



Laboratorio de Anticuerpos y Biomodelos Experimentales
Centro de Estudios de Biotecnología Industrial

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

**“Evaluación de mejoras a la
formulación del Hemoclasificador
anti-D a partir de las concentraciones
del Ingrediente Farmacéutico Activo”**

Diplomante: Lic. Didiet Cintra Pastó

Tutora: Dra.C. Suyén Rodríguez Pérez

Profesora Titular

Santiago de Cuba
2021



Dedicatoria

Dedicatoria

A mi familia y en especial, a mis padres

A mis compañeros

A mis amigos.

Agradecimientos

Agradecimientos

La perseverancia y el afán desmedido por aportar a la ciencia es un camino que no se recorre solo. Este resultado obtenido se debe al apoyo incondicional y a la gratitud de muchísimas personas, de las cuales sólo mencionaremos las más trascendentales:

A mis padres, por su amor incondicional y su apoyo desmedido a pesar de la distancia.

A mi tutora Suyen, por su valiosa asesoría, dedicación y apoyo; tutora exigente y apasionada de lo incontestable.

A los profesores de la Maestría, por ofrecer sus conocimientos, experiencias y motivaciones en el camino de la ciencia.

A mis compañeros de la maestría por compartir con ellos momentos únicos e inolvidables.

A mis compañeros y amigos del Labex, en especial a Grisel, Yisnelis, Mirley y Adriana por su ayuda y apoyo en la realización de este proyecto, por su paciencia y comprensión.

A los miembros del grupo PIF, por siempre estar disponibles cuando los necesito, por aceptarme como soy y darme la posibilidad de contar con su amistad.

A mi gran amigo Alejandro Miranda, que asumió este trabajo como suyo, me ofreció su ayuda incondicional y con su inteligencia contribuyó a la realización de este proyecto.

A todos los que de una forma u otra han contribuido a este éxito y que no he mencionado, les proporcione mi más sincero agradecimiento.

Resumen

Resumen.

El ior[®] Hemo-CIM anti-D, es un reactivo hemoclasificador empleado en Bancos de sangre y servicios de transfusiones para la identificación del sistema Rh. En el LABEX, este producto, se formula a partir de la dilución de los sobrenadantes de cultivo, que contienen los anticuerpos IgM (anti-D) e IgG (anti-D débil (D^u)). Este reactivo ha presentado una alta variabilidad en los valores de potencia de aglutinación y la avidéz, lo cual pone en riesgo el cumplimiento de los requisitos de calidad y la percepción del cliente sobre el reactivo. En este trabajo se realizó una evaluación del Hemoclasificador anti-D, basado en el criterio de concentración de los anticuerpos IgM e IgG en los sobrenadantes anti-D y anti-D débil (D^u) y su incidencia en los valores de potencia, avidéz a intensidad de la aglutinación según las especificaciones ESP-5032 y ESP-5033 en cada uno de los experimentos. Se evaluó además el efecto de los componentes del Buffer en estos indicadores de calidad. Se realizó la caracterización de ambas moléculas (IgM e IgG) por cromatografía (HPLC), demostrándose que el efecto más significativo sobre los parámetros de potencia y avidéz, resultó la concentración de IgM. Por lo tanto, se determinó la concentración mínima de IgM de 0.035 mg/mL en el formulado y un intervalo de IgG en $0,048 \pm 0,003$ mg/mL. Se determinó la influencia de las sales, principalmente en la avidéz, estableciendo una propuesta de 4 g/L para la formulación. Con la incorporación de la determinación de concentración de Ig y las propuestas de mejoras en cuanto a componentes del formulado, se logra mejorar el desempeño económico, por cuanto se incrementan los ingresos por producto final vendido.

Abstract

Abstract.

The ior® Hemo-CIM anti-D is a hemoclassifier reagent used in blood banks and transfusion services for the identification of the Rh system. In LABEX, this product is formulated from the dilution of culture supernatants, which contain IgM (anti-D) and IgG (anti-D débil (D^u)) antibodies. This reagent has presented a high variability in the agglutination potency values and avidity, which puts at risk the fulfillment of the quality requirements and the customer's perception of the reagent. In this work, an evaluation of the anti-D Hemoclassifier was carried out, based on the criterion of concentration of IgM and IgG antibodies in the anti-D and anti-D débil (D^u) supernatants and their incidence in the potency, avidity values the intensity of the agglutination according to the ESP-5032 and ESP-5033 specifications in each of the experiments. The effect of the Buffer components on these quality indicators was also evaluated. The characterization of both molecules (IgM and IgG) was carried out by chromatography (HPLC), showing that the most significant effect on the power and avidity parameters was the IgM concentration. Therefore, the minimum IgM concentration of 0.35 mg / mL in the formulation and an IgG range of 0.048 ± 0.003 mg / mL were determined. The influence of the salts was determined, mainly in the avidity, establishing a proposal of 4 g / L for the formulation. With the incorporation of the determination of Ig concentration and the proposals for improvements in terms of formulation components, it is possible to improve the economic performance, since the income per final product sold is increased.

Glosario de Términos

Ac: Anticuerpo

AcM: Anticuerpo monoclonal

Ag: Antígeno

BSA: Albúmina Sérica Bovina

CECMED: Centro para el Control Estatal de Medicamentos, Equipos y Dispositivos Médicos.

CIM: Centro de Inmunología Molecular

CL: Región constante de la cadena ligera

col.: Colaboradores

CUP: Peso Cubano

ESP: Especificación de Calidad

Fab: Fragmento de unión al antígeno

Fc: Fragmento cristizable

HPLC: Cromatografía Líquida de Alta Resolución

IFA: Ingrediente Farmacéutico Activo

Ig: Inmunoglobulina

IgG: Inmunoglobulina G

IgM: Inmunoglobulina M

LABEX: Laboratorios de Anticuerpos y Biomodelos Experimentales

MINSAP: Ministerio de Salud Pública

PAGE: Electroforesis en gel de poliacrilamida

PBS: Buffer fosfato salino

PM: Pesos Moleculares

PI: Punto isoeléctrico

PNO: Procedimiento Normalizado de Operación

Rf: Movilidad electroforética

SDS: Dodecil sulfato de sodio

SNC: Sobrenadante de cultivo

SNS: Sistema Nacional de Salud

SSF: Solución salina fisiológica

Tr: Tiempo de retención

VL: Región variable de la cadena ligera

Índice

Índice.

I. INTRODUCCIÓN.....	1
II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	5
II.1. Grupos Sanguíneos.....	5
II.1.1. Grupo sanguíneo RH.....	5
II.1.2. Bases Moleculares de los grupos sanguíneos.....	6
II.2. Las inmunoglobulinas: Estructura general e isotipos.....	7
II.3. Los Anticuerpos Monoclonales.....	10
II.3.1. Producción de anticuerpos monoclonales: Hibridomas.....	11
II.4. La Hemaglutinación.....	12
II.5. Métodos de separación, identificación y cuantificación de anticuerpos.....	13
II.5.1. La Separación Cromatográfica.....	13
II.5.2. La Electroforesis en Gel de Poliacrilamida.....	14
II.5.3. La Espectroscopia de absorción UV-Visible.....	16
II.6. Formulación de productos biotecnológicos.....	17
II.7. Reactivo Hemoclasificador anti-D.....	18
III. MATERIALES Y MÉTODOS.....	21
III.1. Características generales de la investigación.....	21
III.2. Análisis Histórico de los parámetros de calidad de los Formulados de anti-D producidos en LABEX.....	21
III.3. Determinación de los parámetros de calidad en sobrenadantes y formulados. Técnicas de hemaglutinación.....	22
III.3.1. Determinación de Potencia.....	22
III.3.2. Determinación de intensidad.....	23
III.3.3. Determinación de Aidez por la técnica de aglutinación directa en láminas.....	23
III.4. Evaluación de los componentes de la Formulación.....	23
III.4.1. Efecto de la concentración de IgM (Experimento 1):.....	24
III.4.2. Efecto de la concentración IgG (Experimento 2):.....	24
III.4.3. Efecto de la concentración de sales (Experimento 3):.....	25
III.5. Separación e identificación de las moléculas de IgM e IgG en los sobrenadantes anti-D.....	26

III.5.1. Separación por Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC) de las moléculas de IgM e IgG.	26
III.5.2. Identificación de las moléculas de IgM e IgG por la Técnica de Electroforesis.	27
III.6. Procesamiento de los Sobrenadantes anti D y anti-D débil (D ^u) para evaluar rangos críticos de formulación.	28
III.6.1. Propuesta de cuantificación de las moléculas de Inmunoglobulinas IgM o (IgG) en los sobrenadantes de cultivo anti-D y anti-D débil (D ^u).....	28
III.6.2. Determinación de la Concentración Crítica de IFA.	29
III.7. Análisis Estadístico.....	30
IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	31
IV.1. Análisis histórico de la calidad de los sobrenadantes anti-D producidos en labex.....	31
IV.2. Evaluación de la formulación del hemoclasificador anti-D.....	33
IV.2.1. Efecto de la cantidad de sobrenadante anti-D (IgM).....	33
IV.2.2. Efecto de la cantidad de sobrenadante anti-D débil (D ^u) (IgG).	36
IV.2.3. Efecto de la concentración de sales en los formulados.	37
IV.4. Determinación del rango de concentración crítica de las inmunoglobulinas para las formulaciones del Hemoclasificador.....	45
IV.4.1. Cuantificación de las moléculas de IgM e IgG en los sobrenadantes de cultivo.....	45
IV.4.2. Determinación del rango de concentración crítica en la IFA anti-D débil (D ^u)..	47
IV.6. Valoración económica del procedimiento propuesto para la formulación del hemoclasificador anti-D.	49
V. CONCLUSIONES.	51
V. RECOMENDACIONES.	52
VI. BIBLIOGRAFÍA.....	53

Introducción

I. INTRODUCCIÓN.

El desarrollo de la Biotecnología Moderna, en gran medida ha estado estrechamente vinculado a la Inmunología, mediante la generación de pruebas diagnósticas, fármacos y vacunas, los que son muy útiles en la profilaxis, diagnóstico y tratamiento de enfermedades infecciosas. Actualmente los productos derivados de la Inmunobiotecnología en una “dimensión industrial” están desplazando a los productos químicos y farmacéuticos tradicionales, no sólo por su efecto positivo en la salud, sino también debido a que son ecológicamente sustentables y mayores generadores de riquezas comerciales (Abhyankar y col., 2012).

Las nuevas capacidades tecnológicas de desarrollo y producción de moléculas relacionadas con el sistema inmunitario, han conducido a la comercialización de una extraordinaria diversidad de productos, teniendo en cuenta fundamentalmente su naturaleza biológica, dentro de los que se destacan: los interferones, citoquinas, anticuerpos y vacunas, entre otros (Tripathi y Sharma, 2017).

Por otro lado, en el siglo pasado, el estudio sistematizado de la sangre, los progresos científico-técnicos y los descubrimientos relacionados con los grupos sanguíneos y el factor Rh permitieron disminuir las reacciones adversas por incompatibilidad con la sangre, lo cual produjo el inicio de la medicina transfusional, recurso indispensable para todas las especialidades médicas, clínicas y quirúrgicas, por tanto, de uso frecuente en la práctica cotidiana.

En la actualidad existen 26 sistemas de grupos sanguíneos, de los cuales los que adquieren mayor interés en su tipificación, debido a que juegan un importante papel en diferentes ramas de la medicina de forma general, son el Sistema ABO y Rh. Los sistemas sanguíneos se clasifican en dependencia del antígeno que se expresa en la superficie de los eritrocitos. En adición, 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 complejos (Landsteiner y Wiener, 1940; Mitra y col., 2014).

La correcta tipificación de las muestras sanguíneas y la detección de anticuerpos irregulares en todas las donaciones de sangre constituyen una parte crucial del proceso de garantizar que la transfusión cumpla con sus objetivos terapéuticos, sin provocar efectos indeseados, algunos de los cuales podrían poner en riesgo la vida del paciente. Por lo tanto, la obtención de resultados correctos en las técnicas inmunohematológicas aplicadas de forma

generalizada para constatar la exacta caracterización de las unidades de sangre o de sus componentes, es fundamental para garantizar una buena asistencia transfusional. Son varios los aspectos que deben controlarse para conseguir resultados correctos (Decaro y col., 2010).

La creciente demanda de calidad y seguridad por parte de los pacientes y de la sociedad en general, en relación con el tratamiento transfusional, ha impulsado esfuerzos continuos para mejorar los reactivos hemoclasificadores. El uso de reactivos adecuados específicos y validados constituye la herramienta más efectiva para la obtención de resultados inequívocos de la presencia o ausencia del antígeno, especialmente antes de una transfusión o en mujeres en edad fértil por la alta probabilidad de aloinmunización y/o reacciones post-transfusionales fatales (Salinas, 2015).

La investigación en inmunología ha influido decisivamente en el conocimiento de muchos aspectos importantes de la biología y la medicina, y los anticuerpos han sido pieza fundamental, ya que son macromoléculas con alta especificidad que hacen posible la realización de toda una gama de estudios finos. Con la introducción de la tecnología de anticuerpos monoclonales por Koller y Milstein, ha sido posible disponer de anticuerpos con especificidades predefinidas y en cantidades prácticamente ilimitadas (Kóler y Milstein, 1975). Estos 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. 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 (Holzlohner y Hanack, 2017).

La rápida expansión y uso de las inmunoglobulinas obtenidas de esta forma, ampliaron su introducción en la investigación básica, las técnicas diagnósticas, la serología y los procesos industriales. Por sus ventajas, los AcM se emplean ya no sólo como fin productivo, sino también en la purificación y caracterización de diversas moléculas, la manipulación de la fisiología y bioquímica celulares, la definición de fenotipos y subpoblaciones celulares, el tipaje de antígenos de tejidos y de grupos sanguíneos, la demostración de daños tisulares y en la facilitación del transplante de órganos y tejidos, entre otros campos (Gavilondo, 1995; Zhang, 2012). Estas ventajas de los AcM se expresan en el uso cotidiano y a nivel comercial.

Demostrando su competitividad, dichos productos bien pueden probar ser superiores que los métodos tradicionales empleados para identificar algunas enfermedades infecciosas, alteraciones hormonales, o la presencia de neoplasias. También constituye la base de los diagnosticadores para serotipaje que hoy se comercializan en el mundo. 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 transfusiones. Actualmente se pueden encontrar en el mercado reactivos anti-D basados en un AcM del tipo IgM, o formulados con dos AcM (IgM + IgG) (Hernández y col., 2000; Judd y col., 2005).

Ante el retiro en Cuba, por las autoridades sanitarias nacionales, de los sueros Anti-Rh obtenidos en los bancos de sangre a partir de donantes voluntarios (sueros policlonales), se establece en el LABEX un sistema productivo *in vitro* de anticuerpos monoclonales específicos para obtener un reactivo hemoclasificador para el sistema Rh Anti-D (Heredia, 2015).

En la actualidad el procedimiento para la tipificación del sistema Rh en nuestro Sistema Nacional de Salud (SNS), es a través del Hemoclasificador ior[®] Hemo-CIM anti-D producido en el propio LABEX, el cual es de amplio uso en el sistema de Bancos de sangre y también a nivel de laboratorios clínicos. Dentro de sus principales aplicaciones incluye la evaluación cualitativa de la hemorragia feto materna, la detección de antígenos débiles y en la tipificación del antígeno D eritrocitario como prueba pre-transfusional de cabecera (Rivero, 2000).

Por otra parte, y a pesar del establecimiento y consolidación de esta tecnología (*in vitro*), el reactivo ha presentado variabilidad biológica que se manifiesta en sus valores de potencia y avidéz, más que en la intensidad, mostrado en los lotes del producto; referido a los requisitos de calidad aprobados por el Centro Evaluador y de Control de Medicamentos (CECMED) y detectados en ensayos intra e inter-laboratorios y encuestas de postcomercialización. Teniendo en cuenta estos antecedentes se formula el siguiente **problema científico**:

“El Hemoclasificador anti-D ha presentado variabilidad en su desempeño como diagnosticador, específicamente en los parámetros potencia de aglutinación y avidéz, lo cual pone en riesgo el cumplimiento de los requisitos de calidad y la buena percepción del cliente sobre el reactivo”.

En función de este problema se formuló la siguiente **HIPÓTESIS**:

“Si se estudian variantes de la formulación del Hemoclasificador anti-D, basado en las concentraciones de los IFA anti-D / anti-D débil (D^u) y sus otros componentes, podría mejorarse la actividad biológica del producto”.

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

OBJETIVO GENERAL:

“Proponer una variante de formulación del Hemoclasificador anti-D tomando como base la concentración de sus componentes principales”.

Para su cumplimiento se trazaron los siguientes **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**:

- Analizar las formulaciones realizadas en el proceso productivo del Hemoclasificador anti-D en LABEX del 2018-2020, en base a su actividad biológica, para detectar la(s) causa de las fallas de calidad.
- Evaluar la influencia de los principales componentes de la formulación en los indicadores de calidad del hemoclasificador anti-D: IFA (IgM e IgG), sales.
- Caracterización de los sobrenadantes para determinar rangos de concentraciones críticas de IgM o IgG para la formulación del Hemoclasificador anti-D.
- Proponer mejoras para la formulación del *ior*[®] *Hemo-CIM anti-D*, evaluando su impacto económico

Revisión Bibliográfica

II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.

II.1. Grupos Sanguíneos.

Los grupos sanguíneos humanos se descubrieron a principios del siglo XX por Karl Landsteiner, el Premio Nobel de Medicina en 1930, y de acuerdo con la Sociedad Internacional de Transfusiones Sanguíneas (*International Society of Blood Transfusion*) se define como un método de clasificación de la sangre basado en la presencia o ausencia de varias proteínas antigénicas (**antígeno**) en la superficie de los glóbulos rojos.

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 sistema, denominado ABO, fue identificado por Landsteiner en 1901. En él existen cuatro fenotipos principales de grupos sanguíneos: A, B, O y el AB. Su importancia es decisiva para la transfusión inocua de sangre o glóbulos. Las transfusiones de sangre entre grupos incompatibles pueden provocar una reacción inmunológica que puede conducir al hemólisis, anemia, fallo renal, shock, o muerte (Decaro y col., 2010).

El antígeno Rh fue descubierto en 1941 por los hematólogos Landsteiner y Wiener. Utilizando sueros de conejos y cobayas inmunizados mediante glóbulos rojos del mono *Rhesus*, comprobaron que los anticuerpos contenidos en los sueros además de aglutinar los glóbulos rojos del *Rhesus*, producían ese mismo efecto en el 85% de la población blanca de Nueva York, que fue sobre la que se hizo la prueba (Sandoval, 2014). 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 (Baptista, 2005).

II.1.1. Grupo sanguíneo RH.

El sistema Rh es uno de los sistemas sanguíneos con gran importancia clínica por su alto polimorfismo compuesto por más de 50 antígenos en la membrana del eritrocito, siendo los más importantes D, C, c, E y e, los cuales determinan la expresión en la membrana de los hematíes de los antígenos correspondientes (C, D y E) (Flegel y Wagner, 2002).

De estos antígenos el más importante es el aglutinógeno D, reconocido por ser el principal causante de las reacciones postransfusionales graves, enfermedad hemolítica del recién nacido y anemia hemolítica autoinmune (Mollison y col., 1997). 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* (Huang y Cheng, 2000).

II.1.2. Bases Moleculares de los grupos sanguíneos.

La expresión de los antígenos del sistema Rh en la membrana eritrocitaria requiere la presencia de una glucoproteína asociada, denominada RhAG. Las proteínas Rh, la glucoproteína RhAG y otras proteínas accesorias (LW, CD47, GPB y Banda 3) se asocian en la membrana del glóbulo rojo formando el complejo Rh. El núcleo central de este complejo está compuesto por un tetrámero formado por dos moléculas RhAG y dos monómeros RhD o RhCcEe estabilizado por asociaciones entre los dominios amino terminal y carboxilo terminal. Las proteínas accesorias se asocian a este tetrámero por uniones no covalentes (Cartron y col., 1998).

El antígeno D es un mosaico compuesto por al menos 24 epitopes diferentes expresados sobre el polipéptido RhD. El polimorfismo C/c está asociado principalmente a la sustitución del aminoácido Ser por Pro en la posición 103 presente en el segundo dominio extracelular, mientras que el polimorfismo E/e está asociado a una sustitución del aminoácido Pro por Ala en la posición 226 en el cuarto dominio extracelular de la proteína RhCcEe (Avent y Reid, 2001).

Los antígenos del sistema Rh pueden presentar alteraciones en su expresión dando origen a fenotipos débiles, parciales o delecionados. Estos fenotipos son los productos de las variantes alélicas de los genes RH, debido a que ocurre una mutación puntual de los alelos RHD/RHCE o a una supresión de su expresión fenotípica ocasionada por los haplotipos C en posición trans, heredada junto con el fenotipo Rh D (Huang y col., 2000; Pham y col., 2014).

Los glóbulos rojos con fenotipo D débil (D^u) poseen un número de sitios antigénicos D menor que los eritrocitos RhD positivos. Los fenotipos D parciales se caracterizan por la ausencia de uno o más epitopes del antígeno D asociado en algunos casos con una expresión antigénica débil. Estas variantes no reaccionan con algunos anticuerpos anti-D monoclonales o son identificadas porque los individuos son capaces de producir aloanticuerpos contra los epitopes que no poseen (Wagner y col., 2004).

La aloinmunización causada por anti-D se debe a que este antígeno presenta una alta inmunogenicidad por la presencia de 10.000 a 30.000 sitios D por cada hematíe, mientras

que los pacientes que poseen un antígeno D débil poseen menos de mil hasta 30 sitios D por cada hematíe (Körmöczy y col., 2014). Es por tal motivo que un paciente Rh D negativo que sea transfundido con sangre D débil puede generar un anti-D y por consiguiente una reacción transfusional.

Las funciones biológicas que desempeñan las proteínas del sistema Rh no están aún bien definidas. Estudios recientes sugieren que participan en el transporte de amonio e incluso se identificaron proteínas no eritroides pertenecientes a la familia Rh (Avent y Reid, 2000).

II.2. Las inmunoglobulinas: Estructura general e isotipos.

Las inmunoglobulinas (Ig) son grupos heterogéneos de glucoproteínas que contienen una sucesión constante de aminoácidos, sintetizadas en las células plasmáticas. Se encuentran en las membranas celulares, plasma sanguíneo y líquido orgánico y actúan sobre diferentes reacciones alérgicas generando reacciones citotóxicas y reacciones complejas de hipersensibilidad. Estas son proteínas plasmáticas sintetizadas por los linfocitos B, responsables de la respuesta inmune humoral, ante la presentación de un antígeno que reacciona de forma específica con ellas, además de que actúan como anticuerpos para la defensa particular del organismo (Abbas y col., 2018).

Las inmunoglobulinas están constituidas por cuatro cadenas de polipéptidos, dos cadenas de elevado peso molecular (50-70 kDa) denominadas pesadas o cadenas H (*heavy*) y dos de bajo peso molecular, alrededor de 25 kDa, denominadas ligeras o cadenas L (*light*) (**Figura 1**) (Paniagua, 2017). Las cuatro cadenas están unidas entre sí unidas por puentes disulfuro (S-S) (Tripathi y Sharma, 2017) (**Figura 2**).

En cada cadena H o L se distinguen dos regiones: una hipervariable, en ambos extremos de las mismas, que es la zona de reconocimiento del antígeno (Fab) y una región constante (Fc o fragmento cristalizable), más inespecífica, relacionada con la activación del complemento, la fagocitosis, la producción de linfocinas y la estimulación de la proliferación de los linfocitos B. La región variable es distinta para cada tipo de inmunoglobulina y tiene dos lugares de unión al antígeno (bivalencia) (Figura 1). La región variable es responsable del tipo de reacción antígeno-anticuerpo y su estructura sirve de base para distinguir entre las clases de inmunoglobulinas (Yujra y Tito, 2011) (Padullés y col., 2013; Tortora y Grabowski, 2002).

