAFI*. 2005; 61, (4): 348-350.
10. Baptista-González HA. El sistema Rh, una mirada a fondo. *Rev Med Inst. Mexicana Seguro Soc*. 2005; 43 (1): 3-8.
11. Flegel W, Wagner F. Molecular Biology of partial D and weak D: Implication for Blood Bank practice. *Clin. Lab*. 2002; 48:53-59.
12. Wagner FF, Flegel WA. Review: the molecular basis of the Rh blood group phenotypes. *Immunohematol*. 2004; 20(1):23-36.
13. Caribbean Epidemiology Centre (CAREC). *Caribbean Regional Standards for Blood Banks and Transfusion Services*, 1 ed, 2007.
14. Le Van Kim C, Mouro I, Chtrif-ZAHAR B, Raynal V. Molecular cloning and primary structure of the human blood group RhD polypeptide. *Medical Sciences. USA*. 1992; 89:10925-10929.
15. Huang C, Liu P, Cheng J. Molecular biology and genetics of the Rh blood group system. *Semin Hematol*. 2000; 37: 450-65.
16. Westhoff CH, Michelle FI. The Structure and Function of the Rh antigen Complex antibodies monoclonal human against of IgG Production Rhesus (D) antigen. *Semin Hematol*. 2007; 44 (1):42-50.
17. Cotorruelo C, Biondi C. Aloimmunización a un Antígeno del Sistema Rh de alta Frecuencia. Buenos Aires. *MEDICINA*. 2006; 66: 46-48.

18. Liu, W. Molecular Configuration of Rh D Epitopes as Defined by Site-Directed Mutagenesis and Expression of Mutant Rh Constructs in K562 Erythroleukemia Cells. *Blood*. 1999; 94 (12):3986-3996.
19. Ludewig U, Von Wiren N, Rentsch D, Frommer WB. Rhesus factors and ammonium: a function in efflux? *Genome Biology*. 2001; 2(3):1010.1-1010.5.
20. Fuminori U, Eiji K and Shigenori I. Molecular analysis of Rh polypeptides in a family with RhD-positive and RhD-negative phenotypes. *Biochem J*. 1994; 299:207-211.
21. Molecular Configuration of Rh D. Disponible en: < <http://www.uni-ulm.de/%7Efwagner/RH/RB/AboutRB.htm>> [consulta: 21 de Mayo del 2008].
22. Foro bioquímico. Atlas de Hematología. Disponible en: <http://www.forobioquimico.com.ar/a_h_leucos.html> [consulta: 18 de Mayo del 2009].
23. Wagner FF. Rhesus Base. Disponible en: <<http://www.uni-ulm.de/~fwagner/RH/RB/AboutRB.htm>> [consulta: 12 de Enero del 2009].
24. Argall CL, Bale JM, Trenelman E. Presence of anti D antibody in the serum of D^U patient. *J Lab Clin Med*. 1953; 41:895-8.
25. Wagner FF, Frohmajer A, Ladewig B. Weak D alleles express distinct phenotypes. *Blood*. 2000; 95:2699-708.
26. Bonilla-Zavala R. Importancia de las pruebas cruzadas y de la búsqueda de anticuerpos. *Rev Med Inst Mex Seguro Soc*. 2006; 44 (2): 43-46.

27. Ballester S, Campa J, Pérez M. Manual de Prácticas Médicas - Hospital Hermanos Ameijeiras. Ministerio de Salud Pública. Grupo Nacional de Hematología y Banco de Sangre. 2005.
28. American Association of Blood Bank. Manual Técnico. 13 ed. Buenos Aires. Edigraf, 2001.
29. Huang C. Rh (RH) and Rh-gp (RHAG) Blood Group System. Laboratory of Biochemistry and Molecular Genetics, Lindsley F Kimball Research Institute New York Blood Center. Disponible en: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gv/rbc/xslcgi.fcgi?cmd=bgmutsystems_info&system=rh [consulta: 9 de Junio del 2010].
30. Kulkarni SS, Vasantha K, Gupte SC, Mohanty D, Ghosh K. Potential of commercial anti-D reagents in the identification of partial D variants in Indian population. Indian J Med Res. 2007; 125:641-644.
31. Barros C, Otta M, Wakim VL. Evaluation of anti-D reagents in the detection of weak D and partial D antigens. Rev Bras Hematol Hemoter. 2006; 28, (4): 269-274.
32. Garratty G. Do we need to be more concerned about weak D antigens? Transfusion. 2005; 45:1547-1551.
33. Martínez Solís M, Bencomo Hernández A, Rivero Jiménez R, Alfonso Valdés Y. Incidencia de fenotipos D débiles y D parciales en donantes de sangre de Guanabacoa. Rev Cubana Hematología Inmunología Hemoterapia. 1997; 13(2):120-123.

34. Mollison PL. Blood Transfusion In Clinical Medicine. 9 ed. Blackwell, Oxford, 1993:272-395. Disponible en: <http://www.Reactivo%20AntiD/books%20medicina%20transfusional.htm#PPA456.M1> > [consulta: 9 de Septiembre del 2008].
35. Rodríguez MH. El banco de sangre y la Medicina Transfusional. México, DF. Editorial Médica Panamericana, 2004:33-85.
36. Smith KA, Farata MF, Oroszlan S. Production and characterization of monoclonal antibodies to human interleukin 2: strategy and tactics. J Immunol. 1983; 131:1808-14.
37. Marcet S. Mecanismo de acción del anticuerpo monoclonal ES-78 contra la fasciolosis. Rev Cubana Med Trop. 2004; 56 (3): 203-207.
38. Jiménez Díaz Manuel E. Anticuerpos Monoclonales de Origen Humano. Rev Cost de Ciencias Médicas. 1996; 17 (2):61.
39. Glassy MC. Production methods for generating human monoclonal antibodies. Human antibodies and hybridomas. 1993; 4:154.
40. Merten O. Introduction to animal cell culture technology—past, present and future. Cytotechnology. 2006; 50:1-7.
41. Marx U. Monoclonal antibody production. ATLA 2000; 25:121-137.
42. Gavilondo JV. Anticuerpos monoclonales. Teoría y práctica. Ediciones Elfos La Habana, 1995:31-45.

43. Nedjma ZY, Mouro-Chanteloup I, D'ambrosio AM, Lopez C, Gane P, Le Van Kim C, et al. Rhesus B and Rhesus C glycoproteins: properties of facilitated Ammonium transport in recombinant kidney cells, Institut National de la Transfusion Sanguine, Paris. 2005; 391: 33–40.
44. Eagle H. Nutrition needs of mammalian cells in tissue culture. *Science*. 1955; 122: 501- 514.
45. Buttler M, Jenkins H. Nutritional aspects of the growth of animal cells in culture. *J. Biotechnology*. 1989; 12: 97-110.
46. Lambert K, Birt SJ, Spier R.E y Griffiths J.B. *Animal Cell Biotechnology*, Academia Press, London, 1985; 1:167- 193.
47. Omasa T, Higashiyama K, Shioya S, Ken S. Effects of lactate concentration on hybridoma culture in lactate-controlled fed-batch operation. *Biotechnology and Bioengineering*. 2004; 39(5): 556-564.
48. Ozturk S, Riley M, Palsson B. Effects of ammonia and lactate on hybridoma growth and antibody production. *Biotechnol Bioeng*. 1992; 39: 418.
49. Suzuki T, Yamane T, Shemizu S. Application of pH and pO₂ Probes During *Bacillus Caldoly ticus* Fermentation: An Additional Approach for improving a feeding Strategy. *Ferment Bioing*. 1990; 69:292-297.
50. Westhoff CM, Michelle FJ, Don-On DM, and Foskett JK. Identification of the Erythrocyte Rh Blood Group Glycoprotein as a Mammalian Ammonium Transporter. *The American Society for Biochemistry and Molecular Biology. Journal of Biological Chemistry*. 2002; 277 (15): 12499–12502.