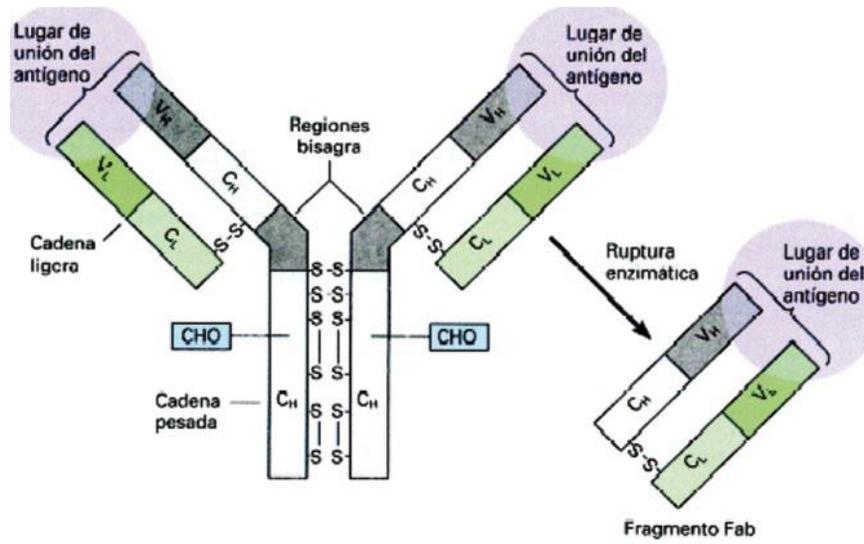


Figura 1. Estructura de las Inmunoglobulinas.

Fuente: *Texto Ilustrado de Biología Molecular e Ingeniería Génica. Conceptos, técnicas y aplicaciones en técnicas de la salud.* Luque J, Herráez A. Ediciones Harcourt. Madrid, 2001.

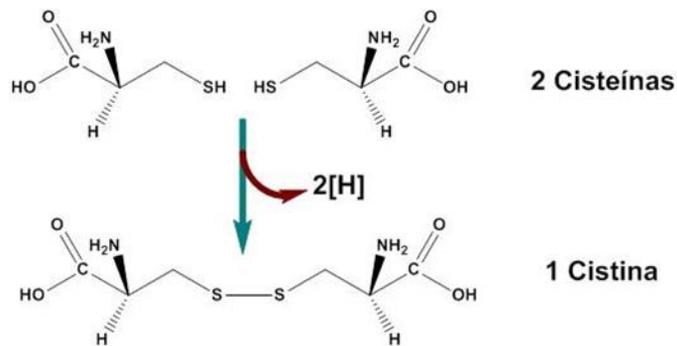


Figura 2. Representación del Puente Disulfuro.

La región variable de la cadena pesada se encuentra formada por un único dominio de inmunoglobulina. Esta región posee una secuencia de 110 aminoácidos, y será diferente dependiendo de la especificidad del anticuerpo por un antígeno (Parham, 2014). La región constante de las cadenas pesadas ϵ y μ están formadas por cuatro dominios, mientras que las que corresponden a α , γ , δ tienen tres. Entonces, cada región constante será diferente para cada tipo de inmunoglobulina, pero común a las inmunoglobulinas de un mismo tipo (<https://www.lifeder.com/inmunoglobulinas/>).

➤ **Inmunoglobulina M (IgM).**

La inmunoglobulina M es el anticuerpo principal en la respuesta inmune primaria. Esta proteína plasmática aparece en los linfocitos B *naïve* unida a su membrana plasmática. Es la primera que aparece en el curso de la evolución filogénica y oncogénica, donde el feto ya puede sintetizarla en determinadas circunstancias, y generalmente en los niños y adultos es la primera en aparecer tras el primer contacto con un antígeno. Interviene en la lisis de microorganismos que se encuentran en la sangre a través de la activación del sistema de complemento por la vía clásica y neutralización (Abbas y col., 2018; Liébana, 2000).

Es un pentámero cuya cadena pesada es μ y su peso molecular es alto, aproximadamente 750 kDa. Está compuesta por cinco monómeros, formado cada uno por cuatro cadenas, unidas por puentes disulfuro y por la cadena J; y cada monómero va a pesar alrededor de 150 kDa y al poseer cuatro cadenas, dos cadenas pesadas y dos cadenas ligeras, lo que va a ofrecerle diez posibles sitios de unión y reconocimiento (**Figura 3**).

La secuencia de aminoácidos de su cadena pesada es de 440 en su fracción Fc. Se encuentra predominantemente en el suero sanguíneo, representando un 10 a 12 % de las inmunoglobulinas. Las IgM poseen un solo subtipo (Parham, 2014).

➤ **Inmunoglobulina G (IgG).**

La **inmunoglobulina ganma** (designada como IgG) es una de las cinco clases de anticuerpos humorales producidos por el organismo. Se trata de la inmunoglobulina predominante en los fluidos internos del cuerpo, como son la sangre, el líquido cefalorraquídeo y el líquido peritoneal (líquido presente en la cavidad abdominal). Esta proteína especializada es sintetizada por el organismo en respuesta a la invasión de bacterias, hongos y virus. Es la inmunoglobulina más abundante del suero, con una concentración de 600-1800 mg por 100 mL (Paniagua, 2017; Devlin, 2004).

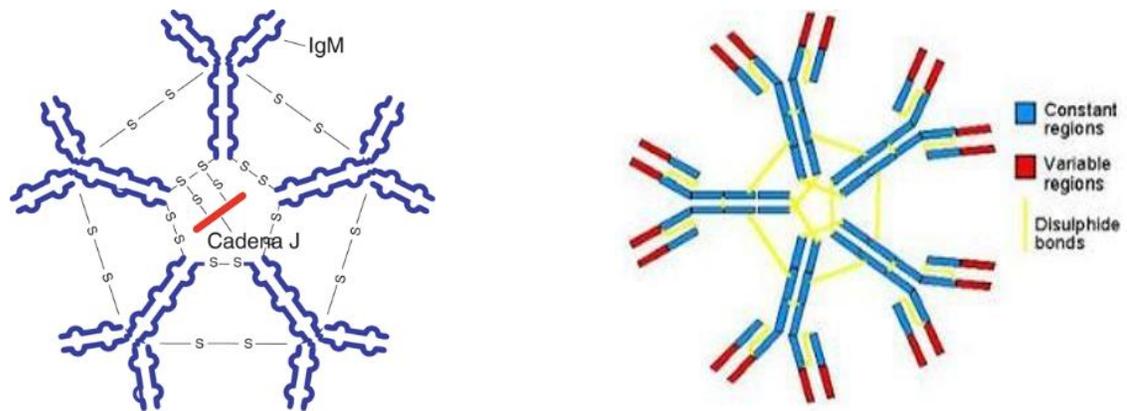


Figura 3. Representación de la molécula de IgM. Fuente: *R. Paniaga. Biología celular y molecular. 4ta Edición, McGraw-Hill Education. Derechos reservados.*

La IgG es la inmunoglobulina más pequeña, posee una secuencia de 330 aminoácidos en su segmento Fc y un peso molecular de 150 000 Daltons, de los cuales 105 000 corresponden a su cadena pesada (<https://www.lifeder.com/inmunoglobulinas/>). Constituye el 80 % de las inmunoglobulinas totales y es la única clase de inmunoglobulina que atraviesa la placenta, transmitiendo la inmunidad de la madre al feto de manera natural y pasiva (Abba y col., 2018). Posee una cadena pesada gamma y se presenta en forma unimolecular o monomérica. Cambios mínimos en la secuencia de aminoácidos de su cadena pesada determinan su división en subtipos: 1, 2, 3 y 4. Su tiempo de vida media es de aproximadamente 25 días (Parham, 2014).

Una de las herramientas más poderosas para la búsqueda de marcadores de superficie, y que permitió de manera definitiva poner de manifiesto la heterogeneidad de los linfocitos en general, y de los linfocitos B en particular, fue la descripción de los anticuerpos monoclonales.

II.3. Los Anticuerpos Monoclonales.

Las inmunoglobulinas o anticuerpos (Ac) son componentes importantes y multifuncionales del sistema inmune, cuya principal función es mediar las interacciones que se suscitan entre moléculas antigénicas y una gran variedad de efectores de respuestas celulares y humorales en el organismo; por tanto, son capaces de destruir o bloquear dianas celulares específicas (Levene y col, 2005; Machado y col., 2006).

Un anticuerpo monoclonal es un anticuerpo homogéneo producido por una célula híbrida producto de la fusión de un clon de linfocitos B, descendiente de una sola y única célula madre, y una célula plasmática tumoral. Los anticuerpos monoclonales (Mab, del inglés *monoclonal antibody*), son anticuerpos idénticos porque son producidos por un solo tipo de célula del sistema inmune, es decir todos los clones proceden de una sola célula madre. Es posible producir anticuerpos monoclonales que se unan específicamente con cualquier molécula con carácter antigénico. Este fenómeno es de gran utilidad en bioquímica, biología molecular y medicina (Gavilondo, 1995).

El advenimiento de la tecnología del hibridoma, ha facilitado la síntesis de los primeros anticuerpos monoclonales (AcMs). Estos preparados de AcMs contienen una mezcla de inmunoglobulinas idénticas, producidas por linfocitos B originarios de un mismo clon y que, por lo tanto, reconocen el mismo epítipo: parte de una macromolécula que es reconocida

por el sistema inmunológico, específicamente por anticuerpos, células B o células T (García, 2011).

Además de su elevada especificidad, es necesario reconocer otros dos atributos que han contribuido al éxito de los AcM como reactivos analíticos. En primer lugar, los AcM son sustancias químicamente definidas y su naturaleza y estructura se conoce en detalle. Ello permite la formulación de preparaciones estables y facilita enormemente los procedimientos para su conjugación a trazadores tales como sustancias fluorescentes, enzimas, radioisótopos, oro coloidal y moléculas electrónicamente densas (ferritina). En segundo lugar, son reactivos susceptibles de ser preparados en forma pura, en condiciones muy controladas y en grandes cantidades (Yujra y Tito, 2011).

En lo concerniente a aplicaciones biomédicas, los AcM de primera generación han desplazado de muchos usos a los anticuerpos policlonales. Han permitido el desarrollo de nuevas y numerosas pruebas diagnósticas y son hoy día los reactivos de elección para aplicaciones analíticas *in vitro* tanto desde el punto de vista médico-clínico, como en distintas áreas de investigación en las biociencias. Ejemplo de estas aplicaciones es la tipificación de grupos sanguíneos humanos, de crucial importancia en transfusiones y trasplantes, que se realiza en la actualidad mediante pruebas de aglutinación en las que se utilizan AcM (Machado y col., 2006).

II.3.1. Producción de anticuerpos monoclonales: Hibridomas.

Los investigadores Niels K. Jerne, Georges Köhler y Cesar 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* (Kóler y Milstein, 1975).

Por esta aportación a la ciencia estos tres investigadores recibieron el premio Nobel de Medicina en 1984. Estas células fusionadas híbridas (hibridomas), pueden multiplicarse rápida e indefinidamente y pueden producir anticuerpos. Los hibridomas son cultivados para obtener diferentes y determinadas colonias, las cuales producen sólo un tipo de anticuerpo

(isotipo). Los anticuerpos de diferentes colonias son analizados para conocer su capacidad de unirse a un antígeno determinado (Holzlohner y Hanack, 2017).

➤ **Heterohibridomas.**

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.

Se demostró que los linfocitos B de los donantes sensibilizados con hematíes Rh(D) positivos pueden producir anticuerpos anti-Rh(D) en cultivos de tejidos después de una infección con el Virus de Epstein Barr (VEB), pero estas líneas celulares linfoblastoides B (LCL-B) usualmente cesan la producción del anti-Rh0 (D) después de unos pocos meses en cultivo (Boylston y col., 1980; Melamed y col., 1985).

Para lograr una mayor estabilidad de líneas celulares secretoras basadas en células B humanas se trabajó en la conformación de heterohibridomas humano-ratón a partir de la fusión de líneas de mieloma de ratón y linfocitos B de sangre periférica transformados por EVB (Zhang y col., 2012).

II.4. La Hemaglutinación.

La hemaglutinación es la agrupación macroscópicamente visible de los hematíes o glóbulos rojos, causada por interacciones antígeno-anticuerpo, que forman puentes entre ellas. Se trata de una respuesta biológica común frente determinados microorganismos, como los virus, y se emplea rutinariamente en técnicas de tipado de grupos sanguíneos o en la determinación de cargas virales (Cortés y col., 2014).

La hemaglutinación se debe a la presencia de antígenos en los eritrocitos, antígenos capaces de reaccionar con anticuerpos o bien con proteínas específicas de algunos microorganismos (entre las que destacan las hemaglutininas).

Los glóbulos rojos están rodeados de cargas electronegativas, las que sirven para mantener los eritrocitos constantemente separados unos de otros evitando así, agregación espontánea y permitiendo que los glóbulos rojos tengan mayor área de superficie y así adecuado transporte de oxígeno. También los eritrocitos están rodeados de cationes, formando así una capa doble o nube iónica que rodea al eritrocito y viaja con este como que formara parte del mismo. Esta carga eléctrica que mantiene los eritrocitos separado el

uno del otro es medida en el margen de la nube iónica y este punto se llama "*shear plane*". La carga eléctrica media en este punto se denomina potencial Zeta (Pollack y col., 1970).

Cuando los anticuerpos van a formar puentes entre dos o más eritrocitos (u otras partículas cargadas) en una aglutinación, deben vencer estas fuerzas de repulsión. Dado que las fuerzas dependen en gran medida de la distancia, los anticuerpos de tipo IgM son más eficientes para aglutinar en comparación con los anticuerpos IgG (u otros isotipos no poliméricos). Ello se debe a que la IgM, por su mayor tamaño molecular, permite mantener una mayor distancia entre las superficies, en comparación con la IgG, reduciendo de esta forma el potencial Z (García, 2004) (**Figura 4**).

La aglutinación de eritrocitos es el fenómeno *in vitro* más comúnmente utilizado en serología de Banco de Sangre (Pico y col, 1997). Para su visualización, se promueven dos fases:

- 1)- **Sensibilización:** en la cual el anticuerpo se adhiere físicamente al antígeno específico de la superficie de los glóbulos rojos (con o sin fijación de complemento) y no es visible.
- 2)- **Aglutinación de eritrocitos**, visible *in vitro*, en el que se forman puentes o uniones entre eritrocitos sensibilizados. Si los anticuerpos son IgM la aglutinación ocurre inmediatamente después de la sensibilización. Para demostrar sensibilización por anticuerpos IgG es necesario utilizar soluciones o medios potenciadores.

Los fenómenos de sensibilización y aglutinación están influenciados por varios factores; temperatura, concentraciones relativas de Ag-Ac, pH, tiempo de incubación (necesario para que la reacción antígeno anticuerpo alcance un equilibrio), fuerza iónica del medio, etc (Bautista, 2005). Por ejemplo, la temperatura para reacción óptima de anticuerpos varía; para la IgG tiende a reaccionar mejor a 37 °C, mientras que la IgM a temperaturas de 20°C - 25 °C o temperaturas frías (Bautista, 2005).

Existen determinados indicadores de la hemaglutinación, que permiten una valoración semicuantitativa en los métodos de análisis basados en este fenómeno (Bencomo y col., 2011).

➤ **Potencia de la Hemaglutinación.**

Se refiere a la intensidad de aglutinación que presenta el antisuero al reaccionar con su antígeno específico. La potencia de los reactivos para el agrupamiento sanguíneo está expresada por el título o proporción de aglutinación observada en una serie de diluciones, frente a una suspensión de glóbulos rojos.

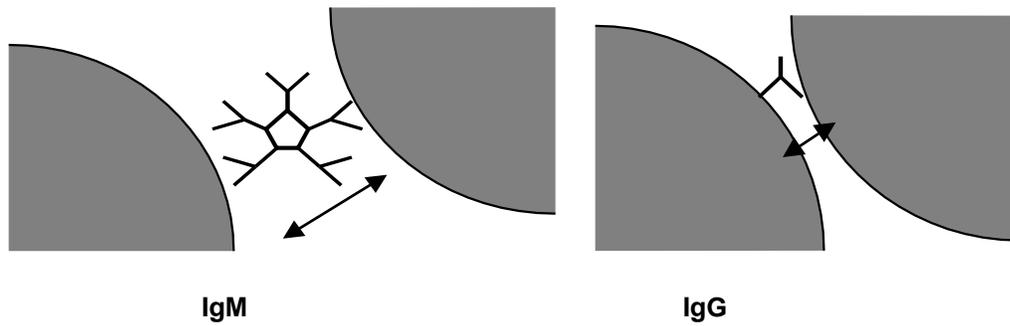


Figura 4: Comparación entre anticuerpos IgM e IgG en la aglutinación de partículas (ej. eritrocitos) que se repelen por sus cargas negativas de superficie (Potencial Z). Los anticuerpos IgM, por ser pentaméricos, permiten la formación de puentes entre dos células con una distancia mayor entre sus superficies, en comparación con los anticuerpos IgG u otro monoméricos.

➤ **Avidez.**

La avidéz es el tiempo máximo en segundos (s) que tarda en reaccionar un anticuerpo con su antígeno correspondiente a temperatura ambiente (Farmacopea, 2014). También se puede definir como la fuerza de unión real entre un antígeno y su correspondiente anticuerpo, que depende tanto de la afinidad entre los epítomos y los paratopos, como de la valencia del antígeno y del anticuerpo.

La velocidad de formación del complejo antígeno-anticuerpo varía con el número de moléculas de anticuerpo presentes en el medio y con el número de sitios antigénicos presentes en cada célula. Al aumentar la cantidad de anticuerpos en el medio puede aumentar la sensibilidad de la prueba, asimismo, al aumentar la proporción suero/eritrocitos se proveen más anticuerpos por zonas antigénicas (Alfonso y Bencomo, 2001; Bautista, 2005).

La avidéz es quizá una medida más informativa de toda la estabilidad o la fuerza del complejo antígeno-anticuerpo. Esto es controlado por tres factores: la afinidad anticuerpo-epítome; las valencias de ambos, antígeno y anticuerpo; y el arreglo estructural de las partes que interactúan (Harmening, 2013).

II.5. Métodos de separación, identificación y cuantificación de anticuerpos.

Los avances en el campo de la biotecnología han requerido el uso de técnicas más eficaces para la separación, identificación y purificación de biomoléculas.

II.5.1. La Separación Cromatográfica.

El término Cromatografía engloba una serie de técnicas de separación útiles en el análisis bioquímico para aislar los componentes de mezclas. La cromatografía fue desarrollada por el botánico ruso Mikhail Tswett a quien debe su nombre derivado del griego *Chroma* que significa color y *graphein* que significa describir, logrando separar una mezcla de pigmentos de plantas en una columna de carbonato de calcio. Por definición la Cromatografía es una técnica en la cual los componentes de una mezcla migran a diferentes velocidades en un sistema que entraña un equilibrio entre una fase estática y una en movimiento, conocidas como fase fija o estacionaria y fase móvil, respectivamente (Sgariglia y col. 2010)

La cromatografía de líquidos (CL) ha resultado ser una herramienta muy poderosa y eficiente para la separación de mezclas complejas tanto de compuestos de bajo peso molecular como de proteínas y ácidos nucleicos. La resolución de mezclas proteicas por

CL se basa en el principio de que, bajo un conjunto dado de condiciones, los solutos disueltos en una fase móvil interactúan en grado diferente con la fase estacionaria contenida en la columna (Aranda, 2002). El tipo de interacción depende de las propiedades físicas y químicas de la fase estacionaria. De esta manera, la CL explota las diferencias inherentes entre las proteínas (tamaño, hidrofobicidad, especificidad de unión y de carga) con el fin de lograr su separación (Warreth, 2020).

La cromatografía líquida en alta presión (HPLC), es una modalidad cromatográfica que se caracteriza por la selectividad, reproducibilidad, sensibilidad y rapidez, permitiendo analizar potencialmente una mezcla de proteínas. En este sistema, una muestra en estado líquido es arrastrada por el eluyente, que en dependencia de la retención de los componentes de la muestra a su paso por la fase estacionaria y de su solubilidad en el propio eluyente, se provocará su migración diferencial. Como fase estacionaria actúa un sólido finamente dividido (diámetro de partícula 3, 5, 10 μm) que puede ser de diferentes naturalezas (Mayolo y col., 2012).

Los equipos de HPLC pueden ser integrados o modulares, en los primeros cada una de las partes (reservorios de solventes, programador de solventes, bombas, inyector, detector e inclusive el integrador) pueden estar en una sola unidad. En los segundos los módulos son instrumentos individuales que permiten no solo armar el equipo según las necesidades, sino también aumentar su complejidad (H10 PNO-002). El resultado del ensayo cromatográfico es, por un lado, la obtención de fracciones separadas de los componentes de la muestra, y por el otro, la de un gráfico o cromatograma de cuya interpretación pueden extraerse conclusiones cualitativas y cuantitativas (www.lifeder.com/cromatograma).

II.5.2. La Electroforesis en Gel de Poliacrilamida.

La electroforesis en gel de poliacrilamida es una de las técnicas más utilizadas para el análisis de mezclas complejas de proteínas. Su versatilidad y poder de resolución contrastan con su simplicidad experimental.

El término electroforesis fue introducido por primera vez en 1907 por Michaelis para definir el fenómeno por el cual una molécula que posee carga neta se desplaza en respuesta a la aplicación de un campo eléctrico. La velocidad de migración o movilidad a través del campo eléctrico dependerá de varios factores como son: la intensidad de dicho campo; la carga neta, tamaño y forma de las moléculas; así como la fuerza iónica, viscosidad y temperatura del medio en el cual las moléculas se están moviendo. La electroforesis es una herramienta

analítica simple, rápida y muy sensible, lo que la convierte en una técnica de gran utilidad para la separación y el estudio de moléculas cargadas tales como proteínas y ácidos nucleicos (Carrillo y col., 2013).

Los soportes de elección para la electroforesis de proteínas son los geles de poliacrilamida (PAGE, polyacrilamide gel electrophoresis) debido a su buena resolución y gran versatilidad. Además, poseen una serie de ventajas tales como: ser químicamente inertes, estables en un amplio rango de pH, temperatura y fuerza iónica y fáciles de generar mediante la polimerización de acrilamida (<http://www3.uah.es/chemevol/index.php/sds-page-electroforesis-en-gel-de-poliacrilamida>)

Las cadenas de poliacrilamida son entrecruzadas al azar por la bisacrilamida, formándose así una red de porosidad bastante uniforme, que puede ser regulada variando las condiciones de la reacción y las concentraciones de los monómeros (Voss y Haberl, 2000). El porcentaje total de acrilamida/bisacrilamida determina el rango de separación del gel. Habitualmente los geles se denominan en función del porcentaje de acrilamida/bisacrilamida que contienen. Así, la mayoría de las proteínas se separan bien en el rango 5 a 12 %. Un menor porcentaje (mayor tamaño de poro) es mejor para separar proteínas de gran tamaño (Reina, 2018).

La electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida se puede llevar a cabo en condiciones nativas (Nativa-PAGE) o desnaturizante (SDS-PAGE). Las diferencias entre uno y otro tipo radican en los componentes de los geles y del buffer de electroforesis, así como del tratamiento de las muestras (Arndt y col., 2012).

La electroforesis nativa es la que somete a las proteínas a migración sin desnaturalización. Mientras que la electroforesis desnaturizante, es la que somete a las proteínas a migración asegurando la completa desnaturalización (pérdida de la estructura tridimensional). El agente desnaturizante más empleado es el detergente Dodecil Sulfato de Sodio (SDS). Este se une a las proteínas rompiendo interacciones hidrofóbicas y desnaturalizándolas. Las proteínas desnaturalizadas aportan una estructura en forma de bastoncillo con una serie de moléculas cargadas negativamente a lo largo de la cadena polipeptídica. Se une una molécula de SDS por cada dos residuos de aminoácidos, por lo que la carga nativa original está completamente enmascarada por la carga negativa del SDS (Pérez y col., 2015).

II.5.3. La Espectroscopia de absorción UV-Visible.

La espectroscopia UV-Visible es, probablemente, la técnica espectroscópica más ampliamente utilizada. Se basa en la absorción de radiación ultravioleta o visible por parte de una molécula, promoviendo el paso de un electrón desde un orbital molecular fundamental a un orbital excitado. Esta espectroscopia se trabaja en un intervalo de longitud de onda de 200 a 800 nm, brindando información de los estados energéticos, atómicos o moleculares, de la muestra de estudio (Perkampus, 1992).

La espectrofotometría de absorción es usualmente usada con moléculas disueltas en un solvente transparente. La absorbancia de un soluto generalmente depende linealmente de la concentración y por consiguiente, la espectrofotometría de absorción es ideal para hacer mediciones cuantitativas. La longitud de absorción y la fuerza de absorbancia de una molécula no sólo depende de la naturaleza química, si no del ambiente molecular en donde se encuentre el cromóforo. La espectrofotometría de absorción es por lo tanto una excelente técnica para seguir reacciones de unión a ligando, catálisis enzimáticas y transiciones conformacionales en proteínas y ácidos nucleicos. Las mediciones espectroscópicas son muy sensibles y se requieren pequeñas muestras de material para el análisis (Noriega y López, 2004).

Si a las moléculas presentes en un medio se les hace interaccionar con radiación electromagnética de una frecuencia tal que su energía coincida precisamente con la diferencia existente entre dos niveles electrónicos tendrá lugar una transición electrónica. Para esto se requiere radiación electromagnética de una longitud de onda menor de 1000 nm, que coincide precisamente con la región del espectro correspondiente al UV-visible. Cuando ocurra esto, ya no se observará dispersión, sino que este fenómeno es precisamente el que se define como absorción (Kenneth y col., 2001).

Cuando se trata de preparaciones homogéneas, de disoluciones de una proteína aislada, se puede utilizar su coeficiente de extinción para calcular su concentración, según la ecuación de Lambert-Beer. Se trata de un método que ofrece muchas ventajas frente a otros posibles pues es rápido, sencillo, suficientemente preciso y, además, no se consume mucha muestra (Jentoft, 2014).

La medida experimental de la absorbancia de una disolución se realiza en los espectrofotómetros, los cuales permiten trabajar con una gran cantidad de longitudes de onda (λ). Estos equipos constan de un selector de λ , y una cubeta transparente de 1 cm de

lado y 3 cm de alto donde se coloca la disolución a medir y necesitan principalmente una fuente de luz. En el caso de los espectrofotómetros de absorción UV-visible, se suelen utilizar dos tipos de lámparas: halógenas y de deuterio. Las primeras se emplean para la medición en la región visible, mientras que la segunda para la zona UV (Perkampus, 1992).

II.6. Formulación de productos biotecnológicos.

Cualquier principio activo que posea actividad biológica y que se pretenda comercializar debe pasar por una serie de etapas encaminadas a la obtención de un reactivo seguro y eficaz.

La **formulación farmacéutica**, en la industria farmacéutica, es el proceso mediante el cual se combinan diferentes sustancias químicas, incluido el fármaco activo, para producir un medicamento final. La palabra **formulación** se usa a menudo de una manera que incluye la forma de dosificación (Simler y col., 2008).

El proceso de desarrollo de formulaciones garantiza que el medicamento o reactivo que se va a fabricar es física y químicamente estable y que seguirá siéndolo durante toda su vida útil. Las formulaciones deben siempre de trabajarse a favor del principio activo, estar biodisponibles y cumplir con los requisitos reguladores y con los estándares de calidad para garantizar la seguridad de los pacientes.

Una vez determinada la fórmula y el método de elaboración, se efectúa un estudio de compatibilidad de los IFA-sales con mezclas para comprobar si existen interacciones con el principio activo, de manera que el resultado sea un producto con las características requeridas. Este punto resulta altamente interesante con el fin de que se reduzcan al máximo las variabilidades debidas a la materia prima (la compresión directa la calidad de la materia prima y de los demás componentes de la formulación es vital para las características finales del formulado).

Para su concepción, en la formulación por lo general están presente los siguientes componentes: el Ingrediente Farmacéutico Activo (IFA) que contiene el principio activo base del producto, una solución tamponante para mantener el pH en determinados límites, determinadas sales o estabilizantes y un componente, que permita reducir el riesgo de contaminación microbiana, aunque pudiera o no estar presente. Lograr combinaciones, seguras, eficaces y estables, resulta la meta de todo trabajo para la conformación de la presentación del reactivo final.

La estabilidad física y química de la mezcla entre las sales y el principio activo, tras ser almacenada durante un tiempo a unas determinadas condiciones forzadas, dará idea de la compatibilidad y en último término de la estabilidad del formulado (Pinillos y Lopera, 2009).

II.7. Reactivo Hemoclasificador anti-D.

Los reactivos hemoclasificadores están incluidos dentro del amplio grupo de reactivos diagnosticadores, los cuales se definen como dispositivo médico, usado solo o en combinación, diseñado por el fabricante para el examen in vitro de muestras derivadas del cuerpo humano, fundamentalmente con el objetivo de proporcionar información para fines de diagnóstico, seguimiento o compatibilidad (CECMED, 2018).

Estos reactivos, comúnmente llamados sueros hemoclasificadores, en la actualidad son mezclas de anticuerpos monoclonales, los cuales son producidos a partir de la tecnología del Hibridoma. El empleo de los (AcM) monoespecíficos, 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 problemas éticos por el riesgo de transmisión de determinadas infecciones por vía sanguínea (Bencomo y col., 2011).

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 transfusiones (Hernández y col., 2000). Estos reactivos se desarrollaron por primera vez al final de la década del 80 del pasado siglo. 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, 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 (Rivero, 2000).

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) (Judd y col., 2005).

En el LABEX, el reactivo Hemoclasificador ior[®]Hemo-CIM anti-D, se formula a partir de la dilución en el tampón de formulación de los anticuerpos IgM anti-D e IgG anti-D débil (D^u),

ambos obtenidos en sobrenadante de cultivo *in vitro* de hibridomas específicos (Ávila, 2015). A esta mezcla de Ingredientes Farmacéuticos Activos (IFA) se adiciona, además, Albúmina Sérica Bovina al 2 % como potenciador de la reacción y Azida sódica al 0,1 % como preservante antimicrobiano (O6 PNO.002). El volumen a emplear de cada uno de los sobrenadantes en la formulación está dado por la potencia mínima que debe poseer el producto, establecida en 1024 para la actividad anti-D, para la cual se exige como requisito una potencia mínima de 512 por la regulación 59-2011 del CECMED; y para la actividad anti-D débil (D^U) se especifica una potencia de 8, sin embargo, no está sujeta a requisito regulatorio (ESP-8023).

Los reactivos hemoclasificadores son diagnosticadores que tienen asociados un alto riesgo para la salud del paciente, un fallo en su funcionamiento puede provocar un daño importante e incluso la muerte en el paciente, por estas razones están clasificados en la “Categoría D” de máximo riesgo, por la entidad que regula su uso y comercialización en Cuba: el Centro para el Control Estatal de Medicamentos, Equipos y Dispositivos Médicos (CECMED, 2012)

Para la determinación de los parámetros de calidad, son utilizadas técnicas de hemaglutinación, las cuales se basan en el enfrentamiento del anticuerpo con su antígeno específico en los eritrocitos, donde su fracción antigénica específica que es el azúcar terminal del antígeno se combina con el anticuerpo. Esta interacción es macroscópica, de ahí su utilidad en el laboratorio (Sánchez, 2017).

El CECMED establece en la Regulación No. 59/2011 los requisitos que deben cumplir los hemoclasificadores del sistema ABO y Rh. Entre los parámetros de calidad se encuentran: potencia, avidez y especificidad (CECMED, 2011).

- **Potencia:** Es el recíproco de la mayor dilución del reactivo donde se observa una reacción de aglutinación. La mínima potencia aceptada por las regulaciones cubanas, es de 512.
- **Avidez:** Es el tiempo que media entre la mezcla del reactivo con los eritrocitos y la aparición de la aglutinación. Debe ser menor o igual a 30 s.
- **Especificidad:** La capacidad del producto para identificar correctamente las muestras carentes del antígeno en cuestión. Se establece mayor o igual a 2+.

El sistema de calidad de LABEX tiene establecidas especificaciones para cumplir con los requisitos de la Regulación No.59/2011. Para ello existen controles durante todo el proceso, para chequear el cumplimiento durante el desarrollo de todas las etapas productivas hasta la obtención del producto final.

Materialles y Métodos

III. MATERIALES Y MÉTODOS

III.1. Características generales de la investigación.

La investigación se realizó en el Laboratorio de Anticuerpos y Biomodelos Experimentales (LABEX), perteneciente al Centro de Inmunología Molecular (CIM). Se utilizaron las instalaciones correspondientes a los Grupos de Fermentaciones y Producción de Inóculos, Control de la Calidad, Procesamiento de IFA (Purificación) e Investigación y Desarrollo, en el período comprendido de octubre de 2019 a mayo de 2020.

Se llevó a cabo el estudio experimental tomando las muestras de los lotes productivos, de sobrenadantes de cultivo anti-D y de cultivo anti-D débil (D^u), del periodo año 2018 al 2020, con vista a evaluar el comportamiento de calidad de los mismos, la incidencia en la formulación del reactivo hemoclasificador y comparar su formulación basada en potencias y/o concentraciones de sus ingredientes farmacéuticos activos.

III.2. Análisis Histórico de los parámetros de calidad de los Formulados de anti-D producidos en LABEX.

Se realizó una búsqueda histórica en los Registros documentales de ensayos, correspondientes al Departamento de Control de Calidad, de los Sobrenadantes anti-D y anti-D débil (D^u) producidos por LABEX en el 2019 refiriendo cada lote y los formulados obtenidos a partir de los mismos.

A partir de esta, se hizo un registro histórico de los resultados de la actividad biológica (Potencia, avidez e intensidad) de los lotes Formulados de Hemoclasificador anti-D, durante el período 2019-2020, y se analizó críticamente el procedimiento para formulación a partir de la revisión de los Registros de Producción.

Se revisaron los Expedientes de lotes confeccionados, donde se describen los detalles y cálculos realizados, para los formulados liberados. Se valoró el comportamiento de estos parámetros y se correlacionó mediante observación, con las diluciones empleadas en la formulación.

Se utilizaron métodos inductivo-deductivos para llegar a generalizar comportamiento de los mismos, relacionando con la bibliografía consultada, para la toma de decisiones en la continuación del trabajo. Se empleó el programa Microsoft Excel 2016 para confeccionar gráficos de comportamiento.

III.3. Determinación de los parámetros de calidad en sobrenadantes y formulados. Técnicas de hemaglutinación.

III.3.1. Determinación de Potencia.

Los procedimientos de ensayo, el lavado de hematíes, la preparación de las soluciones de BSA al 2% y las suspensiones de hematíes al 2% utilizadas están recogidas en el **A5 PNO.001** del Sistema de Gestión de la Calidad de LABEX. Se utilizó el reactivo Anti-D IgM+IgG Monoclonal (SPINREACT® Cat. #: N1700021) como reactivo de referencia en todas las técnicas realizadas.

➤ **Para anti-D:**

Se aplicó 100 µL de SSF con BSA al 2 % en dos hileras de 15 tubos de ensayo, excepto en el primer tubo, en el cual se aplicó 100 µL de la muestra de sobrenadante de cultivo. A partir del segundo tubo se realizaron diluciones dobles seriadas (100 µL) o continuas (el volumen varía dependiendo de la dilución a aplicar), según sea el caso, hasta el último tubo. En cada tubo se aplicaron 50 µL de una suspensión de hematíes al 2% en SSF, se incubaron (BINDER®, Alemania) los tubos durante 5 minutos a 25 °C y se centrifugaron (Eppendorf®, Alemania) durante 1 minuto a 1000 r.p.m.

➤ **Para anti-D débil (D^u):**

Se aplicó 100 µL de SSF con BSA al 2 % en dos hileras de 15 tubos de ensayo, excepto en el primer tubo, en el cual se aplicó 100 µL de la muestra de sobrenadante de cultivo. A partir del segundo tubo se realizaron diluciones dobles progresivas (100 µL) o continuas (el volumen varía dependiendo de la dilución a aplicar), según sea el caso, hasta el último tubo. En cada tubo se aplicaron 50 µL de una suspensión de hematíes al 2% en SSF, se incubaron (BINDER®, Alemania) los tubos durante 30 minutos a 37 °C, se lavaron tres veces con SSF y se centrifugaron (Eppendorf®, Alemania) luego de cada lavado durante 5 minutos a 1500 r.p.m. Se añadieron 100 µL de Suero de Coombs a cada tubo y se centrifugaron durante 1 minuto a 1500 r.p.m.

Para los sobrenadantes anti-D procesados, se enfrentaron mediante la técnica de hemaglutinación en tubo a muestras de sangre de donante fresco de fenotipo ccDee (Ror) con el objetivo de observar la ocurrencia de aglutinación de los eritrocitos como resultado positivo. En el caso de los sobrenadantes anti-D débil (D^u), estas se enfrentaron a muestras de sangre de donante fresco de fenotipo O D débil HC:SL-P-243 con la finalidad de observar la ocurrencia de aglutinación.

A ambos sobrenadantes se le determinó el valor de potencia en base al desarrollo de la intensidad de la hemaglutinación en cada Tubo, reflejándolo como la última dilución en que apareció un aglutinado con intensidad mínima de 1+. Las lecturas de intensidad serían (A5 PNO.001), las cuales se representan en el **Anexo 2**:

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.3.2. Determinación de intensidad.

Para cada caso específico, después del procesamiento del sobrenadante, se realizó la lectura de la intensidad en base a la escala descrita anteriormente de aglutinación, en el primer tubo de muestra sin diluir. Debe observarse una aglutinación $\geq 2+$ para ambos sobrenadantes.

III.3.3. Determinación de Aidez por la técnica de aglutinación directa en láminas.

En láminas portaobjeto se mezclaron 50 μL de muestra de IgM con 100 μL de una suspensión al 40 % de hematíes de fenotipo Ror (ccDee) en SSF. La Aidez se determinó por lectura directa donde se observaron aglutinados en un intervalo ≤ 30 s. Los aglutinados debieron tener un diámetro ≥ 1 mm a los 2 minutos, según inspección visual (CECMED, 2011).

III.4. Evaluación de los componentes de la Formulación.

La formulación del hemoclasificador se realiza según O6 PNO.002 del SGC del LABEX (cimsp/labex/DOCUMENTOS_LABEX). Contiene como componentes: Mezcla de sobrenadantes de cultivo (anti-D IgM + IgG), PBS pH 7,2-7,4 (Cloruro de sodio, Cloruro de Potasio, Hidrógeno fosfato disódico, Dihidrógeno fosfato de Potasio), Albúmina sérica bovina al 2% y Solución de Azida sódica al 0,1%.

La formulación primeramente es ensayada a pequeña escala (Volumen de 10 mL) y luego de verificado que los requisitos de calidad estén en valores aceptables por la regulación Reg. No. 59/2011, se realiza la formulación de los lotes productivos volviendo a evaluar potencia,

avidez e intensidad para su liberación a etiquetado y llenado, como fases previas a la terminación como ior[®] Hemo-CIM anti-D.

Se requiere por la “Categoría de riego D del Reactivo”, un ensayo externo de calidad por el Laboratorio Nacional de Control perteneciente al CECMED, el cual tiene en cuenta nuevamente los requisitos de calidad anteriormente descritos. Posteriormente a este ensayo, este laboratorio emite un informe de análisis con la conformidad del producto y es entonces, que se libera por el CECMED a través de un certificado de liberación para poder iniciar la venta y distribución de este reactivo hemoclasificador. Al resultado paulatino de la liberación se puede acceder en el SILOT (Software de Labex para la liberación de lotes) (www.cecmed.cu/liberacion-de-lotes).

Para evaluar el efecto de los diferentes componentes, sobre los parámetros de calidad del formulado, se realizaron varios ensayos modificando la concentración de los mismos. Se realizaron formulaciones a pequeña escala, en las que, en dependencia de la variable a analizar, se mantuvieron fijas o se disminuyeron las concentraciones de IgM, IgG y las sales del buffer de formulación. Estas formulaciones se describen a continuación:

III.4.1. Efecto de la concentración de IgM (Experimento 1):

Para evaluar el efecto que tiene la disminución de la concentración de IgM en los valores de avidez e intensidad del formulado, se realizaron curvas de dilución de IgM a partir de muestras de sobrenadantes anti-D procedentes de 3 lotes diferentes (**18MS1903**, **18MS1904**, **18MS1910**); los cuales tienen un valor de potencia de aglutinación de 4096. Las diferentes diluciones de las concentraciones de IgM, se realizaron mediante diluciones dobles seriadas con adición de una solución de salina fisiológica al 0,9% con BSA al 2%.

Para evaluar la reacción de aglutinación, estas diluciones se enfrentaron con eritrocitos humanos del fenotipo ccDee (R_{or}), procedentes de 3 individuos diferentes.

III.4.2. Efecto de la concentración IgG (Experimento 2):

Para la evaluación del efecto que tiene la disminución de la concentración de IgG en los valores de potencia, avidez e intensidad del formulado, se realizaron curvas de dilución de IgG a partir de un sobrenadante anti-D débil (D^u) (IgG) del lote **18GS1903**, cuyo valor de potencia es 256. La concentración de IgG se disminuyó mediante dilución doble seriada en solución salina al 0,9 %, al igual que la concentración de las sales del Buffer de formulación (KCl, 0,2 g/L; KH₂PO₄, 0,2 g/L; Na₂HPO₄, 1,15 g/L).

Para las tres curvas se utilizó el lote de sobrenadante de cultivo anti-D: **18MS1903**, simulando tres valores de potencia diferentes: 2048, 1024 y 512 respectivamente, los que se lograron realizando diluciones dobles seriadas al sobrenadante de partida (potencia 4096). En cada curva se fijó la concentración de IgM correspondiente, así como la concentración de NaCl (8 g/L) y la BSA al 2% en todos los tubos empleados.

Para evaluar la reacción de aglutinación, estas diluciones se enfrentaron con eritrocitos humanos del fenotipo ccDee (Ror). En cada curva se evaluaron eritrocitos procedentes de 3 individuos diferentes. Se tomó el valor de potencia de 512 como el límite inferior ya que es el establecido por regulación.

III.4.3. Efecto de la concentración de sales (Experimento 3):

Para evaluar el efecto que tuvo la disminución de la concentración de NaCl (8 g/L) y las demás sales del buffer (KCl, 0,2 g/L; KH₂PO₄, 0,2 g/L; Na₂HPO₄, 1,15 g/L) en los valores de avidéz e intensidad del formulado, se realizaron 2 ensayos con dilución de las sales. Para ello se prepararon 2 formulaciones por triplicado, en las cuales se utilizaron un sobrenadante de cultivo anti-D (IgM) del lote **18MS1909** con un valor de potencia de 1024 y un sobrenadante de cultivo anti-D débil (D^u) de lote **18GS1913** con un valor de potencia de aglutinación de 16.

En la primera formulación se mantuvieron fijas las concentraciones de ambas inmunoglobulinas (IgM e IgG) y la BSA al 2%. Las demás sales del buffer se diluyeron mediante diluciones dobles seriadas, tomando de partida: KCl, 0,2 g/L; KH₂PO₄, 0,2 g/L; Na₂HPO₄, 1,15 g/L; NaCl, 8 g/L. Estas concentraciones de sales se corresponden con las de la solución Buffer fosfato salino pH 7,2-7,4 (PBS 1x) **Tabla I. En la segunda** se mantuvieron fijas las concentraciones de ambas inmunoglobulinas (IgM e IgG), la BSA al 2% y el NaCl a 8 g/L. Las demás sales del buffer: KCl, 0,2 g/L; KH₂PO₄, 0,2 g/L; Na₂HPO₄, 1,15 g/L se diluyeron mediante diluciones dobles seriadas.

En todos los ensayos realizados, se determinó avidéz e intensidad del formulado obtenido, mediante las técnicas hematológicas descritas en el **acápite III.3**.

Tabla I. Componentes del Buffer de formulación -1X-.

Componentes	g/L
Cloruro de Sodio	8
Hidrógeno fosfato disódico	1,15
Dihidrógeno Fosfato de potasio	0,2
Cloruro de potasio	0,2

III.5. Separación e identificación de las moléculas de IgM e IgG en los sobrenadantes anti-D.

Para el estudio de la composición de los IFA anti-D y anti-D débil D^u, se diseñó un protocolo teniendo en cuenta las características de estas biomoléculas, estudios realizados en el LABEX y lo descrito en los Procedimientos Normalizados de Operación, según los Materiales y Equipos con que cuenta esta institución.

III.5.1. Separación por Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC) de las moléculas de IgM e IgG.

Para la separación e identificación de las moléculas de IgM e IgG del resto de los componentes del sobrenadante de cultivo, por Cromatografía de exclusión molecular, se propuso un protocolo usando la Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC por sus siglas en Ingles). Se desarrolló la corrida cromatográfica LC-2010CHT, Liquid Chromatograph Shimadzu, utilizando una columna TSKgel[®] G3000SW_{xL} (Tosoh Bioscience[™]) de exclusión molecular, obteniendo los cromatogramas a través del Registrador LKB 2210 (Recorder[™]) (O1-INS.028).

Para la preparación del buffer de corrida se tomaron 10,53 g de NaH₂PO₄·H₂O, 3,36 g de NaHPO₄, 0,5 g de NaN₃ y 14,2 g de Na₂SO₄ (Merck[™], Alemania) se ajustó pH 6,7 con NaOH (Merck[™], Alemania). La solución obtenida se filtró al vacío, se completó el volumen de 1 L con agua destilada y seguidamente se colocó en Baño Ultrasónico (Staedtler[®] Marsonic 581) por 20 minutos, para desgasificar la solución.

Las condiciones de operación fueron: un flujo de 1mL/min, temperatura de 25°C, a una presión de 5,6 MPa y la detección de los componentes separados se realizó a su paso por el detector a una λ de 280 nm.

Se procesaron por HPLC 100 μ L de muestra en cada corrida, de 10 de los 20 sobrenadantes anti-D y anti-D débil (D^u) producidos en el 2019, cinco de cada tipo; correspondiendo a aquellos formulados posteriormente utilizados en el proceso productivo del Hemoclasificador anti-D. Se continuó la experimentación con los sobrenadantes anti-D - 18MS1907 y 18MS1903 - y los sobrenadantes anti-D débil (D^u) - 18GS1903, 18GS1912, 18GS1915 - producidos por el LABEX; por ser representativos de los valores de potencias que se han obtenido para cada caso.

Para estos, se colectaron los cuatro primeros picos de elución detectados por absorbancia a 280 nm de las muestras de anti-D y todos los picos detectados de las muestras de anti-D débil (D^u) analizadas, según los tiempos de retención en recomendación de Salgado (2018); los cuales fueron ensayados por aglutinación en láminas y tubo, según el objetivo del análisis.

III.5.2. Identificación de las moléculas de IgM e IgG por la Técnica de Electroforesis.

Para corroborar la presencia de las moléculas de Inmunoglobulinas (IgM e IgG) en los picos de elución donde se obtuvo resultado positivo, se le realizó la técnica de electroforesis en gel de poliacrilamida (PAGE) (A5 PNO.O03).

La **Tabla II** muestra la preparación del gel de acrilamida con respecto a las soluciones y al tampón de muestras utilizado en la electroforesis reducida aplicada.

Luego de realizar el montaje de la cámara de electroforesis, se agregaron los geles separador y concentrador, en secuencia con la gelificación respectiva de cada uno de ellos y se colocó el peine para crear los pocillos de las muestras.

Previamente, para la electroforesis en condiciones reductoras, a las muestras se le añaden 20 µl de una mezcla de Buffer Sample y 2-mercaptoetanol, en proporción 19:1 (v/v). Una alícuota (1mL) de las muestras se introdujeron en un beaker con agua en ebullición para su desnaturalización durante 5 min.

Una vez preparada la cámara, se tomó el volumen de muestra necesaria para la corrida garantizando que este no sobrepase el volumen del pocillo de los geles de electroforesis. En el primer pocillo del gel se aplicaron 10 µL del patrón de peso molecular y a continuación se aplicaron 15 µL de las muestras en los otros pocillos.

La corrida electroforética se llevó a cabo en un equipo de electroforesis vertical Mini Protean® Cell (Biorad®; Alemania). Se utilizó como referencia el Patrón de Pesos Moleculares (Biorad® Precision Plus Protein™) de hasta 250 kDa.