51. Sathya R, Mathialagan A, Flora Bai B, Ramalingam K. Determinant factors for hybridmyeloma culture (H9r9) in the yield of anti-D impact of medium (IMDM and RPMI), serum (FCS) and cell density. J Biochem Tech. 2009; 1(2): 53-56.
52. Aiba S, Humprey AE, Millis NF. Biochemical Engineering. Ciencia Técnica. La Habana. Cuba, 1970:80-89.
53. Doran PM. Bioprocess Engineering Principles. Reactor Engineering. 1994; 13: 353- 371.
54. García J. Elementos de microbiología. Post-grado. Maestría en Procesos Biotecnológicos. 2004. CIGB-CUJAE. C. Habana. Cuba.
55. Natick MA. The Math works Inc. Optimization toolbox user's guide.2000.
56. González Martín O, Hernández Díaz P, Alfonso García L. Producción de suero anti-D químicamente modificado. Laboratorios Beterá. 2000.
57. [Anticuerpos monoclonales: desarrollo físico y perspectivas terapéuticas. 2006;10\(3\):186-197.](#) Disponible en: <http://www.infodoctor.org/www/meshd.htm?idos=29736> [consulta: 8 de Febrero del 2010].
58. Quimbiotec. Hemoderivados. Ministerio del poder popular para Ciencia tecnología e industrias intermedias. Disponible en: http://www.quimbiotec.com/demosite/saber_mas_antid.php [consulta: 23 de mayo del 2008].

59. [Judd WJ](#), [Moulds M](#), [Schlanser G](#). Reactivity of FDA-approved anti-D reagents with partial D red blood cells. Department of Pathology, University of Michigan, Ann Arbor, USA. *Immunohematology*. 2005; 21(4):146-8.
60. Wiener lab 2000. Anti-D (Rho) monoclonal IgG/ IgM. Disponible en: <http://www.wiener-lab.com.ar> [consulta: 15 de Junio del 2009].
61. Recomendaciones para la evaluación de los diagnosticadores para uso en inmunohematología. CECMED Resolución N° 5/97
62. Procederes para Bancos de Sangre y Servicios de Transfusión. Ministerio de Salud Pública. IHI-OPS. La Habana; Cuba, 2004.
63. Rivero RA, Perez L, Alvarez A, Torranzo Y, Serrano T, Magadán R. Evaluación de los reactivos hemoclasificadores monoclonales cubanos Hemo-CIM anti-A y Hemo-CIM anti-B en pacientes con VIH/SIDA. *Revista cubana de Hematología e Inmunología, Inmunología y hemoterapia*. 2000. 16(3):20-23.
64. ISO 9001. Sistemas de Calidad. Modelo para el aseguramiento de la calidad durante el diseño de producción, instalación y servicios posteriores a la venta, 2008.
65. Catálogo de Greiner-Bio-One. Disponible en: http://www.greinerbioone.com/es/row/articles/catalogue/articlegroups/1_11/ [Consulta: 10 de Junio del 2009].
66. Procederes Normalizados de Operación, para el conteo celular en cámara de Neubauer. LABEX-CIM, 2010.