Las bandas correspondientes al producto resuelto, en ambos geles, se visualizó con Azul de Coomassie (Bio-rad®; catálogo #161-0436). Posteriormente se adicionó una solución de blanqueo para la tinción (compuesta por ácido acético glacial, metanol y agua purificada) hasta visualizar las bandas de la proteína.

Tabla II. Formulación del gel separador y concentrador para Electroforesis SDS-PAGE.

Soluciones utilizadas	Gel corrida (12%)	Gel Concentrador
30% Acrilamida/Bisacrilamida 0,8%	6000 μ L	1300 μ L
1.5M Tris-HCl pH 8.8	3750 μ L	-----
1.0M Tris-HCl pH 6.8	-----	2500 μ L
Dodecil sulfato de sodio (SDS) 10%	150 μ L	150 μ L
Persulfato de amonio al (PSA)10%	100 μ L	100 μ L
Tetrametil etilendiamino (TEMED)	10 μ L	10 μ L
Agua purificada	5000 μ L	6000 μ L

III.6. Procesamiento de los Sobrenadantes anti D y anti-D débil (D^u) para evaluar rangos críticos de formulación.

III.6.1. Propuesta de cuantificación de las moléculas de Inmunoglobulinas IgM o (IgG) en los sobrenadantes de cultivo anti-D y anti-D débil (D^u).

➤ **Preparación de las Curvas de calibración de referencia.**

Se construyeron curvas de calibración de Absorbancia vs Concentración, absorbancia a 280 nm, a partir de muestras de referencias existentes en el Grupo de Procesamiento de IFA, derivadas de:

- Una solución de IgM purificado, obtenido del sobrenadante anti-D, usando de referencia el protocolo de Salgado (2018) y un patrón de la misma molécula (Thermo-Fisher). Se adicionaron a los 500 μ L de la solución patrón y sus diluciones, Buffer Fosfato Salino 0,01 M pH 6,7 hasta completar volumen de 1.5 mL, también fue utilizado el mismo buffer como blanco para las mediciones. Se constató pureza por la presencia de bandas mayoritarias de IgM, aproximadamente a los 70 y 25 kDa, en una electroforesis desnaturalizante y reducida; así como un positivo a hemaglutinación en tubo de sangre anti-D+.
- Una IgG purificada a partir de suero humano, empleando el procedimiento O5 PNO.016 y un patrón de la misma molécula (Thermo-Fisher), luego de constatar las condiciones de pureza mediante SDS-PAGE con bandas mayoritarias aproximadamente a los 50 y 25 kDa, según patrón de peso molecular de Biorad[®] (**Anexo 2**). Una vez comprobada la pureza de la molécula y su concentración, determinada por absorbancia mediante método de Lambert-Beer, se procedió a la preparación de las diluciones para la curva de calibración, que fueron preparadas empleando el buffer Fosfato Salino 0,01 M, pH 7.2-7.4, el cual también fue utilizado como blanco para las mediciones de Absorbancia.

La determinación de la concentración de proteína en cada punto y en las muestras, se realizó utilizando la ecuación de Lambert-Beer (**Ecuación 1**). Se utilizó un espectrofotómetro marca JascoV-730.

$$A = \varepsilon \cdot l \cdot C \quad (\text{Ec. 1})$$

A: Absorbancia

ε : coeficiente de extinción molar (1,25 para IgM; 0,812 para IgG)

l: espesor de la cubeta (l = 1 cm)

C: Concentración

➤ **Determinación de la concentración de proteínas de interés y propuestas de diluciones en las formulaciones.**

A cada pico colectado en los sobrenadantes anti-D y anti-D débil (D^u), correspondiente a cada una de las moléculas de interés (IgM o IgG) de los sobrenadantes bajo estudio, se le midió la Absorbancia a 280 nm utilizando el espectrofotómetro marca JascoV-730 y cubetas de cuarzo de 1 cm; que fueron sustituidos en la ecuación de Lambert-Beer para la curva de calibración, determinándose la concentración del anticuerpo.

También se determinó las concentraciones de Ac que tenían las diluciones seriadas y continuas que se emplearon para la determinar donde la potencia cambia de 1024 a 512 para IgM y de 16-8 para IgG. Bajo esta zona de cambio se determinaron las concentraciones críticas, concentración de corte y la concentración de trabajo, para determinar a su vez, en nuevas muestras de sobrenadantes, la dilución de trabajo a realizar en el proceso de formulación.

Una vez conocida la concentración de Ac para cada sobrenadante, se calculó por la Ley de la Volumetría ($V_1C_1=V_2C_2$) la concentración correspondiente a los formulados.

Se comprobó en cada caso el valor de Potencia, teniendo en cuenta el rango establecido por control de la calidad del LABEX, según aparece descrito en **III.3.1**.

III.6.2. Determinación de la Concentración Crítica de IFA.

De los sobrenadantes de cultivo anti-D producidos en LABEX en el 2019, se seleccionaron tres lotes al igual que de los lotes productivos del anti-D débil (D^u), basándose en el criterio del valor de potencia de aglutinación que con mayor frecuencia se obtuvo en los sobrenadantes para este año.

Los sobrenadantes seleccionados se sometieron a pruebas de diluciones seriadas y posteriormente a diluciones continuas para la determinación del **valor crítico de concentración** de anticuerpo (IgM e IgG) y la selección de la dilución óptima a realizar para llevar a cabo el proceso de formulación del Hemoclasificador anti-D.

Para los sobrenadantes anti-D, el rango crítico de dilución se estableció en la zona donde en el reactivo se percibe el cambio de Potencia de 1024 a 512 a través de la prueba de hemaglutinación (tubos de ensayo) de acuerdo a las diluciones realizadas; mientras la dilución de trabajo se aseguró en este entorno evaluado.

En el caso de los sobrenadantes anti-D débil (D^u) el rango crítico de dilución se estableció en la zona donde el cambio de Potencia es de 16 a 8 y la dilución de trabajo también se aseguró en este entorno evaluado.

Se determinó la actividad biológica a los sobrenadantes de cultivos en estudio y a sus respectivas diluciones, especialmente la potencia.

III.7. Análisis Estadístico.

Se realizó un análisis histórico comparativo de las producciones de sobrenadante anti-D y anti-D débil (D^u) en el año 2019. Se determinaron parámetros de muestra como valor medio (\bar{x}), desviación estándar (δ), moda y rangos. Para la determinación de la correlación entre absorbancia y concentración, se evaluó el coeficiente de regresión (R^2) y el de correlación de Pearson (r^2) para un $\alpha=0.05$. Para la determinación del intervalo de confianza de las concentraciones de trabajo, se utilizó la ecuación:

$$\bar{x} \pm Z_{a/2} * \sigma/\sqrt{(n)} \quad (\text{Ec. 2})$$

\bar{x} = valor promedio

a = nivel de confianza 0.05

Z a/2 = coeficiente de confianza, para 0.025 es 1.96

σ = desviación estándar,

n = tamaño de muestra igual a 10

Para el procesamiento matemático y análisis estadístico de los resultados fueron utilizados los softwares Microsoft Excel contenido en el paquete Microsoft Office 2016 y el software STATGRAPHICS Plus Versión 5.1.

Resultados y Discusión

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

IV.1. Análisis Histórico de la calidad de los sobrenadantes anti-D producidos en LABEX.

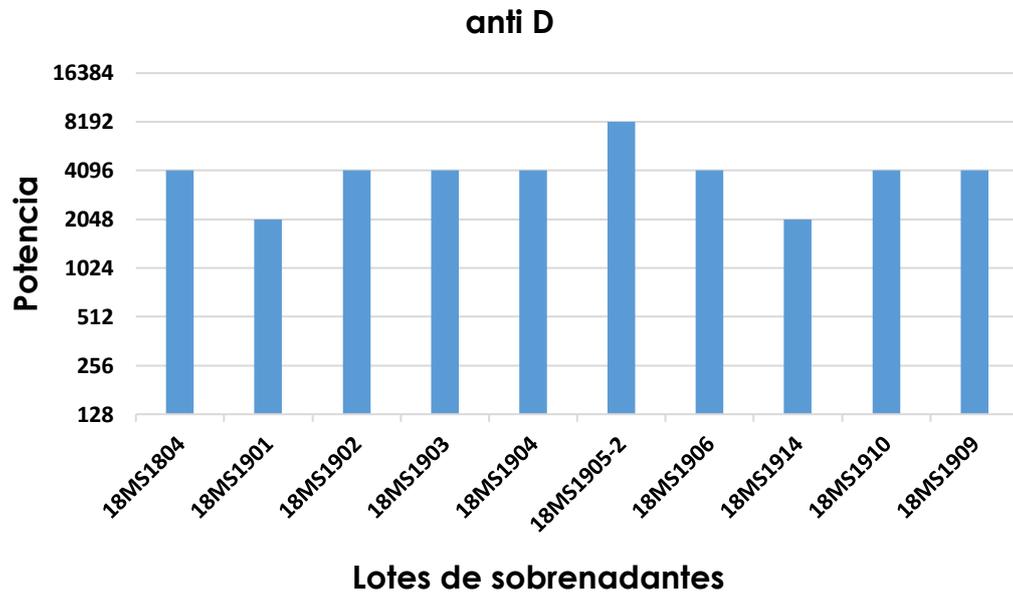
En el proceso de formulación del reactivo hemoclasificador ior® Hemo-CIM anti-D se emplean como Ingredientes Farmacéuticos Activos (IFA), los sobrenadantes de cultivo anti-D y anti-D débil (D^u), los cuales como se describió en el capítulo anterior, contienen los anticuerpos monoclonales del tipo IgM e IgG, respectivamente. Estos sobrenadantes son producidos mediante fermentación *in vitro*, empleando frascos rotatorios, durante largas campañas productivas, donde se van acumulando varias cosechas de sobrenadantes del cultivo para la conformación de los lotes (O1 PNO.018).

En el año 2017, se decidió establecer en LABEX como etapa inicial del proceso de formulación del Hemoclasificador ior® Hemo-CIM anti-D, la formulación a pequeña escala, la cual permite comprobar si los volúmenes de los sobrenadantes empleados son los apropiados para que el reactivo final cumpla con los requisitos de calidad establecidos por las Regulación del CECMED vigente (O6 PNO.002).

Previa realización de esta pequeña escala, se determina la potencia de aglutinación de estos sobrenadantes, teniendo como criterio la máxima dilución donde se muestra aglutinación con una intensidad de una cruz (+) (Alfonso y Bencomo, 2001). A partir de estos resultados de potencia, se selecciona la dilución a emplear que permita obtener en el formulado un valor de este parámetro de calidad igual o superior a 1024 para el fenotipo D; siendo este valor el límite inferior que establece la especificación de calidad ESP-5054 para este producto. En el caso del anti-D débil (D^u), se establece como requisito en el LABEX según la especificación de calidad ESP-5032, un valor de Potencia mayor o igual a 16; sin embargo, no está sujeta a requisito regulatorio (CECMED, 2011).

Para evaluar la consistencia del proceso de formulación, en este trabajo se realizó un análisis histórico del comportamiento de los criterios de calidad en ambos sobrenadantes, con los lotes producidos en el período 2018-2020. En el gráfico presentado en la **Figura 5** se reflejan los parámetros de calidad de los Sobrenadantes anti-D y anti-D débil (D^u) obtenidos en el año 2019, observándose valores de potencia entre 2048 - 8192 para anti-D y 128 - 512 para anti-D débil (D^u); similares al comportamiento general que se viene produciendo desde el 2017 en el LABEX (Salgado, 2018).

A)



B)

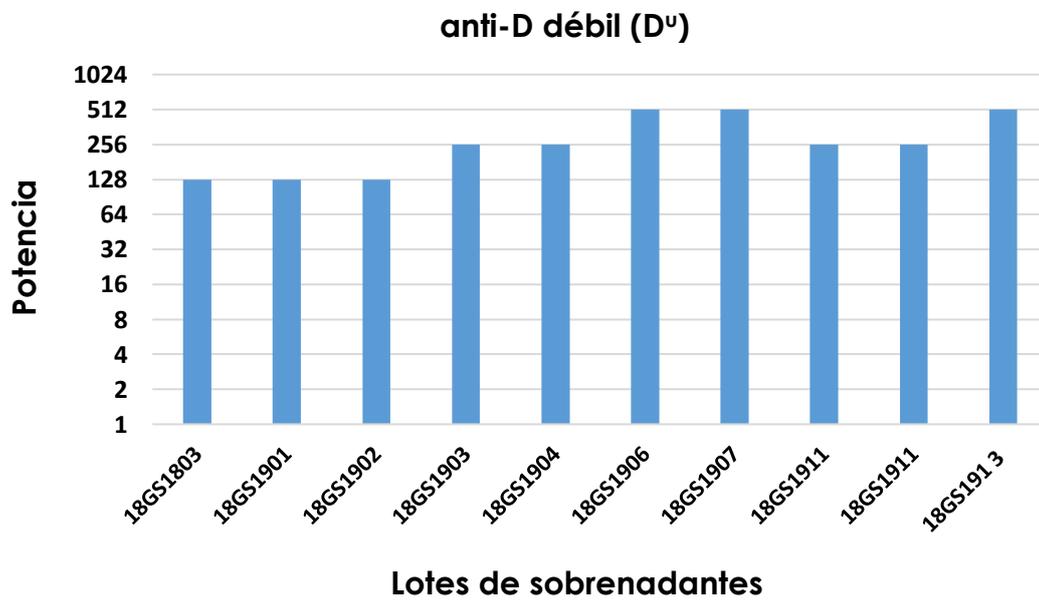


Figura 5. Valores de Potencia de los sobrenadantes de anti-D (A) y anti-D débil (D^o) (B) producidos en el 2019 en el LABEX.

A partir del año 2017 se transforma la estrategia productiva, disminuyendo el tiempo de duración del ciclo productivo del Hemoclasificador anti-D, conformándose los lotes de sobrenadante a partir de un menor volumen y por recolección de las cosechas entre diferentes biorreactores para el mismo tiempo, para conformar el lote (Expediente Maestro del ior Hemo-CIM anti-D).

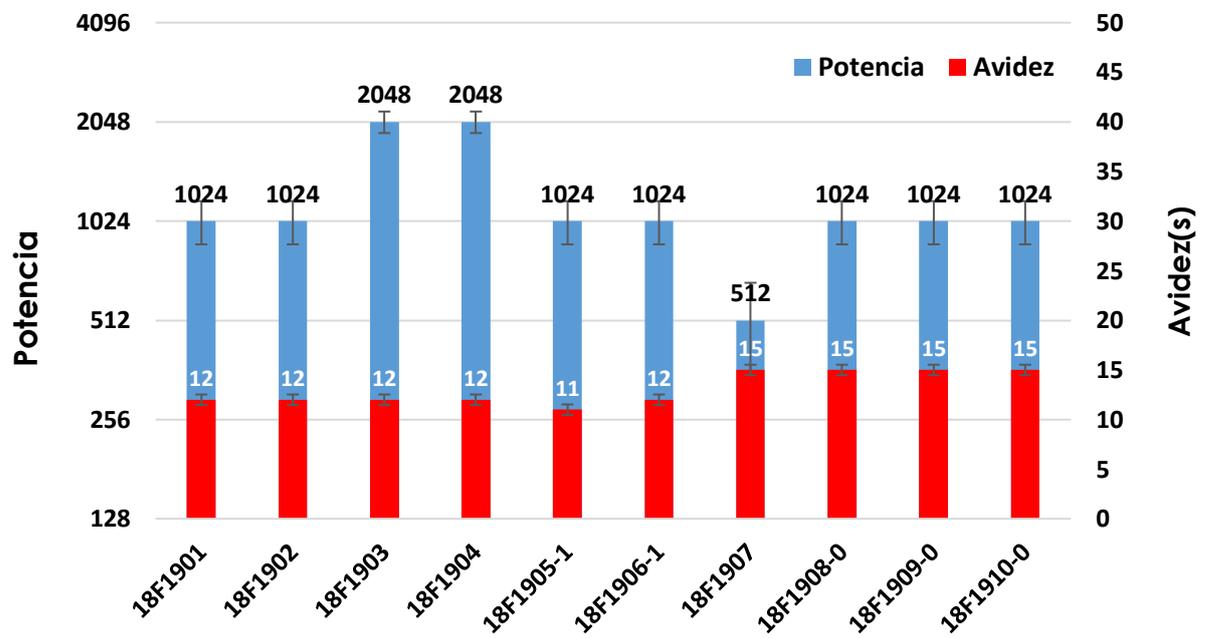
Esto se refleja en el aumento del número de lotes de sobrenadantes de cultivo y formulados producidos con respecto a años anteriores, con una estabilización de los valores de potencias del anti-D que se obtienen mayoritariamente de 4096 (Figura 5A) y mayor variabilidad del anti-D débil (D^u) (Figura 5B); suficiente para generar lotes de hemoclasificadores con tamaños de alrededor de 3000 frascos, permitiendo responder a los tiempos de reabastecimiento del hemoclasificador para mantener la cobertura del producto en el Sistema Nacional de Salud, según demandas nacionales existentes en estos momentos.

El otro requisito de calidad a tener en cuenta en los sobrenadantes es la avidéz, la cual osciló entre 5 y 9 segundos, cumpliendo con el requisito regulatorio de ≤ 30 s (CECMED, 2011). En el caso de la intensidad, esta no varió entre lotes para el fenotipo D, manteniéndose en 4+, mientras que para el fenotipo D débil (D^u) fluctuó entre 3+ y 2+.

El comportamiento de los lotes de las producciones terminadas de este año 2019, luego de las formulaciones realizadas, se muestran en la **Figura 6**. Como se observa, los valores más representativos de los formulados son: Potencia, 1024; avidéz, 12 segundos la que se incrementa con respecto a los sobrenadantes. La intensidad es referida en las evaluaciones de los anteriores criterios de calidad como 2+ para anti-D y para anti-D débil (D^u).

Aunque el CECMED establece como valor de potencia para la liberación del Hemoclasificador anti-D el 512, internamente en el LABEX está definido por especificación el valor de 1024 (ESP-5054), evitando las variabilidades que puedan existir en los ensayos interlaboratorios; puesto que este reactivo diagnosticador sujeto a la Clase de Riesgo D a la que pertenece, es ensayado en el propio Centro Regulador (A5 PNO.001, CECMED, 2012).

Las diluciones realizadas para lograr las formulaciones estuvieron en su mayoría en 1:2 para anti-D y 1:8 para D débil (D^u) (diluciones v/v); asegurando una potencia moda de 2048 y 16, respectivamente, quedando un excedente de sobrenadante en las formulaciones en base a la concentración teórica de sus IFA, siendo más crítica en el caso del sobrenadante D débil (D^u), lo cual supone un uso ineficiente de esta.



Lote Formulados - 2019

Figura 6. Comportamiento histórico de los parámetros de calidad (potencia y aidez) de los formulados del 2019.

Es la Potencia, como criterio de calidad, quien ha incidido en el riesgo de declaración de lotes No Conformes, en los procesos productivos de hemoclasificadores anti-D del 2019; que, aunque se denota una mejora en los porcentajes de rechazo (2015, 14.3%; 2017, 5.3%; 2019, 0.1%), este ha sido a expensas de incrementar el margen de seguridad en la liberación y las recurrentes evaluaciones de los formulados a pequeña escala, que consumen el IFA y reducen el volumen útil a ser utilizado para elaborar el producto final (Pérez, 2019).

Con los cambios productivos para el producto ior® Hemo-CIM anti-D introducidos en el 2017 (O6 PNO.002), la potencia de hemaglutinación de los sobrenadantes anti-D obtenidos han variado de 32 768 en algunos lotes del 2016 a 2048, en algunos del 2019; siendo imprescindibles introducir las formulaciones a pequeñas escalas para eliminar errores en la conformación del producto terminado, previendo variabilidades en las formulaciones de ambas inmunoglobulinas que conforman el IFA.

IV.2. Evaluación de la formulación del hemoclasificador anti-D.

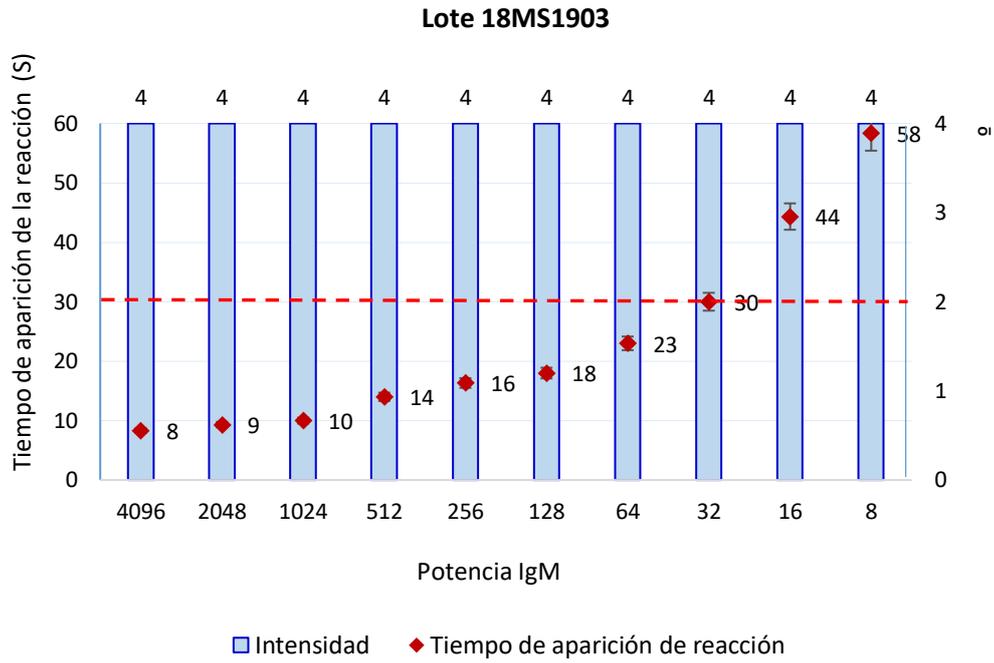
Para su concepción, en la formulación de un hemoclasificador por lo general están presente compuestos que confieren estabilidad a los principios activos y un microambiente favorable para que se desarrollen las reacciones bioquímicas. Pero existe un principio de economía, inherente a toda “formulación”, de no adicionar más de lo requerido, para evitar interacciones indeseables y evitar altos costos sin incrementos de eficiencia del mismo.

IV.2.1. Efecto de la cantidad de sobrenadante anti-D (IgM).

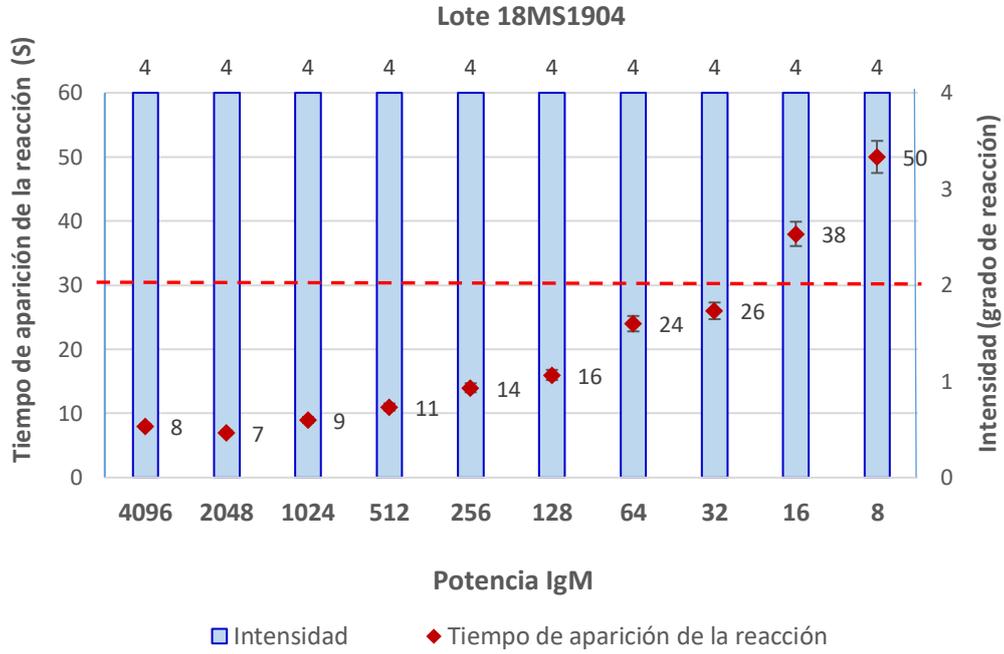
Es así que el análisis de comportamiento productivo desarrollado en el capítulo anterior, obliga a prestar atención con respecto al indicador potencia de aglutinación, a tenor del efecto de cada uno de los componentes del formulado en este parámetro; principalmente evaluando la incidencia de un mayor o menor volumen de sobrenadantes anti-D y anti-D débil (D^u) y por tanto, la presencia de IgM e IgG como IFA, respectivamente. El título aglutinante de un suero determinado, es una expresión semicuantitativa de los anticuerpos presentes en el suero.

Debido a que los sobrenadantes que se obtienen en los lotes de producción tienen títulos diferentes, se decide evaluar el efecto de la concentración de IgM en los valores de avidez e intensidad del formulado. En este sentido, se varió la concentración de IgM por diluciones, empleando solución salina fisiológica, como se muestra en la **Figura 7**.

A)



B)



C)

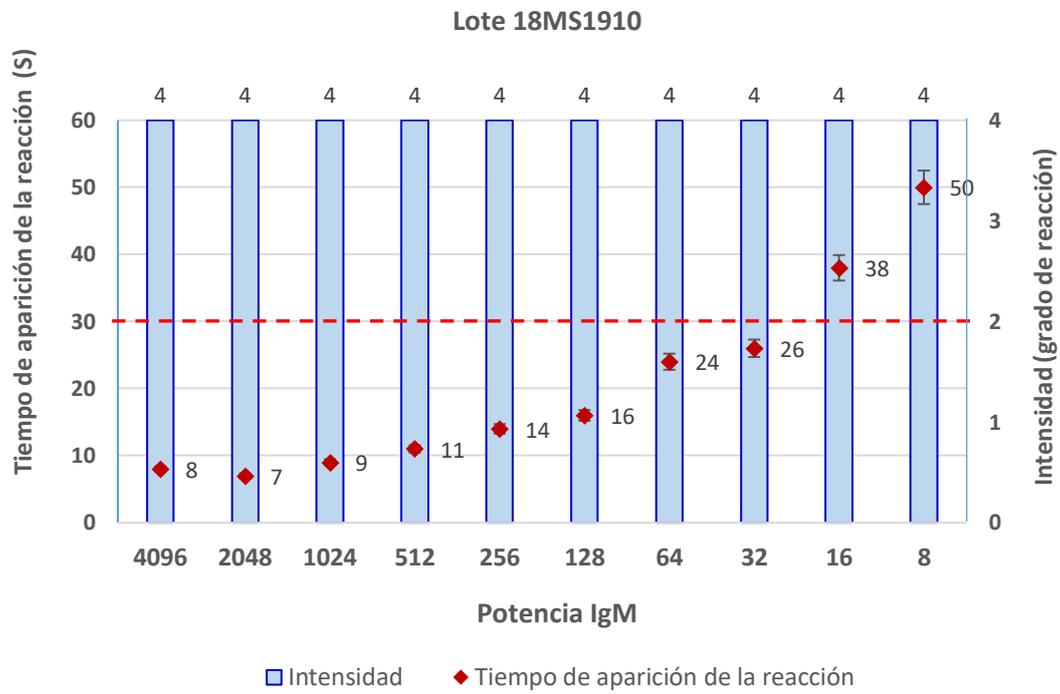


Figura 7. Efecto de la concentración de IgM en los valores de avidéz e Intensidad de los formulados obtenidos a partir de tres lotes de sobrenadantes anti-D (IgM) con potencia de aglutinación 4096.

Se evaluó primeramente la variabilidad que podría traer al ensayo, los análisis con sangre fresca de diferentes donantes, cuyos genotipos podrían afectar la reproducibilidad de los mismos (Bautista, 2005). Según los resultados, no existen diferencias en los títulos obtenidos entre los diferentes individuos ensayados, para todos los experimentos desarrollados en este trabajo (*datos no mostrados*).

Esto califica al hemoclasificador que se produce como sensible para detectar las variantes existentes de este fenotipo, aspecto positivo para los usos de serotipaje de grupo sanguíneo en transfusiones. No obstante, se tuvo sangre conservada de donantes habituales mantenidas en el Banco de Hematíes de la entidad, cuya estabilidad refiere hasta 15 días para su uso, aspecto este tenido en cuenta para desarrollar los experimentos (A5 PNO.014).

La figura 7 muestra los valores promedios de los resultados obtenidos, en los cuales no se observó efecto en la intensidad de la reacción, pues en todos los casos fueron de 4+. Sin embargo, es apreciable una tendencia que en la medida en que la concentración de IgM disminuye (en base a diluciones realizadas del sobrenadante anti-D) el tiempo de aparición de la reacción aumenta, afectando la avidéz en los tres casos con lotes diferentes. El comportamiento es similar entre los lotes usados, no teniendo variabilidad significativa asociada a este aspecto.

La IgM es un anticuerpo pentavalente, caracterizado entre los distintos tipos de isotipos por tener la mayor valencia, lo cual le permite unirse a una mayor cantidad de epitopos de la superficie de los eritrocitos. Si bien las interacciones de la IgM suelen ser de baja afinidad, esta puede ser muy eficaz para responder a un antígeno polivalente (con epitopos que se repiten), pues su estructura pentamérica le permite múltiples interacciones de baja afinidad (epítopo/parátopo), lo que da por resultado una interacción de alta avidéz (Yujra y Tito, 2011).

Por lo que la disminución en el formulado de esta inmunoglobulina, según diluciones del sobrenadante anti-D, disminuirá el número de interacciones que pueden establecerse y confirma el característico comportamiento en este experimento (Figura 7). Teniendo esto en cuenta, resulta conveniente tomar como referencia la concentración de este IFA para realizar la formulación. Esta es referida al valor de potencia, correlacionándolo con la IgM como se explicó. Actualmente la formulación del hemoclasificador parte de la potencia del sobrenadante anti-D, calculando las diluciones para asegurar un valor ≥ 1024 ; cuya escasa correlación por las características propias del método semicuantitativo empleado, no asegura tácitamente el cumplimiento del requisito en el formulado, como sucedió con el Lote 18F1907 (Figura 6, **Anexo 3**).

Al poseer la IgM una estructura pentamérica y por ende mayor cantidad de sitios de unión a los antígenos eritrocitarios, posee una mayor capacidad para lograr la aglutinación de los hematíes (Judd y col., 2005). Por tal razón, podría resultar de mucha utilidad utilizar un método más directo para determinar la concentración de IgM, ya que cualquier variación en ella, a su vez provocaría una afectación en la avidéz, lo cual constituye requisito del producto con enfoque a cliente.

Como se explicó anteriormente, por regulación del CECMED, se encuentra establecido un valor inferior límite de potencia de 512 para que el formulado sea liberado. En el LABEX por su parte y como estrategia interna, tiene establecido por especificación un valor de 1024, lo cual garantiza la estabilidad del producto por un máximo de dos años y disminuye las variabilidades inter-laboratorio durante las evaluaciones para liberación por parte del Órgano Regulador (ESP-5054).

Como puede observarse en los gráficos de la figura 7, por encima de este valor 1024, los tiempos de aparición de la aglutinación (avidéz) que se obtienen resultan ser los más bajos (7-9 s), tiempos que se consideran muy buenos al encontrarse por debajo de la mitad del requisito máximo regulatorio establecido (30s). Los reactivos hemoclasificadores de referencia en la región de las Américas, oscilan su avidéz entre 7-9 segundos (*Comunicación personal*).

El término “avidéz” se utiliza para denotar la energía de unión promedio entre anticuerpos y un antígeno multivalente; por cuanto, a pesar de establecerse las uniones del complejo Ag-Ac por fuerzas de interacción molecular débiles, en conjunto producen una fuerte energía de cohesión (Cortés y col., 2014).

Con el incremento de la concentración de IgM hasta 4096, no se logra una disminución significativa del tiempo de aparición de la aglutinación por debajo de los 7s; siendo referido este valor mínimo, mayoritariamente en potencia de 2048 para los lotes de anti-D ensayados (figura 6). Podría resultar en una cantidad de Ac en exceso que cubra la mayoría de las uniones efectivas con el Ag multivalente, para estas condiciones de ensayo, evidenciándose como un máximo de velocidad de formación del “complejo enrejado” Ag-Ac (Benalcázar y Lucía, 2013).

Esto establece una zona estable de este indicador (avidéz) en valores muy favorables, que coincide con el límite de aceptación para la potencia de los formulados (1024), establecido en Especificación ESP-5054 a partir del mínimo exigido por el CECMED en la Regulación 59/2011. El tiempo de aparición de la reacción aumenta con concentraciones de IgM inferiores a los valores de potencia de 512, ya que existe mayor disponibilidad de sitios antigénicos a ser alcanzados por el Ac en la unidad de tiempo,

pero menor cantidad relativa de anticuerpos; lo que provoca una tardanza en el tiempo de reacción, aun cuando se logre en el tiempo de medición total del ensayo garantizar un aglutinado con la fuerza suficiente como para dar una intensidad de 4+. Por lo que sigue mostrándose que la alta avidéz que tiene la IgM garantiza una intensidad de reacción fuerte en los “formulados”.

IV.2.2. Efecto de la cantidad de sobrenadante anti-D débil (D^u) (IgG).

A partir de los resultados obtenidos en el experimento anterior, y tomando en cuenta que el formulado está compuesto por dos IFA, IgM e IgG, se decidió evaluar el efecto de las concentraciones del sobrenadante anti-D débil (D^u) en la reacción de aglutinación. Para ello se prepararon tres formulaciones que contienen concentraciones diferentes de IgM correlacionándolo con las potencias de aglutinación, a partir de un lote de sobrenadante usado: Potencias 2048, 1024 y 512. La **Figura 8** muestra los resultados obtenidos en este experimento.

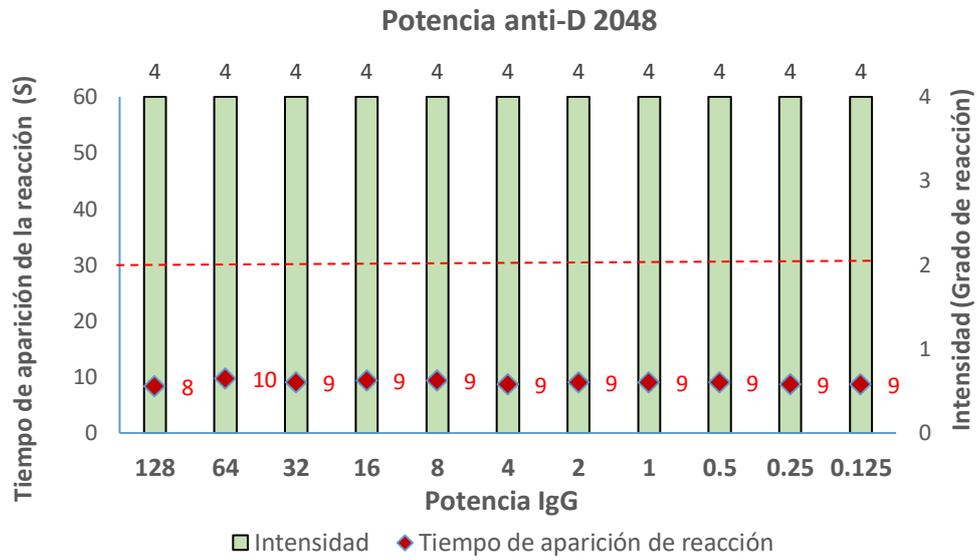
La IgG es un anticuerpo que posee mayor afinidad por el antígeno eritrocitario que la IgM, estando presente en el sobrenadante anti-D débil (D^u) y la que es añadido como IFA al formulado, permitiendo revelar los antígenos débiles D que la IgM no es capaz de detectar. Por lo que podría esperarse que la disminución de esta Ig, por el efecto de dilución, podría afectar la potencia del formulado.

Al observar los resultados en los tres casos, el comportamiento es similar, no observándose variaciones significativas en estos parámetros de calidad por la dilución de la concentración de IgG.

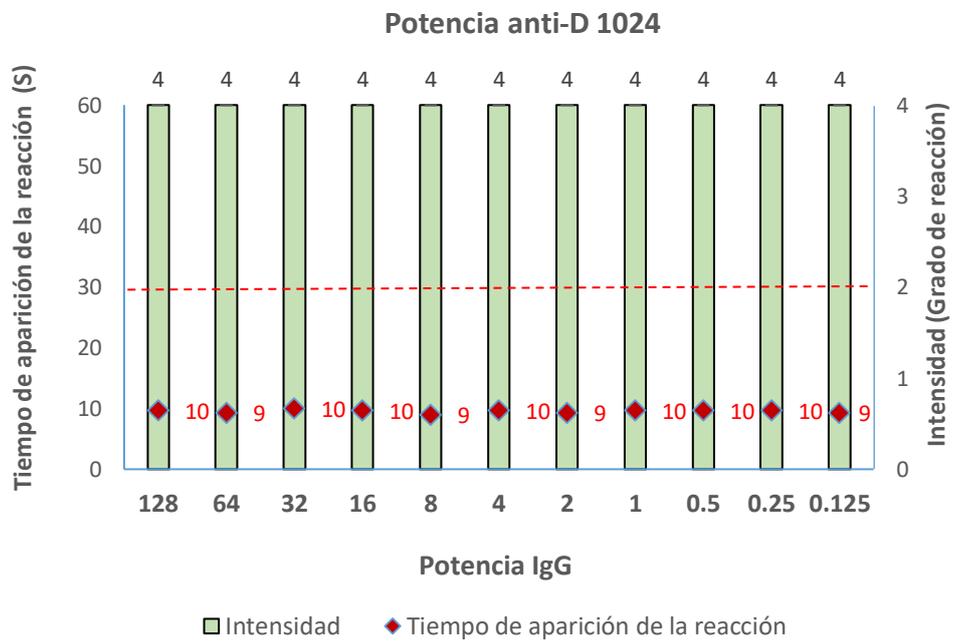
Sin embargo, el mejor valor de avidéz (8s) se obtiene con anti-D 2048 y anti-D débil (D^u) 128 (Figura 8-A), siendo similar al obtenido en los primeros puntos de dilución de IgM en la figura 7. La diferencia entre los valores mínimos, podría estar en que el punto inicial para esta experimentación es de 128 y no a 256, como se refiere en la figura 7. Con una variación de potencia de IgM en los sobrenadantes de anti-D, apareció con mayor frecuencia en 1024 una avidéz de 10s (Figura 8-B) y ya para anti-D 512, se tienen valores de 12 a 14s (Figura 8-C), los más altos de esta experimentación. Lo que podría dibujar una relación entre concentraciones de IgM e IgG para este indicador.

Esto demuestra una vez más la incidencia de la concentración de IgM en el parámetro avidéz del formulado, como se discutió en el acápite anterior; en el cual a partir de una concentración de la IgM equivalente a una potencia ≤ 512 , se observa un aumento en el tiempo de reacción de la aglutinación con respecto al alcanzado con mayores concentraciones de este IFA. Aunque para todos los casos se cumple el valor para liberación ($\leq 30s$), pero incide en mayor demora del ensayo, según percepción del cliente.

A)



B)



C)

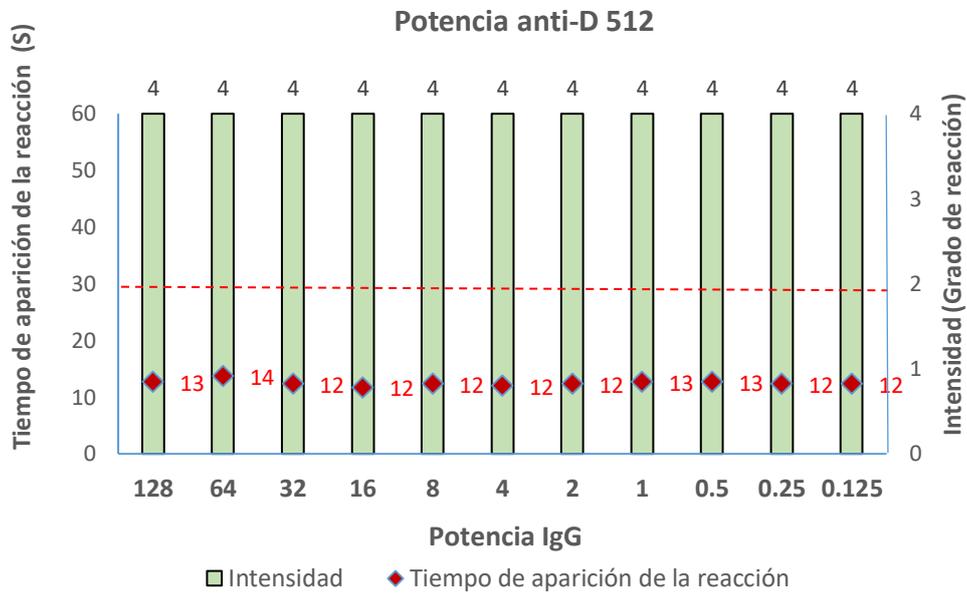


Figura 8. Efecto de la concentración de IgG en los valores de avidéz e Intensidad de formulados realizados a partir de sobrenadantes anti-D con valores de potencia de aglutinación de 2048 (A), 1024 (B) y 512 (C). El sobrenadante de cultivo anti-D débil (D^u) con valor de potencia de aglutinación de partida para las diluciones de 256. Las líneas rojas discontinuas representan el tiempo límite máximo de la aparición de la aglutinación (Avidéz).

El antígeno D es un mosaico compuesto por al menos 24 epitopes diferentes expresados sobre el polipéptido RhD. Los antígenos del sistema Rh pueden presentar alteraciones en su expresión dando origen a fenotipos débiles, parciales o delecionados, como ya se explicó en la “Revisión bibliográfica” (Wagner y Flegel, 2004). Los glóbulos rojos con fenotipo D débil (D^w) poseen un número de sitios antigénicos D menor que los eritrocitos RhD positivos (Avent, 2001). Por lo que la incorporación de inmunoglobulinas IgG en el IFA incrementa la afinidad por estos sitios antigénicos “menos frecuentes”, similar a la sensibilización que se realiza en pruebas indirectas para antígenos D raros (Cerdas, 2015).

Debido pues a la alta avidéz que tiene la IgM por ser multivalente, puede contrarrestar los efectos que la reducción de la IgG provocaría al ser la de mayor afinidad, manteniéndose preponderante el efecto de la IgM para el rango de concentraciones estudiadas en la formulación.

Adicionalmente a las posibles variaciones en la avidéz y la intensidad en los formulados estudiados, se le realizó prueba de potencia en los formulados finales obtenidos en estos experimentos, para las distintas concentraciones de IgG ensayadas (**Figura 9**). Se comprobó que, en todas las variantes, la potencia del Formulador coincide y se mantuvo inalterable, con respecto al valor de este indicador en el sobrenadante anti-D de partida.

IV.2.3. Efecto de la concentración de sales en los formulados.

En la formulación declarada para el **ior® Hemo-CIM anti-D** se describen los siguientes componentes que aportan sales esenciales en la estabilidad de los formulados (O6 PNO.002). El NaCl al 0.9 % garantiza una fuerza iónica similar a lo presente en fluidos biológicos, por lo que en ocasiones se le nombra “solución salina fisiológica”. También la Solución salina de fosfatos conocida como PBS (por sus siglas en inglés), constituye una solución amortiguadora de pH comúnmente empleada para procedimientos bioquímicos.

La osmolaridad y concentración de iones (Cl⁻, Na⁺ y K⁺) en el PBS es muy semejante a la del líquido extracelular de los mamíferos. Esta solución se prepara a partir de Cloruro de Sodio, Fosfato de Sodio y, en algunas formulaciones, con Fosfato de Potasio. Es una solución isotónica y no-tóxica para las células de los mamíferos. El PBS se emplea como vehículo neutro para células, ya que se ha demostrado que no modifica el perfil de expresión y funcionamiento celular normal (www.genomica.uaslp.mx/Protocolos/Cell_Buffer_PBS.pdf).

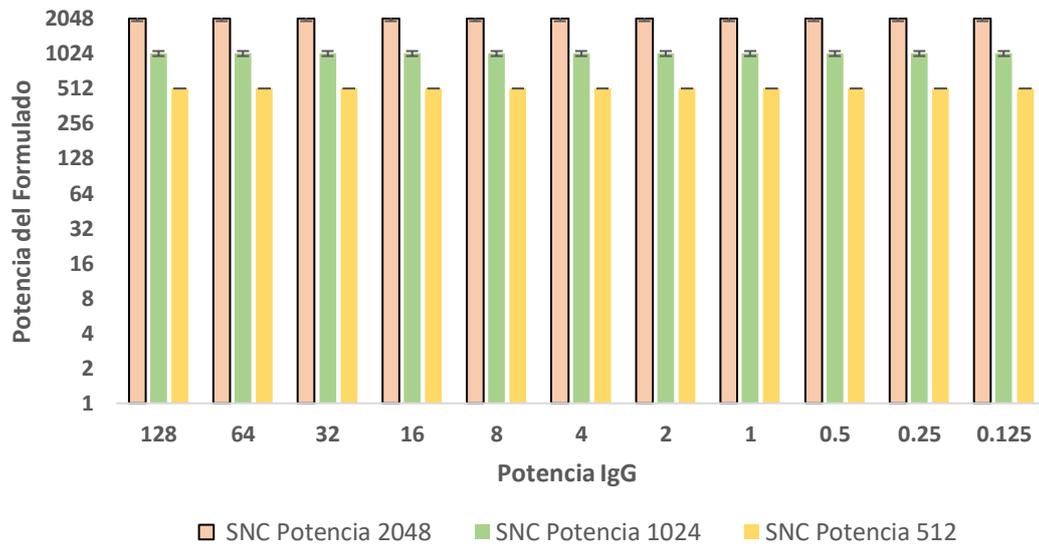


Figura 9. Efecto de la disminución de la concentración de IgG en los valores de potencia de aglutinación del formulado anti-D. Se utilizaron tres sobrenadantes anti-D (SNC) con diferentes potencias iniciales: 2048, 1024 y 512. La potencia inicial del sobrenadante de cultivo anti-D débil (D^d) fue de 256.

En la **Figura 10** se muestra el comportamiento de la avidéz y la intensidad del hemoclasificador formulado, con la disminución de la concentración de las sales aportadas NaCl de 8 g/L a 0,5 g/L, dada en el rango de sus diluciones -X- y los componentes salinos del PBS. No se ensayan concentraciones superiores a 8 g/l porque se reporta tener efectos drásticos en la estabilidad de las proteínas (Ac), provocando aglutinación inespecífica de los hematíes y además, en determinados valores, la “crenación” (Cortés y col., 2014).

Se conoce que los glóbulos rojos permanecen en suspensión cuando están en solución salina fisiológica (NaCl ~ 0,9 %), es decir, las células se mantienen a una cierta distancia unas de las otras. Si se producen ciertos cambios físicoquímicos en suspensiones de partículas de coloides o de células, como bacterias o glóbulos rojos, estas suspensiones pierden la estabilidad y los coloides o células se aglutinan, formando grumos a los cuales se denominan “aglutinados” (Harmening, 2013).

La aglutinación de glóbulos rojos en suspensiones fisiológicas puede ocurrir por dos mecanismos básicos: específico- mediados por Ac- e inespecífico- por cambios físico-químicos (García, 2004; Cerdas, 2015).

Esta estabilidad de los eritrocitos en solución puede ser afectada por la introducción de anticuerpos específicos que se fijan en los antígenos de la membrana eritrocitaria, produciendo la aglutinación específica de estas células. Este es el principio de los ensayos de hemaglutinación para detección de antígenos específicos. Pero en este ensayo, se asegura similar composición del formulado con respecto a los anticuerpos específicos de los sobrenadantes anti-D y anti-D débil (D^u) para las variantes introducidas, reduciendo este efecto como respuesta a la concentración de sales.

En la figura 10 se aprecia una disminución tanto en los valores del tiempo como de intensidad de la reacción, por la dilución de las sales; aun conteniendo estas formulaciones concentraciones de anticuerpos IgM e IgG similares a los que provocaron una reacción de aglutinación con un valor de intensidad de 4+, en los experimentos realizados anteriormente y mostrados en la figura 7.