67. Procederes Normalizados de Operación, para Medición de Inmunoglobulina G humana por el método de ELISA. CIM, 2006.
68. Catálogo de Sigma. Disponible en: <<http://www.sigmaaldrich.com/materials-science/material-science-products.html>> [Consulta: 10 de Junio del 2009].
69. Polyacrilamide gel electrophoresis of proteins and total protein in polyacrilamide gel: Western Blotting Technical Manual. Amersham International Plc, U.K, 1991: 7-11.
70. Procederes Normalizados de Operación, para Montaje de Electroforesis en gel de poliacrilamida SDS-PAGE. CIM, 2006
71. [Santa Cruz Biotechnology \(Catálogo\). Disponible en: <http://www.bionity.com/products/es/69145/>](http://www.bionity.com/products/es/69145/) [consulta: 09 de Junio del 2010].
72. [Antibody Source Book from ABD Serotec](http://www.newsletterarchive.org/2007/09/26/230424Bionity.COM+Newsletter+%28english%29,+09+26+2007). Catálogo, 2007. Disponible en: <<http://www.newsletterarchive.org/2007/09/26/230424Bionity.COM+Newsletter+%28english%29,+09+26+2007>> [consulta: 8 de Febrero del 2010].
73. Procederes Normalizados de Operación, para el llenado productos terminados. LABEX-CIM, 2010.
74. Jager V, Spier E, Griffiths JB, Meignier B. Production of Biologicals from Animals Cells in Culture. Ed Butterworth-Heinemann, Oxford.1991; 1:155-165.
75. Buenas Prácticas para la Producción de los Diagnosticadores, Regulación 20-2004. Cuba. Ed. CECMED. MINSAP, 2004.

76. Thorpe SJ, Fox B, Heath AB, Scott M, de Haas M, Kochman S, et al. An International Standard for specifying the minimum potency of anti-D blood-grouping reagents: evaluation of a candidate preparation in an international collaborative study. Blackwell Publishing. Vox Sanguinis. 2006; 90:131-139.
77. Gagnon P, Richieri R, Hensel F. IgM Purification. The Next Generation. 13th Annual Waterside Conference, Miami. 2008. Disponible en: <www.validated.com> [Consulta: 12 de Enero del 2009].
78. Bradley B, Doyle A, Kumpel BM. Human anti-RH(D) monoclonal antibodies reagents and hybridomas and methods of RH typing using anti-RH(D) monoclonal antibodies and reagents. Disponible en: <<http://www.freepatentsonline.com/5487891.html>> [Consulta: 10 de Junio del 2009].
79. International Standard for Minimum Potency of anti-D blood grouping reagents; WHO/BS/04. Rev 1, 2000.
80. BIOTEC Laboratories. Anti-D Monoclonal IgG & IgM Blend Blood Grouping Reagent. Disponible en <[www. Biotec.com](http://www.Biotec.com)> [Consulta: 10 de Junio del 2009].
81. Judd WJ, Moulds M, Schainser G. Reactivity of FDA approved monoclonal anti-D reagents with parcial D RBCs. Transfusion. 2002; 42:20.
82. Spinreact. Disponible en: <http://www.labmedica.es/industria/articulos/294724978/spinreact_incluye_antierpos_abd_serotec_en_estuches_de_diagnostico_clinico.html> [Consulta: 10 de julio del 2010].

83. Linear Chemicals.sL. Disponible en:
<http://www.linear.es/ficheros/archivos/880_34400-C.pdf> [Consulta: 10 de Julio del 2010].
84. Sueros Hemoclasificadores Anti-D (Rho). Disponible en:
<http://www.gtlab.com.ar/UserFiles/mediaManager/1/f92a98f15b023b6df477a34a07be9f42fa163707_9ab9230eca140bd39299d3af8d48d7aa6aafc7b5.pdf>
[Consulta: 10 de julio del 2010].
85. Chico E, Rodríguez G, Figueredo A. Bioreactors for Animal Cell. In: Castilho LR, Moraes AM, Augusto EFP and Butler M. Animal Cell Technology: From Biopharmaceuticals to Gene Therapy. Francys and Taylor. UK, 2007.
86. Edelman L. Los anticuerpos monoclonales en inmunohematología, interés científico, aplicaciones prácticas y aspectos económicos de los reactivos empleados para la determinación de los grupos sanguíneos. Organización de las naciones unidas para el desarrollo industrial (ONUDI). Simposio Latinoamericano sobre la sangre y sus derivados. Conference Room paper NRLA/83/117/18, Cartagena, Colombia, 2007.
87. Mieres J. Contabilidad, el proceso de cierre, los estados y el costo. 4 ed. La Habana: Editorial de ciencias sociales, 2005:285-289.