El punto con la mayor concentración de sales (1X ~ 8 g/L), es precisamente donde se obtiene una aglutinación con una intensidad de 4+. En la medida en que la concentración de sales disminuye, la intensidad de la aglutinación disminuye hasta resultar fuera de los límites de calidad (1+) para la formulación con concentración de NaCl < 1 g/L (**Figura 10 y 11**). Por su parte, la avidéz aumenta, siendo significativo en la disminución de 8 g/L a 2 g/L de NaCl (1X - 0,25X) lo cual resulta en un comportamiento favorable al requisito.

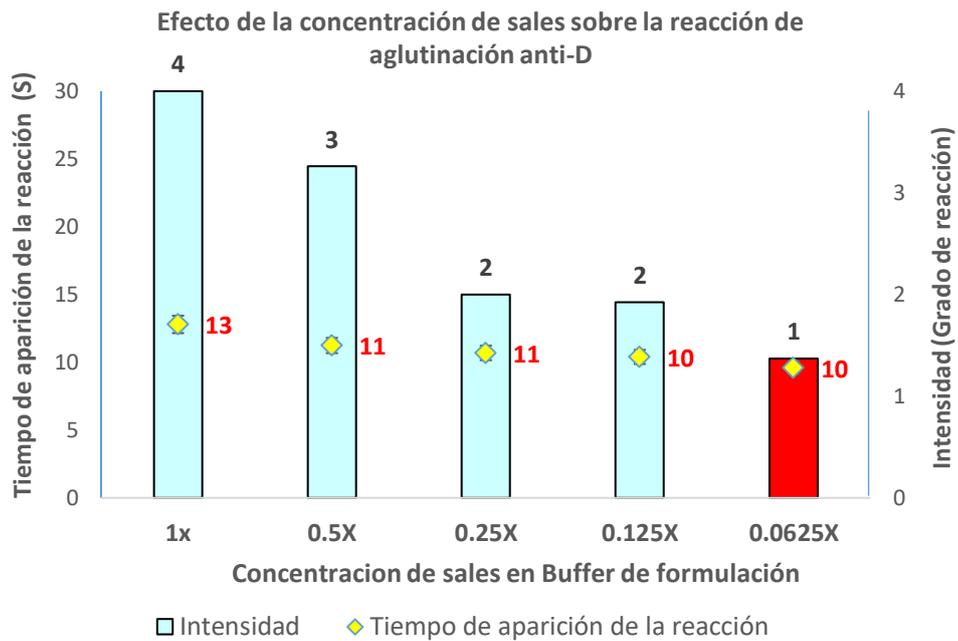


Figura 10. Efecto de la concentración de las sales en los valores de avidéz e Intensidad del formulado realizado a partir de un sobrenadante anti-D con valor de potencia de aglutinación 1024.

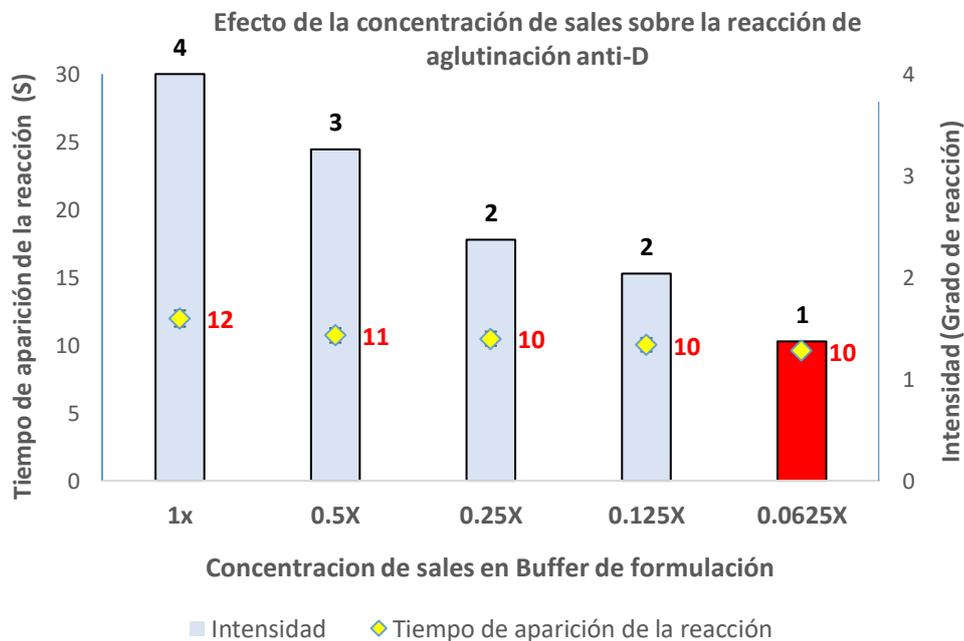


Figura 11. Influencia de la disminución de la concentración de las sales del Buffer PBS, en los valores de avidéz e Intensidad en el formulado realizados a partir de sobrenadante anti-D con potencia de aglutinación de 1024.

Las diluciones de los sobrenadantes empleadas actualmente en la formulación del Hemoclasificador anti-D, para el cual se emplea la solución salina, asegura el rango de concentración de sales de 0,5X a 1X, siendo este rango apropiado según demuestran los mejores resultados en los valores avidez e intensidad, obtenidos (Figura 10). No obstante, sería útil fijar una concentración de sales independientemente de la dilución del sobrenadante por su potencia, para evitar la variabilidad durante el proceso de formulación por dilución del Buffer de formulación. Esto aseguraría más que nada, la mejora en la avidez del formulado, característica muy deseada por el cliente.

Se reconoce la importancia de las sales y en especial, del Cloruro de sodio, en la reacción de aglutinación. De hecho, este es un compuesto tomado muy en cuenta al realizar el test de aglutinación, como componente fundamental de la solución salina empleada, precisamente por su efecto potenciador de la reacción (A5 PNO.001; Lomonte, 2007).

Los glóbulos rojos se comportan como partículas electronegativas en estudios de migración electroforética. Las proteínas de la membrana, principalmente las sialoglicoproteínas, son responsables de la electronegatividad (Cortés y col., 2014).

En medio salino (NaCl ~ 0,9%), iones positivos de sodio (Na⁺) son atraídos hacia los glóbulos rojos, y se crea una doble capa de cargas positivas que genera una fuerte repulsión interglobular, manteniendo los hematíes en solución. La diferencia de potencial eléctrico creada entre la doble capa de iones positivos (Na⁺) cerca del glóbulo y el medio con iones de sodio (Na⁺) y cloruro (Cl⁻) en equilibrio (neutro), se llama “Potencial Zeta” (**Anexo 4**). La fuerza de repulsión entre los glóbulos rojos, en medio salino, depende del valor del potencial Zeta (Pollack y Reckel, 1970).

En términos físicoquímicos, la aglutinación ocurre por la agregación de los glóbulos rojos (aglutinados), cuando la distancia entre ellos se reduce hasta un valor mínimo, conocido como **potencial Zeta crítico**. Esta distancia depende de la “tensión interfacial” (fuerza de cohesión), que tiende a agregar los glóbulos rojos, y de la “fuerza de repulsión”, debida a los escudos de cargas positivas creados alrededor de los glóbulos (cargas iguales se repelen). En la ausencia de agentes aglutinantes, la fuerza de repulsión predomina y mantiene la suspensión globular estable en medio salino (Sánchez, 2017).

La albúmina (BSA) además de ser un agente protector y aglutinante de las proteínas (Ac) por estabilización de sus cargas, también contribuye a la reducción de la tensión interfacial. Las sustancias macromoleculares - como albúmina, dextrana, ficol y polietilenoglicol (PEG) - cuando son añadidas al medio de suspensión de los glóbulos rojos, aumentan su constante dieléctrica (D), disminuyendo el valor del potencial Zeta de

la suspensión, favoreciendo la cohesión y, por tanto, la hemaglutinación (Pico y col., 1997).

La albúmina bovina (BSA) al 20% - 30% y el polietilenoglicol (PEG) son los medios macromoleculares más utilizados en inmunohematología (Cortés y col, 2014) para mantener el equilibrio; aunque las concentraciones más empleadas de la albúmina en formulaciones farmacéuticas son: 30%, 22%, 6%, 3%. La concentración de esta molécula se mantiene en un valor fijo al 2%, en los experimentos desarrollados, lo que podría considerarse como favorable su incremento a los valores reportados en bibliografía.

Por otra parte, las moléculas de anticuerpos son capaces de fijarse sobre sitios antigénicos de células adyacentes formando puentes entre ellas. La aglutinación se produce cuando una gran cantidad de células de eritrocitos son atrapadas en la red creada. Por lo que, la mejor actividad aglutinante es referida a los anticuerpos de clase IgM, más que IgG, estando ligada a su estructura pentamérica y por tanto, mayor posibilidad de establecer estas interacciones Ac-Ag (Tripathi y Sharma, 2017).

Por tanto, el incremento de la concentración iónica produce una interferencia en estas uniones, al establecer interacciones débiles con los anticuerpos, que entorpecen su fijación sobre los antígenos. Esta podría ser la causa por la cual la avidéz se muestra favorecida con la reducción de la concentración de estas y no, en los valores $\geq 0.25X$ (Figuras 10 y 11).

La avidéz es quizás la medida más general de toda la estabilidad o la fuerza del complejo antígeno-anticuerpo. Esto es controlado por tres factores: la afinidad anticuerpo-epítope; las valencias de ambos, antígeno y anticuerpo; y el arreglo estructural de las partes que interactúan (Sánchez, 2017).

Al reducirse las concentraciones de sales, se produce la atenuación de la doble capa de cargas positivas; provocando una disminución de la fuerza iónica y, por consiguiente, se incrementa las fuerzas de repulsión interglobular por la electronegatividad de los eritrocitos, aumentando el potencial Zeta; reflejada en la relación existente en la ecuación matemática desarrollada por Pollack para este potencial (Anexo 4).

La respuesta a este fenómeno se muestra como la disminución significativa de la Intensidad de la reacción de aglutinación, o incremento de la solubilización del aglomerado de hematíes (Figura 10). Se hace más evidente por la dilución igualmente del PBS, el que aporta también iones a este formulado, aunque en menor cuantía que lo que aporta el NaCl, como se observa en la figura 11.

El potencial Zeta (Z) de un sistema puede ser modificado por cambios en la composición del medio, que se consideran dentro de los efectos debidos a los cambios de la fuerza iónica y/o de la constante dieléctrica del sistema. La aglutinabilidad de un sistema es más alta mientras más bajo sea el valor del potencial Zeta (Cortés y col., 2014). Por consiguiente, los medios con alta fuerza iónica no son utilizados en inmunohematología.

Independientemente de que las sales del Buffer resultaron diluidas por diluciones seriadas, se realizó la medición del pH en cada punto de dilución y los valores obtenidos fueron de entre 7,34 - 7,39; no observándose afectación de la capacidad tamponante, ni del desplazamiento del valor fisiológico descrito para la ocurrencia de la reacción Ac-Ag (6.9 - 7.3).

La mayoría de los grupos sanguíneos demuestran su óptima reactividad entre 6.5 y 7.5 (Palomino, 2016). Por su parte, el punto isoeléctrico de la mayoría de los anticuerpos es aproximadamente 7.5 y a un pH inferior al PI el anticuerpo tiene carga positiva (Paniagua, 2017), lo que facilita su unión con los eritrocitos (con carga negativa). Para los anticuerpos anti-D (IgM), el pH óptimo de reacción se encuentra entre 6,5 y 7,0; por esta razón el pH óptimo para la sensibilización está entre 6,5 y 7,5 (García, 2011).

IV.3. Caracterización cromatografía del IFA anti-D y anti-D débil (D^w).

Se procedió a caracterizar cromatográficamente ambos sobrenadantes mediante HPLC, pudiendo ser utilizado este estudio como base para un Control de Proceso, previo a la etapa de formulación y permitiendo identificar sus componentes activos.

➤ Caracterización del IFA anti-D.

Bajo las condiciones de “corrida” establecidas, se visualizan por absorbancia a 280 nm cuatro picos de interés a Tiempos de retención (Tr) alrededor de 5, 7, 8, 11 minutos, respectivamente; característicos de los sobrenadantes anti-D que se producen en el LABEX, pues previamente Salgado (2018) se había referido a ellos en su trabajo. El cromatograma obtenido se visualiza en la **Figura 12**.

Se demostró que existe una reproducibilidad de los valores de tiempo de retención (Tr) identificados para cada pico cromatográfico, en todos los lotes utilizados; coincidiendo que el pico en el cual se adjudica la presencia de la IgM resulta en un Tr de 4.7 min - 6.6 min, determinando el máximo a Tr - 5.4 min. No obstante, pueden existir otros componentes de alto peso molecular que eluyen concomitante con la inmunoglobulina, procedentes del medio de cultivo no agotado.

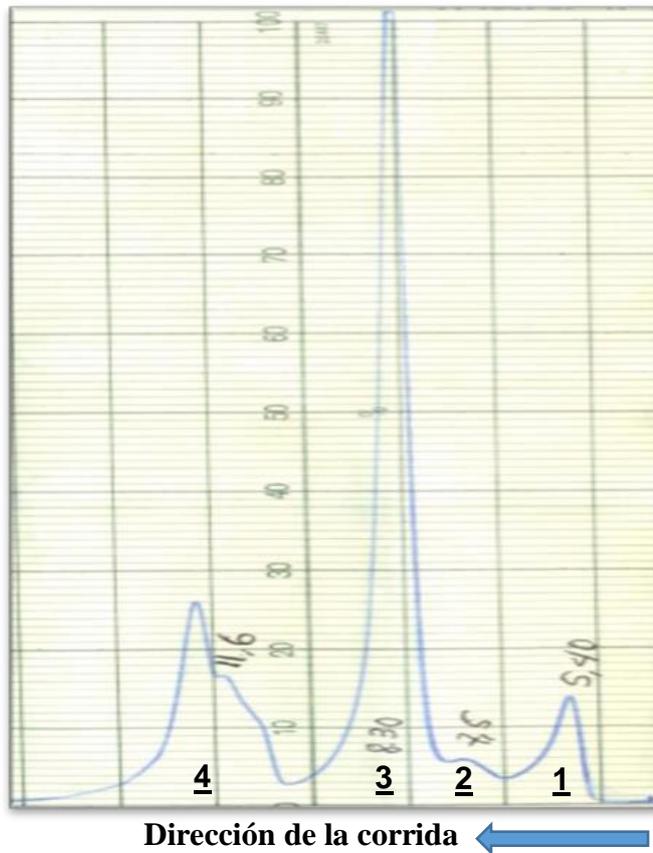


Figura 12. Cromatograma de la muestra del sobrenadante anti-D del lote 18MS1903, con potencia de aglutinación de 4096. (Se toman 100 uL de muestras y un flujo de 1 mL/min).



Figura 13. Prueba de aglutinación en lámina para eluato del pico 1 (Tr- 5.4) y pico 2 (Tr 7.5), de los componentes del sobrenadante 18MS1903 separados por HPLC: M1 positivo, M2 negativo, respectivamente.

Las inmunoglobulinas poseen PM entre 150 - 950 kDa, según el isotipo (**Anexo 5**), y la columna utilizada TSKgel G3000SW_{XL} permite separar moléculas desde 1,5 hasta 1000 kDa (TOSOH, 2019); por lo que confirma la suposición de que el pico de más rápida elusión podría ser el que contiene a la IgM. Se conoce que la IgM humana tiene un peso aproximado de 950 kDa (Padullés y col., 2013). Las moléculas de mayor peso molecular son aquellas que ofrecen menor tiempo de retención en la matriz de exclusión, seguidas progresivamente de las de menor peso molecular, que demoran más tiempo en abandonar la fase estacionaria (Warreth, 2020).

Ensayos anteriores en LABEX, utilizando similar cromatografía para separación de Ac de isotipo IgM a partir de un sobrenadante anti-B, refiere separación de esta Ig a Tr- 5.2 min demostrado por aglutinación directa en lámina, como se muestra en el **Anexo 6** (Zorrilla, 2020).

La presencia de la molécula de IgM para el Pico 1 (Tr - 5,4 min) en este trabajo, fue corroborado también mediante la prueba de aglutinación en láminas (**Figura 13**); donde se visualizó la reacción antígeno-anticuerpo altamente específica, al observarse la formación de gránulos según lo reportado por el Procedimiento de Calidad A5 PNO.001. El anticuerpo IgM es aproximadamente 750 veces más eficiente que la IgG en la aglutinación pudiendo realizarse en láminas directo, sin previa sensibilización del eritrocito (Salinas, 2015). El resto de los picos analizados arrojaron resultados negativos a la prueba de hemaglutinación directa.

Otro método que se utilizó para confirmar la presencia de IgM en la muestra procedente del primer pico de elución, fue la electroforesis en condiciones desnaturizantes y reductoras, empleando el protocolo descrito en el epígrafe III.5.2 del Capítulo - Materiales y métodos. La electroforesis de proteínas, cuyo fundamento es la separación de las moléculas según su carga eléctrica, permite aislar, separar y caracterizar moléculas según su peso molecular, previa desnaturalización y recubrimiento con SDS. Las condiciones reductoras favorecen la disrupción de las interacciones por puentes bisulfuros entre las cadenas ligeras y pesadas de las moléculas de inmunoglobulinas (Kricka y Park, 2018).

La **Figura 14** muestra los resultados de la corrida electroforética de las proteínas presente en el Pico 1 y reducida con 2-mercaptoetanol. La presencia de las bandas en los Rf correspondientes a pesos moleculares de 70 kDa y a 25 kDa, es indicativo de la presencia de IgM, según datos aportados por Sapparapu y col. (2012).

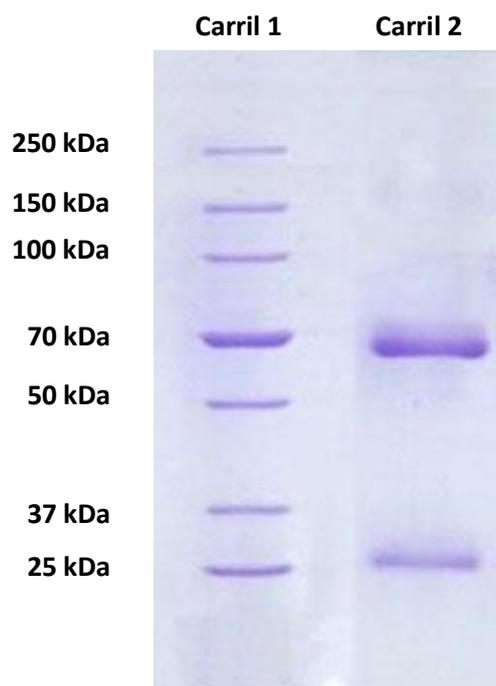


Figura 14. Electroforesis SDS-PAGE reducida al 12 % de muestras de sobrenadante del lote anti-D (IgM) 18MS1903.

Carril 1: Patrón de pesos moleculares

Carril 2: Pico 1 (Tr - 5,4 min).

El hecho de no observarse ninguna otra banda en la corrida de la electroforesis de esta muestra, evidencia que en el Pico 1 esta inmunoglobulina es mayoritaria dando criterio de pureza, como producto del cultivo del hibridoma; lo que nos permite fundamentar que la proteína obtenida mediante el protocolo aplicado de separación, no contiene ninguna otra contaminante detectable en las condiciones de ensayo (Figura 14).

En un gráfico de resolución de columnas TSKgel G3000SWXL, la albúmina sérica bovina - BSA (67 kDa) - eluye aproximadamente a los 8 min; mientras que se resuelven a Tr de 11 a 12 min, patrones referentes al tamaño como ribonucleasa A (12,6 kDa) o citocromo C (12,4 kDa), por ejemplo (TOSOH, 2019). Lo dicho anteriormente se soporta en el cromatograma en **Anexo 6**, del medio RPMI suplementado con 8% de SFB, medio utilizado en el proceso productivo del anti-D (IgM), donde sólo se observa un solo pico a Tr 8.38 min; el cual, por lo anteriormente expuesto se corresponde con los componentes del Suero Fetal Bovino, pues este no contiene otra proteína en su fórmula basal (Zorrilla, 2020).

De igual manera, en los sobrenadantes anti-D ensayados, se nota la presencia del pico característico de la albúmina: Pico 3, Tr – 8.3 min (Figura 12). En el suero fetal bovino se reconoce la presencia de albúmina y transferrina, cuyos pesos moleculares son de aproximadamente 60 y 95 kDa; cuyas funciones son necesarias para estimular crecimiento, para eliminar citotoxinas y promover la adhesión celular, entre otras funciones importantes (Arora, 2013).

➤ **Caracterización del IFA anti-D débil (D^u).**

Para la identificación y caracterización de la IgG - anti-D débil (D^u) - se asume que este es separado en Tr ~ 7 a 8 minutos, en el equipo de HPLC, bajo las mismas condiciones de corrida y misma columna aplicadas a la anti-D (IgM); pues ya previamente se había determinado el perfil cromatográfico característico del anticuerpo anti-CD45 producido en LABEX, lo que puede ser utilizado como referencia pues pertenece a la misma clase de inmunoglobulinas (IgG) (Rabel, 2014). Para la IgG se reporta PM alrededor de 150 kDa (Abbas y col., 2018) (**Anexo 5**).

En la **Figura 15** se obtiene un pico mayoritario a un Tr de 7.7 min, donde en trabajo anterior de Galindo (2020) se comprobó la presencia de esta Inmunoglobulina con la adición al sobrenadante anti-D, como un estándar interno de IgG anti-CD45, confirmando en estos casos la elución de la IgG al mismo tiempo de retención.

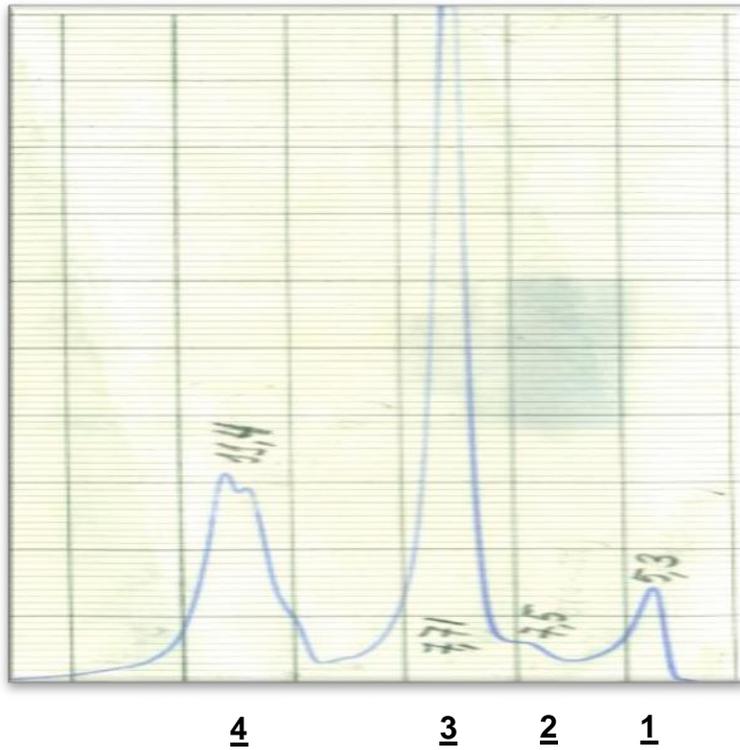


Figura 15. Cromatograma del sobrenadante de cultivo anti-D débil (D^u) lote 18GS1912, con potencia 1024.

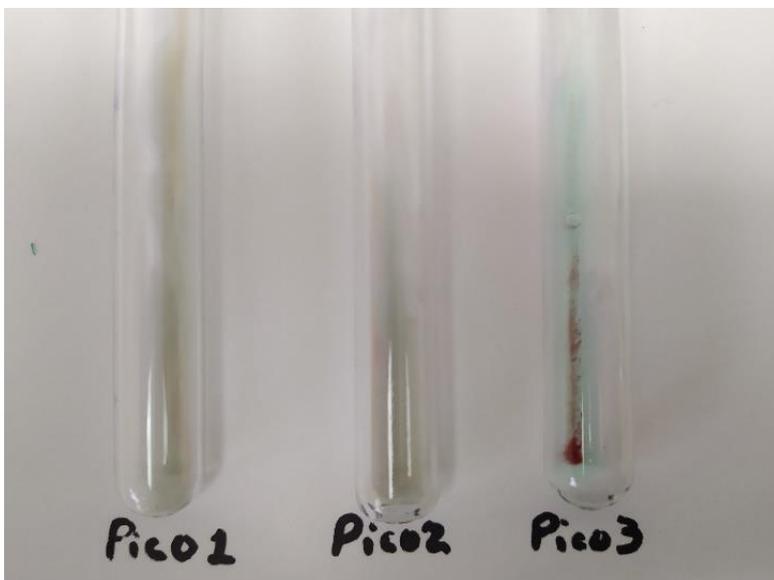


Figura 16. Resultados del ensayo de hemaglutinación indirecta, en tubo, para detección de la IgG en sobrenadante anti-D débil (D^u) lote 18GS1907): positivo para Pico 3 Tr 7.7 min.

En el caso del primer pico observado en el cromatograma podría resultar en agregados moleculares, dímeros, trímeros o tetrámeros de IgG no funcionales, presentes en la muestra al igual que otros agregados de mayor peso molecular con $T_r \leq 7,5$ min, favorecida su aparición por las altas presiones que se manejan en el HPLC (Figura 15, **Anexo 7**). Estos agregados absorben a 280 nm, pero no constituye de interés para este estudio.

Para comprobar la presencia de la IgG en las fracciones colectadas en cada pico, se comprueba si provoca aglutinación indirecta en tubo, siendo positivo solamente en la correspondiente al tercer pico (T_r -7,7 min) (**Figura 16**). Este ensayo al ser altamente específico discrimina si el IFA es preferentemente IgG. Dadas las características propias de la IgG de ser monomérica, no es posible visualizar bajo el mismo tratamiento la aglutinación en láminas mediada solo por esta inmunoglobulina; sino que se requiere la prueba indirecta en tubo empleando un anticuerpo anti-IgG, luego de ocurrida la previa sensibilización (A5 PNO.001; Salinas, 2015).

Como se había comentado anteriormente, la IgM es mucho más eficiente para aglutinar que la IgG, pues debido a su multivalencia posee una mayor capacidad para unirse a antígenos particulados multidimensionales que las otras clases de inmunoglobulinas (por ejemplo a, partículas de virus, eritrocitos, *étc.*).

El otro pico que se muestra es a T_r - 11,4 en todas las muestras ensayadas, los cuales podrían resultar en subunidades de menor peso molecular de las propias inmunoglobulinas como aminoácidos o polipeptidos, separadas igualmente por las altas presiones y flujos a los que son sometidas las muestras en el HPLC. También pudiera tratarse de componentes del medio, que permanecen sin consumirse, con pesos moleculares menores, retardándose en su elución.

Al igual que en el caso de la IgM, para confirmar la presencia de IgG en la muestra procedente del pico de elución 3, se procedió a la realización de una electroforesis en condiciones desnaturalizantes y reductoras la cual se muestra en la **Figura 17**. La presencia de las bandas en los R_f correspondientes a pesos moleculares de 50 kDa y a 25 kDa en el Pico 3, es indicativo de la presencia de IgG, según datos aportados por Sapparapu y col. (2012). Como se puede observar, en el carril correspondiente a las muestras se observan las bandas correspondientes a la IgG, evidenciando que en el Pico 3 se encuentra mayoritariamente esta inmunoglobulina.

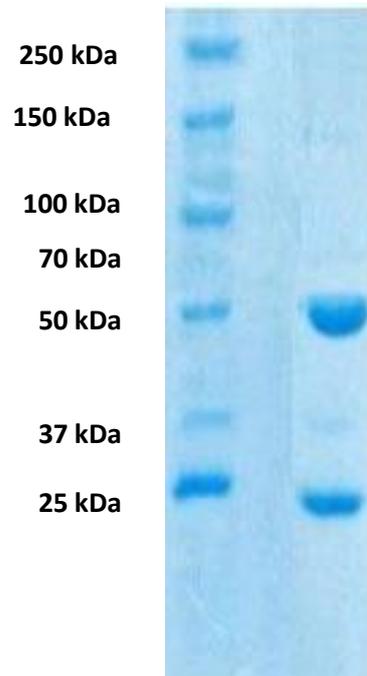


Figura 17. Electroforesis SDS-PAGE reducida al 12% de muestras de sobrenadantes anti-D débil (D^u).

C1: Patrón de pesos moleculares,
C2: Pico 3 (Tr -7,7 min).

IV.4. Determinación del rango de concentración crítica de las inmunoglobulinas para las formulaciones del Hemoclasificador.

La formulación basada en diluciones seriadas y estimación de la potencia, requiere la confirmación de cada una de las variantes ensayadas mediante la hemaglutinación, requiriendo tiempo en el ensayo (alrededor de 2 horas) y no siempre resulta efectiva en predecir la Potencia = 1024 del formulado por no existencia de una buena correlación (Anexo 3); adicionando, además, las pérdidas de material del IFA anti-D y anti-D débil (D^u). La determinación de la concentración de IgM y no sólo de la potencia, favorecería el uso eficiente de los lotes productivos del sobrenadante de cultivo conteniendo el IFA (IgM); constituyéndose en ganancias para la gestión económica del LABEX.

Una vez identificadas las moléculas de IgM e IgG en los picos de elución, a través de comparaciones de corridas cromatográficas y teniendo en cuenta que constituyen proteínas funcionales como anticuerpos, se empleó para su cuantificación la estimación de la concentración por correlación con la absorbancia, medida por el detector del equipo HPLC a λ 280 nm, empleando la ecuación de Lambert-Beer.

IV.4.1. Cuantificación de las moléculas de IgM e IgG en los sobrenadantes de cultivo.

Las curvas patrones obtenidas y utilizadas como referencia para cuantificar estas Ig se muestran en los **Anexos 8 y 9**, con sus respectivas ecuaciones.

La ecuación derivada de las curvas de calibración (Anexo 8 y 9), se puede utilizar para muestras con concentraciones de IgM menores de 0,22 mg/mL y para concentraciones de IgG menores de 1,80 mg/mL, como las determinadas en los sobrenadantes de cultivo anti-D producidos en LABEX en el período 2018 a 2020.

No obstante, este método de cuantificación de proteínas tiene limitaciones por cuanto se considera que todas las proteínas analizadas son del mismo tipo y están relativamente puras, por lo que cualquier contaminante afecta sus valores y a bajas concentraciones, las pérdidas en manipulación pueden afectar significativamente en su cuantificación. Por lo que debe asumirse, preferiblemente después de un proceso de separación y/o purificación de la biomolécula de interés (Restrepo, 2017).

Realizando una valoración del porcentaje, representado en la absorbancia a 280 nm del pico característico de cada isotipo de interés, con respecto al total de las proteínas contenida en los sobrenadantes según las absorbancias leídas para cada uno de los 4 principales picos resueltos en los cromatogramas respectivos de anti-D y anti-D débil (D^u) (Figuras 12 y 15); se tiene que en el primero la representatividad del Pico 1 es de

alrededor **8 - 12 %** de las absorbancias de los eluatos, mientras que en el sobrenadante anti-D débil (D^u), el Pico 3 es del **68 - 72 %**. Estos se asumen como proteínas funcionales, como IgM e IgG respectivamente, habiéndose analizado su presencia mayoritaria en cada pico, por análisis electroforético y hemaglutinación (Figuras 13 y 15, 16 y 17).

➤ **Determinación de la concentración crítica de anti-D.**

A partir del trabajo realizado por Salgado (2018), para proponer controles de procesos más exactos en la liberación del sobrenadante anti-D, se propone la estimación de la concentración mínima crítica de IgM en los Sobrenadantes producidos y posterior formulación del Hemoclasificador anti-D a partir del cálculo de este IFA en la formulación final (**Anexo 10**). En el mismo se establece un protocolo de ensayo, estableciendo un límite de concentración en el sobrenadante anti-D de hasta 0,035 mg/mL, sugiriendo trabajar con diluciones de hasta **0,037 mg/mL** de IgM. (**Tabla III**).

Teniendo como antecedentes este estudio, que refiere sólo los sobrenadantes anti-D producidos hasta 2018, se continua en esta misma línea de hipótesis ampliando el estudio a sobrenadantes producidos en el 2019, e incorporando el sobrenadante anti-D débil (D^u) (**Anexo 11**) (Galindo, 2020). Como la concentración de sobrenadante anti-D (IgM) es la que determina en mayor medida la potencia del formulado, como ya se ha descrito anteriormente, se hizo un compendio de todos los datos de concentración de la Ig trabajados en el 2019 en los formulados a pequeña escala, para los diferentes lotes producidos.

El promedio de los valores de concentraciones donde se evidenciaba esta caída de potencia, incumplimiento de requisito de calidad para el anti-D, en los lotes producidos en el 2019, se comportó en el rango $0,038 \pm 0,003$ mg/mL de proteína como IgM coincidiendo con Salgado (2018) que declaraba como el rango de concentración crítica de 0.035 - 0.041 mg/mL. Por tanto, este intervalo constituye de referencia para la concentración de IgM, que debe tener el Hemoclasificador anti-D para cumplir con los requisitos de calidad establecidos en el LABEX.

Se re-calculó un intervalo de **$0,039 \pm 0,002$ mg/mL**, incluyendo todos los datos obtenidos de sobrenadantes anti-D producidos del 2017 al 2019, para un nivel de confianza del 99%, resultando en un indicador de la precisión de la medición y de cuán representativo es el valor de **0,037 mg/mL** seleccionado *a priori* para la formulación.

Tabla III. Resultados de la aplicación del nuevo Procedimiento propuesto para la formulación de Sobrenadantes de Lotes 18MS1802 (A), 18MS1803 (B), 18MS1804 (C).

A)

Concentración (mg·mL ⁻¹)	Diluciones	Potencia
0,128	1:01	4096
0,041	1:3,15	1024
0,037	1:3,5	1024
0,032	1: 4	512

B)

Concentración (mg·mL ⁻¹)	Diluciones	Potencia
0,103	1:1	4096
0,041	1:2,54	1024
0,037	1:2,8	1024
0,032	1:3,2	512

C)

Concentración (mg·mL ⁻¹)	Diluciones	Potencia
0,103	1:1	2048
0,041	1:1,95	1024
0,037	1:2,15	1024
0,032	1:2,45	512

El método resulta más sensible, si se compara con otros métodos de determinación de inmunoglobulinas para el seguimiento de sueros de pacientes con disímiles patologías, ampliamente utilizados en los laboratorios de Inmunología del Sistema de Salud; como por ejemplo, los Turbidimétricos o la Inmunodifusión radial, los que tienen límite de detección superior a 4 mg/mL (www.monlab.com). De ahí la validez de su uso para procesos productivos como el establecido en el LABEX que requiere el monitoreo de la inmunoglobulina durante el mismo.

IV.4.2. Determinación del rango de concentración crítica en la IFA anti-D débil (D^u).

Similar abordaje se realiza para cuantificar la IgG en el sobrenadante anti-D débil (D^u), y se estima la concentración crítica mediante su correlación con el rango de dilución para el cual la Potencia pasa de 16 a 8, que constituye el límite establecido por especificación en el LABEX (ESP-5032).

En la **Figura 18** se ejemplifica con el lote anti-D débil (Du) SN 18GS1903, de potencia 256, cuyo valor de caída de potencia (16 a 8) se detecta en la dilución 1/7,9. En la **Tabla IV** se resumen los cálculos realizados para tres sobrenadantes con diferentes potencias de aglutinación, producidos en el 2019.

El valor promedio de concentración de IgG donde se evidencia el límite para cumplimiento del requisito está en $0,048 \pm 0,003$ mg/mL, considerada la concentración crítica. Por lo que la concentración de trabajo se fija a 0,045 mg/mL como IgG para los sobrenadantes de anti-D débil (D^u) que se utilizan en la formulación del Hemoclasificador, con el objetivo de cumplir con el requisito establecido por regulación en LABEX.

Realizando una comprobación del cumplimiento de este proceder, se escoge un lote producido en el 2020 de ior[®] Hemo-CIM anti-D y teniendo en cuenta los sobrenadantes anti-D y anti-D débil (D^u) de su Formulados estudiados del 2019, se comprueba mediante estimación de la concentración de cada IFA (IgM o IgG) las concentraciones evaluadas vs la concentración crítica determinada (**Tabla V**).

Aunque en los experimentos anteriores se muestra que la variación de concentración de anti-D débil (D^u) (IgG) no interfiere en la potencia de aglutinación del formulado, además de no estar regulada, esta podría servir de referencia para optimizar el formulado ante cambios regulatorios que pudieran sobrevenir o especificaciones al producto como requisitos para exportar.

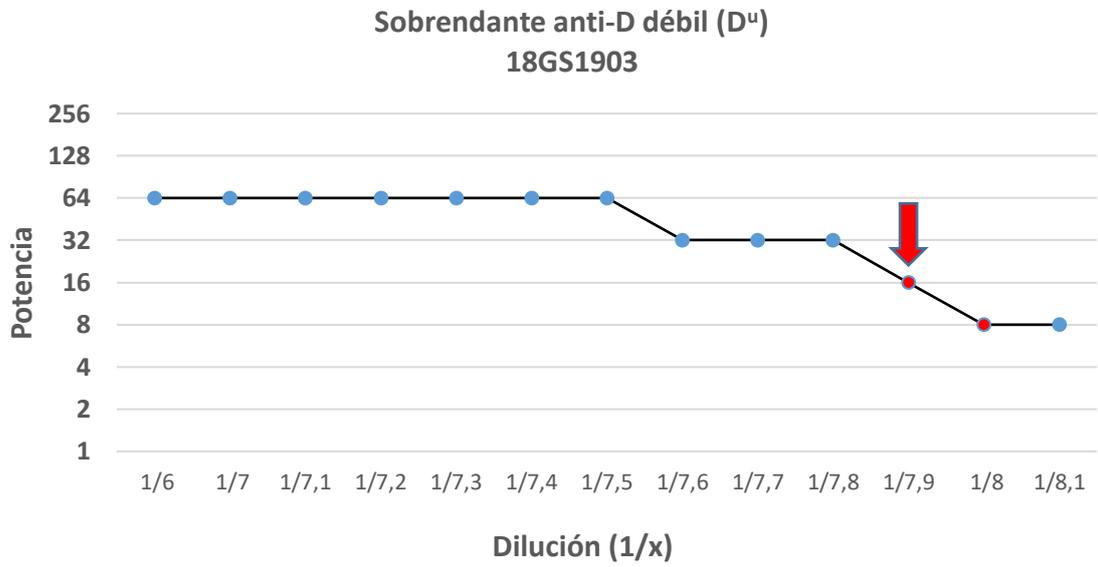


Figura 18. Comportamiento de la Potencia frente a diferentes diluciones del sobrenadante anti-D débil (D^u) lote 18GS1903. La flecha indica el límite mínimo de Potencia de aglutinación establecido para usos de estos sobrenadantes (ESP-5032).

Tabla IV. Valores de dilución y concentraciones críticas para mantener requisito de potencia ≥ 16 en los sobrenadantes anti-D débil (D^o) 18GS1912 (A), 18GS1903 (B), 18GS1907 (C).

A) Sobrenadante 18GS1912 (Potencia de 512).

Concentración (mg·mL ⁻¹)	Diluciones	Potencia
0,079	1:6	32
0,064	1:7	32
0,056	1: 7,8	32
0,050	1: 7,9	16
0,051	8	8

B) Sobrenadante 18GS1903 (Potencia de 256).

Concentración (mg·mL ⁻¹)	Diluciones	Potencia
0,044	1:6	64
0,050	1:7	64
0,048	1:7,8	32
0,045	1: 7,9	16
0,046	1: 8	16

C) Sobrenadante 18GS1907 (Potencia de 128).

Concentración (mg·mL ⁻¹)	Diluciones	Potencia
0,005	1:6	16
0,008	1:7	16
0,008	1:7,2	16
0,009	1:7,3	16
0,011	1: 7,4	8
0,020	8	4

Tabla V. Ejemplo de cálculo de concentración de Inmunoglobulinas en formulado anti-D del año 2019.

Sobrenadantes	Potencia SN	Dilución realizada	Formulado	Potencia F	Avidez
18MS1903	4096 (16:1)	1\2	18F1904	2048	12 S
18GS1903	256	1\8			
Cálculo de las concentraciones del IFA (en base a Procedimiento descrito)					
Conc. IgM (mg/mL)	0,1432	1\2	0,07162	> 0,037	
Conc. IgG (mg/mL)	0,0567	1\8	0,0077	< 0,045	

Esto refuerza el valor de conocer la concentración de IgM como base de los cálculos de la formulación. Sin embargo, la concentración de IgG está por debajo del valor crítico determinado, no afectando significativamente el comportamiento de la potencia del formulado. Este comportamiento se había previsto, teniendo en cuenta los resultados del **acápite IV.2.2.**

El rango de concentración crítica puede ser corregido, en la medida que se amplíe el estudio de nuevos formulados de manera comparativa entre ambos procedimientos, reduciendo el intervalo de confianza a trabajar para un 95 % o 99 % de probabilidad.

Esto permite valoraciones de formulación en base a un uso eficiente de los sobrenadantes, por cuanto constituyen los Ingredientes principales en el producto terminado; reduciendo los costos productivos, con un mayor alcance para cubrir las demandas y lograr una mayor cobertura del diagnosticador.

IV.5. Propuesta de cambios en la formulación del anti-D.

Se establece una concentración de **IgM de 0.038 mg/mL** como punto de partida para los volúmenes de sobrenadantes anti-D en los formulados y sus diluciones, asegurando así el no rebasar la concentración crítica de anti-D referida en este trabajo; fundamental para obtener la Potencia del Formulado en correspondencia con los criterios de calidad. Además, se sugiere evaluar fijar las relaciones de potencias de anti-D con anti-D débil (D^u) de **1:16**; pues para anti-D la potencia de 1024 se fija como máximo y para el anti-D débil (D^u) una potencia de 16 podría manejarse, para hacer uso óptimo del IFA anti-D.

Combinando ambos efectos estudiados, concentración de IFA y de las sales, se sugiere trabajar en la formulación a concentraciones fijas de NaCl de 4g/L para mejorar al máximo la Aidez, con presencia de la BSA y PBS en iguales concentraciones a las del procedimiento hasta el momento. También podría evaluarse incrementar el BSA al 3% para favorecer la estabilidad de los Ac y el incremento de la constante dieléctrica, resultando en garantizar una buena Intensidad.

A pesar que la Potencia resulta el indicador de referencia “crítico” para la liberación del producto hemoclasificador, la Aidez constituye el requisito del producto con mayor percepción (utilidad) por parte del cliente, pues determina la velocidad de obtención de un resultado que incide en la ejecución o no de la transfusión y su prontitud. Hacia este último requisito han sido dirigidos los principales planteamientos de “mejoras continuas” al reactivo ior[®] Hemo-CIM anti-D, en los *Talleres de Productos* realizados en el LABEX, dentro del principio de “enfoco al Cliente” del Sistema de Gestión de la Calidad.

IV.6. Valoración económica del procedimiento propuesto para la Formulación del Hemoclasificador anti-D.

Se realizó una valoración económica en función del ahorro que representa la realización de la formulación a partir de la concentración de IgM, con respecto al procedimiento que actualmente se emplea en LABEX, teniendo como base del cálculo la estimación de cuánto volumen de Hemoclasificador anti-D no se obtuvo por el uso de las diluciones seriadas basadas en el valor de Potencia.

Para ello se utilizaron los datos de producción de un lote de Hemoclasificador anti-D 18F1904, el que se liberó con una Potencia de 2048, cumpliendo requisito de calidad; y que fue formulado a partir de una dilución 1:2 (v:v) del sobrenadante 18MS1903 con Potencia de 4096 (**Tabla VI**). Esta resulta en el valor de Potencia más frecuente en los sobrenadantes producidos en el 2019, siendo el 53 % de los lotes. A este lote de sobrenadante (18MS1903) se le determinó la concentración estimada de IgM, siguiendo el protocolo analítico descrito y discutido, resultando de 0,1432 mg/mL (ver epígrafe III.6.2, Anexo 10).

Haciendo un cálculo de la dilución recomendada utilizando el procedimiento de formulación a partir de la concentración de IFA IgM y fijando igualmente a 0,038 mg/mL la concentración de trabajo de la Ig de interés, esta sería de 1:3,5 asegurando la potencia a 1024. Realizando la formulación, se obtiene una ganancia en volumen del sobrenadante 18MS1903, por aprovechamiento del IFA, de 1.5 L por cada litro – L- formulado. Nótese que, si siguiéramos estrictamente la formulación mediante diluciones por la Potencia, se habría diluido 4 veces el sobrenadante anti-D de partida, quedando la concentración de IgM cercano al límite de concentración crítica – 0,035 mg/mL para IgM – pudiendo poner en riesgo la liberación de la formulación por incumplimiento de requisito; pues basta que uno de los parámetros de formulación se encuentre en valores subóptimos.

Para la formulación del anti-D 18F1904 por referencia al valor de Potencia, por cada litro del lote de sobrenadante liberado se produjo 4 L del formulado, resultando en una producción total de Hemoclasificador anti-D de 8 L. De haberse aplicado el nuevo procedimiento se hubiese podido producir a partir del mismo IFA, 14 L del Hemoclasificador. Si se valora su repercusión económica en la comercialización del ior[®] Hemo-CIM anti-D, fueron dejados de ingresar más de de \$ 40 000 CUP en la venta de esta producción de ior[®] Hemo-CIM anti-D en el 2019.

En la **Tabla VI**, se hace un resumen del cálculo realizado para la comparación del valor económico de la cuantificación con mayor exactitud del IFA IgM, en términos de aprovechamiento eficiente de la “materia prima generada” (sobrenadantes).

Tabla VI. Valoración del impacto económico del uso de la concentración de IgM como criterio de formulación para el ior® Hemo-CIM anti-D.

IIV.5. Parámetro	Procedimiento realizado	Procedimiento propuesto*
Potencia del Sobrenadante de anti-D 18MS1903	4096	-
Potencia del Sobrenadante de anti-D débil (D ^u) 18GS1903	256	-
Concentración de IgM	-	0,1432 mg/mL
Concentración de IgG	-	0,0567 mg/mL
Volumen del Sobrenadante anti-D	4 L	4 L
Dilución IgM para formular	1:2	1/3.5*
Dilución IgG para formular	1:8	1/16**
Potencia del formulado 18F1904	2048	1024
Concentración estimada de IgM	-	0,038 mg/mL
Volumen total de formulados	8 L	14 L
Cantidad de frascos del producto final (dosis de 5,5 mL)**	1444	2535***
Ingreso por venta (CUP)***	\$ 53 007.79	\$ 93 057,31****
Ingresos adicionales	-	\$ 40 049,52

* Los valores se determinan a partir de cálculos de la concentración según procedimiento propuesto, utilizando como concentración 0.038 mg/mL de IgM final en el formulado.

** Se mantiene la relación con respecto a la potencia del sobrenadante anti-D de 1:16

*** Se eliminan 10 frascos por lote, los que son usados para la liberación por Control de Calidad y en muestras de retención.

**** Se calcula sobre la base del precio del ior® Hemo-CIM anti-D para el Sistema Nacional de Salud que es de \$ 36.709 CUP (precio hasta 2020).

Es válido resaltar que el ior[®] Hemo-CIM anti-D constituye el producto de mayor venta, entre los hemoclasificadores comercializados por el LABEX, resultando por ejemplo alrededor del 35 % de los ingresos totales por ventas obtenidos en el LABEX en el 2019 (LABEX, 2019).

Este constituye además el único reactivo para serotipaje comercializado en el país de producción nacional y propio del LABEX, lo que requiere un tratamiento diferenciado en los planes de mejoras que se diseñan; por cuanto representa más que ninguno, los productos del LABEX y el que los clientes asocian al desempeño productivo de estos Laboratorios (Pérez, 2019).