ANEXOS

Anexo 1: Certificado de Calidad de anti-D (IgM) clon: HM-92.
Molecular Technology GMBH (Moltech), Berlin, 2004



MolTech GmbH • Rudower Chaussee 29-31 (OWZ) • 12489 Berlin

CERTIFICATE OF QUALITY OF ANTI-D (COMPLETE IgM)

CLONE:	HM-92	
ISOTYPE:	human IgM	
ANTIGEN:	Rh ₀ (D) antigen of the Rhesus system	
APPLICATIONS:	Blood group typing in direct agglutination tests: <ul style="list-style-type: none">• slide test• tube test• microplate test	
CROSS REACTIVITY:	No reactivity with other Rhesus antigens	ok
PRODUCT PRESENTATION:	culture supernatant preserved with 0,1% sodium azide.	
QUALITY CONTROL:	each lot is tested for the specificity, titre and avidity in direct agglutination test with D ⁺ and D ⁻ red blood cells	Titer with D ⁺ 1:4096 With D ⁻ 0
TEST FOR MICROBIAL CONTAMINATION	Mycoplasma, bacteria, fungus are absent	ok
HANDLING AND STORAGE:	store at 2-8°C. Use for 1 year	

Dr. Je. Maximov

Date: 05.10.2004

MOLTECH GMBH
RUDOWER CHAUSSEE 29
D-12489 BERLIN, BRD
TEL: +49 30 63 92 66 20

Molecular Technology GmbH
Geschäftsführer: Dr. Jewgenii Maximov

Tel: +49 30 63 92 66 20
Fax: +49 30 63 92 66 22

Commerzbank Berlin Konto: 0103025
BLZ 120 400 00 S.W.I.F.T.: COBA DE 33

Anexo 2: Certificado de Calidad de anti-D (IgG) clon:D-90/17.
Molecular Technology GMBH (Moltech). Berlin. 2004

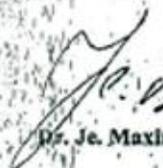


MolTech GmbH • Rudower Chaussee 29-31 (D12) • 12489 Berlin

**CERTIFICATE OF QUALITY
OF ANTI-D (INCOMPLETE IgG)**

CLONE:	D-90/17	
ISOTYPE:	human IgG1	
ANTIGEN:	Rh ₀ (D) and Rh ₀ (D ^u) antigens of the Rhesus system	
APPLICATIONS:	Blood group typing in: <ul style="list-style-type: none">• indirect antiglobulin (Coombs) test• direct agglutination with gelatine• direct agglutination with proteolytic enzyme (papaine, bromelaine, etc.) treated red blood cells (in automatic blood group typing systems)	
CROSS REACTIVITY:	no reactivity with other Rhesus antigens	ok
PRODUCT PRESENTATION:	culture supernatant preserved with 0,1% sodium azide	ok
QUALITY CONTROL:	each lot is tested for the specificity and titre in indirect antiglobulin test with D ⁻ , D ⁺ and D ^u red blood cells	Titer with D ⁺ 1: 2048 With D ⁻ 0
TEST FOR MICROBIAL CONTAMINATION	Mycoplasma, bacteria, fungies are absent	ok

HANDLING AND STORAGE: store at 2-8°C. Use for 1 year


MOLTECH GMBH
RUDOWER CHAUSSEE 29
D-12489 BERLIN, BRD
Dr. Je. Maximov TEL: +49 30 / 6392-8620

Date: 05.10.2004

Molecular Technology GmbH

Tel: +49 30 63 92 66 20

Commerzbank Berlin Konto: 0103305