Conclusiones

V. CONCLUSIONES.

- La principal falla de calidad de los reactivos hemoclasificadores producidos en el LABEX, después del cambio de estrategia productiva en el 2017, está dada en la variabilidad de la Potencia; lo que generó la formulación previa a pequeña escala (10 mL) como medida preventiva, generando pérdidas de sobrenadante útil.
- La concentración de IgM como sobrenadante anti-D determina la “potencia” del formulado anti-D y afecta a la “avidez” de manera correlacionada, siendo el principal componente de IFA para la formulación del hemoclasificador. Por su parte, la “intensidad” es afectada negativamente por la disminución de la concentración de sales la que refiere valores favorables para la estabilidad del formulado en valores de 4g/L a 8 g/L
- La variación en las cantidades relativas de sobrenadante anti-D débil (D^u) no provoca afectaciones significativas de los parámetros de calidad del hemoclasificador anti-D.
- La caracterización Cromatográfica de ambos sobrenadantes anti-D y anti-D débil (D^u) permitieron obtener perfiles característicos y reproducibles de estos, además de identificar los Tr de la IgM e IgG respectivamente, en los eluatos, que pueden ser usados en controles de procesos productivos.
- Se propone realizar la formulación teniendo en cuenta la concentración mínima de IgM de 0.037 mg/mL y una relación 1:16 (v:v) entre sobrenadantes anti-D/anti-D débil (D^u); manteniendo una concentración de NaCl en el formulado de 4 mg/mL e incrementando la concentración de BSA a 3 %. Este cambio tiene como referencia las concentraciones de IFA y no la potencia de los sobrenadantes, mejorando la precisión y confiabilidad en el formulado anti-D.
- Con la introducción de estos cambios se asegura un mejor aprovechamiento de los IFA y un aumento en los ingresos por la mayor disponibilidad de ior[®] Hemo-CIM anti-D a venta, impactando positivamente en la gestión económica del LABEX y la cobertura del Sistema Nacional de Salud.

Recomendaciones

V. RECOMENDACIONES.

- Ensayar las propuestas de mejoras a la formulación, aportadas por el trabajo, para hacer un uso efectivo de sobrenadantes y registrando los beneficios económicos en un período de un año.
- Establecer en paralelo determinaciones de conc. (IgM) en los formulados, por estimación mediante método de la absorbancia a 280 nm (propuesto), previa separación Cromatográfica, y determinaciones cuantitativas por ELISA, para determinar la precisión del procedimiento.

Bibliografía

VI. BIBLIOGRAFÍA.

- Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S. Inmunología Celular y Molecular. Ed. Elsevier castellano, 9na edición, Barcelona, España, pp. 576. **2018.**
- Aiba, Humprey, Millis. Biochemical Engineering. Ed. Ciencia y Técnica, La Habana. **1970.**
- Alfonso Y., Bencomo A. Procedimientos para la detección e identificación de anticuerpos eritrocitarios. Rev cubana Hematol Inmunol Hemoter v.17 n.2: 98-107. **2001.**
- Aranda J. Desarrollo de un Método por Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución para análisis de aminoácidos en ingredientes utilizados en la alimentación animal. Universidad Autónoma de Nueva León. Diciembre, p12-18. **2002.**
- Arndt C., Koritska S., Bartsch H., Bachmann M. Native polyacrilamide gels. Methods in Molecular Biology; 869: 49-53. **2012.**
- Arora M. Medios de cultivo celular: una revisión. Mater Methods, 3: p 175. **2013.**
- Avent N. Molecular biology of the Rh blood group system. J Pediatr Hematol Oncol, 23:394-402. **2001.**
- Avent ND, Reid ME. The Rh blood group system: a review. Blood, 95:375-387. **2000.**
- Baptista HA. El sistema Rh, una mirada a fondo. Rev Med Inst. Mexicana Seguro Soc., 43 (1): 3-8. **2005.**
- Bautista J. Factores que intervienen en la reacción antígeno-anticuerpo y clasificación antigénica eritrocitaria. Rev Med Inst Mex Seguro Soc; 43 (Supl 1): 9-12. **2005.**
- Bencomo A., Alfonso M., Rivero R., Sosa L. Desarrollo de la Inmunohematología en el Instituto de Hematología e Inmunología. Rev. Cubana de Hematología Inmunología y Hemoterapia, 27 (1): 109-118. **2011.**
- Boylston AW, Gardner B., Anderson RL. Hughes Jones NC. Production of human IgM anti D in tissue culture by EB virus transformed lymphocytes. Scand J Immunol; 12:355. **1980.**
- Cartron J, Bailly P, Le Van Kim C. Insights into the structure and function of membrane polypeptides carrying blood group antigens. Vox. Sang, 74: 29-64. **1998.**
- Carrillo JG., Candia MC., Lugo-Sepúlveda RE., Espinoza-Ojeda E. y Noriega-Rodríguez JA. Evaluación de Procedimientos de Tinción para el Análisis de Proteínas por Electroforesis (SDS-PAGE). Universidad de Sonora. INVURNUS, 8 (1): 19-26. **2013.**
- CECMED. Regulación 59/2011: Requisitos de los diagnosticadores utilizados en inmunohematología, La Habana, Cuba. **2011.**
- CECMED-MINSAP. Regulación 50/2012: Clases de riesgo de los diagnosticadores, La Habana, Cuba. **2012.**
- CECMED. Resolución No. 174/2018. La Habana. **2018.**
- Cerdas C. Uso de anticuerpos monoclonales en inmunohematología y bancos de sangre. Rev. Colegio de Microb. Quim. Clin, 21(1):7-11. **2015.**

- Cortés A., Muñiz E., León G. Inmunohematología básica y aplicada, 1ra. ed. CEP-Banco de la República-Biblioteca Luis Ángel Arang, Sección I, Santiago de Cali, Colombia: pp. 493. **2014.**
- Decaro J, Lemos F, Magri M. Historia de la Medicina Transfusional. Montevideo, Uruguay, 120-124. **2010.**
- Flegel W, Wagner F. Molecular Biology of partial D and weak D: Implication for Blood Bank practice. Clin. Lab., 48:53-59. **2002.**
- Galindo E. Evaluación del procedimiento de formulación del Hemoclasificador ior® Hemo-CIM anti-D. Trabajo de Diploma en Opción al Título de Licenciatura en Biología. Universidad de Oriente: 53 pgs. **2020.**
- García A. Anticuerpos monoclonales. Aspectos básicos. Neurología, 26 (5): 301-306. **2011.**
- García V. Reacciones de aglutinación. Gac Méd Méx Vol. 140, Suplemento No. 3: 1-10. **2004.**
- Gavilondo J. Anticuerpos Monoclonales. Teoría y Práctica. Ediciones Elfos. La Habana: 31-45. **1995.**
- Harmening D. Clinical Hematology and Fundamentals of Hematosis, 5th Ed. F a Davis Company, **2013.**
- Heredia S. Establecimiento de un proceso productivo in vitro para la obtención de un reactivo hemoclasificador anti-D. [Tesis de Maestría] Cuba: Universidad de Oriente-LABEX; **2015.**
- Heredia, S. Establecimiento de un proceso productivo in vitro para la obtención de un reactivo hemoclasificador anti-D. Tesis de Maestría en Biotecnología, Universidad de Oriente, Santiago de Cuba, pp. 94. **2015.**
- Ávila S. Establecimiento de un proceso productivo in vitro para la obtención de un reactivo hemoclasificador anti-D. Tesis de Maestría en Biotecnología, Universidad de Oriente, pp. 89. **2015.**
- Hernández P., Bencomo A., Rivero R. Evaluación de anticuerpos monoclonales anti-D para el tipaje RhD. Rev Argent Transfus; 26:143-54. **2000.**
- Holzlohner P., Hanack K. Generation of murine monoclonal antibodies by hybridoma technology. J Vis Exp.; 119: 54832. **2017.**
- Huang C, Liu P, Cheng J. Molecular biology and genetics of the Rh blood group system. Semin Hematol; 37:450-165. **2000.**
- Jentoft FC. Diffuse Reflectance Ir and UV-vis Spectroscopy. Fritz Haber Institut der Max Planck Gesellschaft. Alemania. **2014.**
- Judd WJ, Moulds M, Schlanser G. Reactivity of FDA-approved anti-D reagents with partial D red blood cells. Immunohematology; 21(4):146-8. **2005.**

- Kenneth A., Rubinson J., Rubinson F. Análisis Instrumental. *Ed. Pearson Educacion*, Madrid: pp. 353. **2001**.
- Kóler G., Milstein C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature*, 256: 495-497. **1975**.
- Körmöcz F., Mayr R., Responder Individuality in Red Blood Cell Alloimmunization. *Transfusion Medicine and Hemotherapy*. Vol. 41, no. 6, p. 446–451. **2014**.
- Kricka LJ, Park JY. Immunochemical techniques. In: Rifai N, ed. *Tietz Textbook of Clinical Chemistry and Molecular Diagnostics*. 6th ed. St Louis, MO: Elsevier, Chap. 23. **2018**.
- Landsteiner K., Wiener AS. An agglutinable factor in human blood recognised by immune sera for Rhesus blood. *Proc Soc Exp Biol Med*, 43: p 223-224. **1940**.
- Lomonte, B. Manual de Métodos inmunológicos, 138 pp. Universidad de Costa Rica. 2007. Disponible en: <http://www.icp.ucr.ac.cr/~blomonte/>
- Machado N, Téllez G, Castaño J. Anticuerpos monoclonales: desarrollo físico y perspectivas terapéuticas. *Infection*, 10(3), pág 186-197. **2006**.
- Mayolo K., Martínez LM., Rito M. Técnicas Cromatográficas y su Aplicación a Estudios de Cambios Conformacionales, Estabilidad y Replegamiento de Proteínas. *Rev. Mexicana de Ingeniería Química*, 11(3): 415-429. **2012**.
- Melamed MD, Gordon J, Ley SJ, Edgar D, Hughes Jones NC. Senescence of a human lymphoblastoid clone producing anti rhesus (D). *Eur J Immunol*; 15:742-6. **1985**.
- Mitra R, Mishra N, Rath G. Blood Group Systems. *Indian Journal Anaesthesia*; 58 (5): 524-528. **2014**.
- Mollison PL, Engelfreit CP, Contreras M. *Blood Transfusion in Clinical Medicine*, 10th ed. Oxford: Blackwell, **1997**.
- Padullés N., Duero M., Jódar RJ., Montoro JB. Características Técnicas de las Inmunoglobulinas Intravenosas Comercializadas en España. Grupo español de Medicamentos Hemoderivados, Sociedad Española de Farmacia Hospitalaria, Editorial GRIFOLS-CSL Behring, 2a edición, España. **2013**.
- Palomino F. Fisiología del sistema ABO una mini-revisión narrativa. *Medicina Transfusional*, 13 (1):16-20. **2016**.
- Paniagua R. *BIOLOGÍA CELULAR Y MOLECULAR- Base celular de la respuesta inmunitaria*. 4ta *Ed.*, CAPÍTULO 12, McGraw-Hill, London, pp. 818. **2017**.
- Perkampus, H.H., Introduction. In: *UV-VIS Spectroscopy and Its Applications*. *Ed. Springer Lab Manuals*, Berlin, **1992**.
- Pérez ML., Soriano J., Ponce E, Díaz LM. Electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS como herramienta en el estudio de las proteínas miofibrilares: Una revisión. *NACAMEH*, 9 (2): 77-96. **2015**.
- Pham B, Kappler-Gratias S., Auxerre C., Dubeaux I., Beolet M., Ripaux M, Le pennec P. Systematic RH genotyping and variant identification in French donors of African origin. *Blood Transfusion*. January 2014. Vol. 12, no. Suppl 1, 264– 272. **2014**.

- Parham P. The Immune System. Fourth edition. Garland Science. **2014**.
- Pico MC, Giralдино IG, Otero A. Inmunología experimental. La Habana: Félix Varela, **1997**.
- Pinillos J, Lopera C. Elaboración de una formulación farmacéutica a través de un diseño experimental de mezclas. rev. de la facultad de química farmacéutica, Vol. 16 (3): 338-353. **2009**.
- Pollack, W., Reckel, R. P. The Zeta Potential and Hemagglutination with Rh Antibodies: A Physicochemical Explanation. Ortho Research Foundation, Raritan, N.J. Int Arch Allergy; 38:482-496. **1970**.
- Rabel G. Obtención del anti-CD45 conjugado con Isotiocianato de Fluoresceína. Tesis de Maestría, Universidad de Oriente, Santiago de Cuba. **2014**.
- Regulación No. 59-2011. Requisitos de los diagnosticadores utilizados en inmunohematología. CECMED, Cuba. **2011**.
- Restrepo J. Validación de un método cromatográfico para evaluar la calidad proteica de alimentos y su impacto en los niveles plasmáticos. Rev de Ciencias, 23 (1), junio: 12-21. **2017**.
- Rivero R. Anticuerpos monoclonales anti-Rh (D): Antecedentes y estado actual. Rev. Cubana Hematol Inmunol Hemoter 16(1):30-37. **2000**.
- Salgado, M.B. Propuesta de un procedimiento para mejorar la formulación del Hemoclasificador anti-D a partir de concentraciones de IgM^o. Tesis en opción al título de Licenciatura de Farmacia, Universidad de Oriente, Santiago de Cuba. **2018**.
- Salinas Carmona MC. Principios de la inmunología aplicados a la hematología. En: Hematología, la sangre y sus enfermedades. Eds. Jaime Pérez J.C., Gómez Almaguer J. McGraw-Hill, Nueva York, **2015**.
- Sánchez L. El laboratorio de inmunohematología. Rev Mex Med Tran, 10, (1): 5-13. **2017**.
- Sandoval, C. Frecuencia de antígenos eritrocitarios del sistema ABO y RH (D), en la etnia Weenhayek o Matacos, asentada en el Chaco boliviano, Sucre. Revista de Energía Química y Física. Diciembre Vol.1 No.1: 1-59. **2014**.
- Sapparapu G., Planque S., Mitsuda Y., McLean G., Nishiyama Y., Paul Y. Constant Domain-regulated Antibody Catalysis. Journal of biological chemistry vol. 287, no. 43: 36096–36104. **2012**.
- Sgariglia M., Soberón J. R., Sampietro D., Vattuone M. Cromatografía: Conceptos y Aplicaciones. Revista Arakuku, Año 2 (1): 1-6. **2010**.
- Simler, R., Walsh, G., Mattaliano, RJ, Guziewicz N., Perez B. Maximización de la recolección y análisis de datos durante la preformulación de proteínas bioterapéuticas. BioProcess International 6 (10): 38-45. **2008**.
- Tripathi P, Sharma S. Immunology and Immunotechnology. *En: Biotechnology Trends and applications*, Capítulo VI, *Ed. Elsevier, Oxford Press, United Kingdom*. **2017**.
- Vengelen V. Technical Manual. 13rd ed. Bethesda, *Ed. American Association of Blood Banks*. Washington DC. **1999**.

- Voss T., Haberl P. Observations on the reproducibility and matching efficiency of two-dimensional electrophoresis gels: Consequences for comprehensive data analysis. *Electrophoresis*; 21: 3345-50. **2000**.
- Arndt C., Koritska S., Bartsch H., Bachmann M. Native polyacrilamide gels. *Methods in Molecular Biology*, No. 869: 49-53. **2012**.
- Wagner, FF. y Flegel, WA. The molecular basis of the Rh blood group phenotypes. *Immunohematol*, 20: 23-36. **2004**.
- Warreth S. Downstream Processing-An overview of Mab Purifications Methods. *Bioprocess Int.*, eBook, November. **2020**.
- Yujra M., Tito E. Inmunoglobulinas. *Rev. Act. Clin. Med.*, vol. 13 (octubre): 663-666. **2011**.
- Zhang C., Proetzel G., Ebersbach H. Hybridoma technology for the generation of monoclonal antibodies. Editores. *Antibody Methods and Protocols*. New York; Humana Press: 117-35. **2012**.
- Zorrilla H. Producción de sobrenadante anti-B en un medio de cultivo alternativo. Tesis de Maestría en Biotecnología, Universidad de Oriente, Santiago de Cuba. **2020**.

Sitios Web Consultados:

Inmunoglobulinas: Estructura, Tipos y Funciones. Disponible en: <https://www.lifeder.com/inmunoglobulinas/> , (Revisado el **08/04/2020**).

Cromatograma: para qué sirve y tipos. Disponible en: https://www.lifeder.com/cromatograma_ , (Revisado el **11/02/2020**).

Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos. Suplemento para Dispositivos Médicos. 3a. ed. México: 2014. Disponible en: www.farmacopea.org.mx , (Revisado el: **20/1/20**).

Menor-Salvan. Métodos electroforéticos. Disponible en: <http://www3.uah.es/chemevol/index.php/sds-page-electroforesis-en-gel-de-poliacrilamida> (Revisado el **14/02/2020**).

Benalcázar R., Lucia Y. Determinación de la capacidad de detección de los reactivos monoclonales y policlonales utilizados para la identificación del antígeno (d) en técnica de tubo Quito. 2013. Disponible en: <http://repositorio.puce.edu.ec/handle/22000/9630> (Revisado el: 06/08/2020).

Standard Operating Procedures (SOPs) Laboratorio de Genómica Viral y Humana Facultad de Medicina UASLP. Disponible en: http://www.genomica.uaslp.mx/Protocolos/Cell_Buffer_PBS.pdf (Revisado el **19/08/20**).

TOSOH BiosCiENCE. "Separation of Monoclonal Antibodies Using TSKgel HPLC Columns". Separation Report No. 74. **2019**. Disponible en:

<https://www.separations.eu.tosohbioscience.com/OpenPDF.aspx?path=/File%20Library/TBG/Products%20Download//Separation%20Report/sr12I74a.pdf> (Revisado el 7/agosto/2020).

TOSOH, Introduction to TSK-GEL Size Exclusion Chromatography Columns. **2019**. Disponible en: <https://www.tosohbioscience.com/> (Revisado el 5 de Octubre del 2020).

MonLabTest. Determinación cuantitativa de Inmunoglobulina M (IgM). Turbidimetría. Disponible en: www.monlab.com (Revisado en: Septiembre/2020).

SGC del LABEX, Documentos. Disponible en: http://cimsp/labex/DOCUMENTOS_LABEX

CECMED, Sistema de Gestión de Información. Disponible en: <https://www.cecmecmed.cu/liberacion-de-lotes>

Documentación de LABEX empleadas:

- G2 EM.001. Expediente Maestro del ior[®] Hemo-CIM anti-D. LABEX, Edic.08, 2020.
- ***Procedimientos Normalizados de Operación (PNO):***

H10 PNO-002. Análisis y pureza por filtración en Gel en HPLC para AcM en solución y Kit fríos. 2007.

A5 PNO.001- Determinación de la actividad biológica de la materia prima y del reactivo hemoclasificador anti –D, Edición No. 7, 2017.

A5 PNO.O03- Electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS – PAGE). Edición No. 5, 2018.

A5 PNO.014- Conservación de muestras en el Banco de hematíes. Edición No. 5, 2019.

O6 PNO.002- Formulación de los Diagnosticadores, Edición No. 3, 2017.

O5 PNO.016-Purificación de IgG. Edición No. 5, 2018.

O1 PNO.018- Producción de sobrenadantes anti-D y anti- D débil (DU). Edición No. 2, 2020.

- ***Especificaciones (ESP):***

ESP-5054- Hemoclasificador anti-D. Edición No. 5, 2019.

ESP-5032- Sobrenadante Anti- D débil (D^U). Edición No. 5, 2019.

ESP-5033- Sobrenadante Anti-D. Edición No. 5, 2019.

ESP-8023- ior[®] Hemo-CIM anti- D. Edición No. 5, 2019.

- **Instructivas de trabajo:**

O1 INS.028 - Uso del equipo de cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC), Edición No. 1, 2020.

- **Pérez S. Informe de Revisión por la dirección del Sistema de Gestión de la Calidad- G3: PNO.001, LABEX, Abril, Santiago de Cuba, pp. 8. 2019. Disponible en:** http://cimsp/labex/DOCUMENTOS_LABEX .

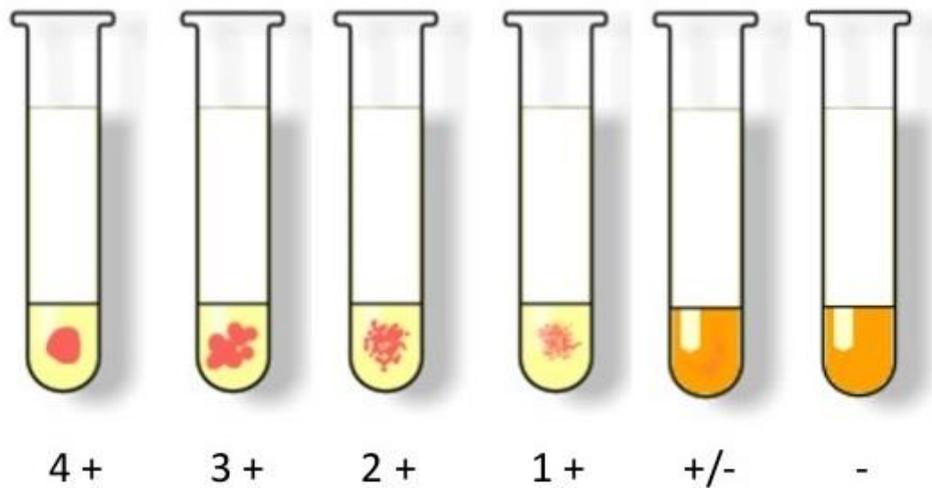
Documentos empresariales:

LABEX, 2019: Balance anual. Informe Económico, Estados Financieros.

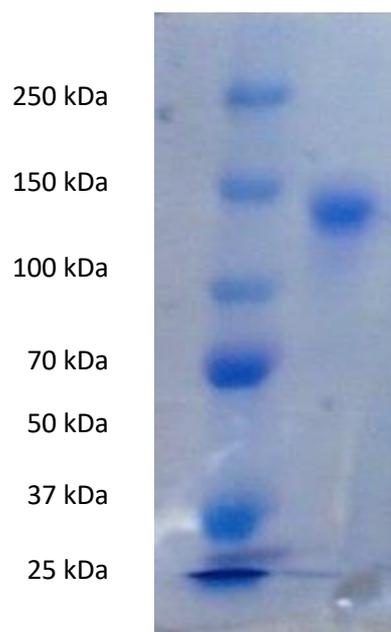
Comunicación personal- brindada por MSc. Suzelt Avila, Jefa del Departamento de Calidad. LABEX.

VIII. ANEXOS

Anexo 1: Representación de la Intensidad de hemaglutinación en tubo, según A5 PNO. 001

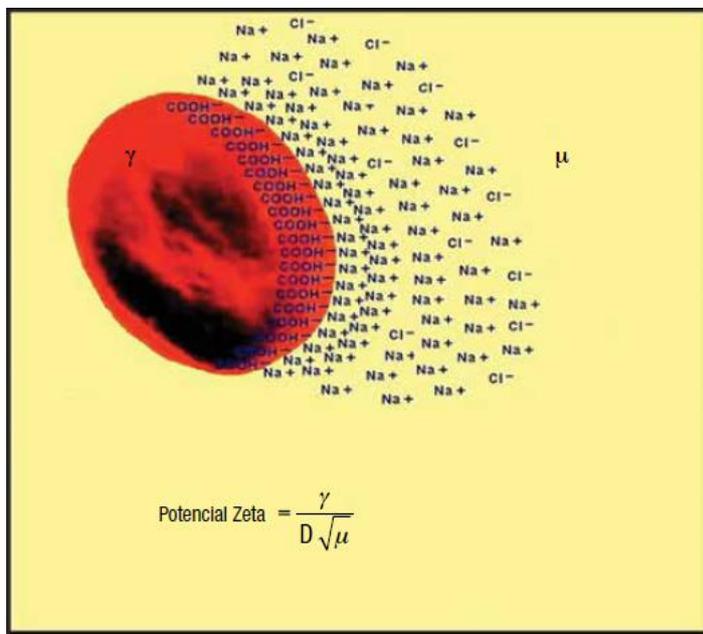


Anexo 2. Electroforesis SDS-PAGE no reducida al 12% de IgG purificada a partir de suero humano. Carril 1: Patrón de pesos moleculares, Carril 2: IgG purificada para su uso como patrón.



Anexo 3. Criterios de calidad de los sobrenadantes para la formulación del lote 18F1907 del anti-D.

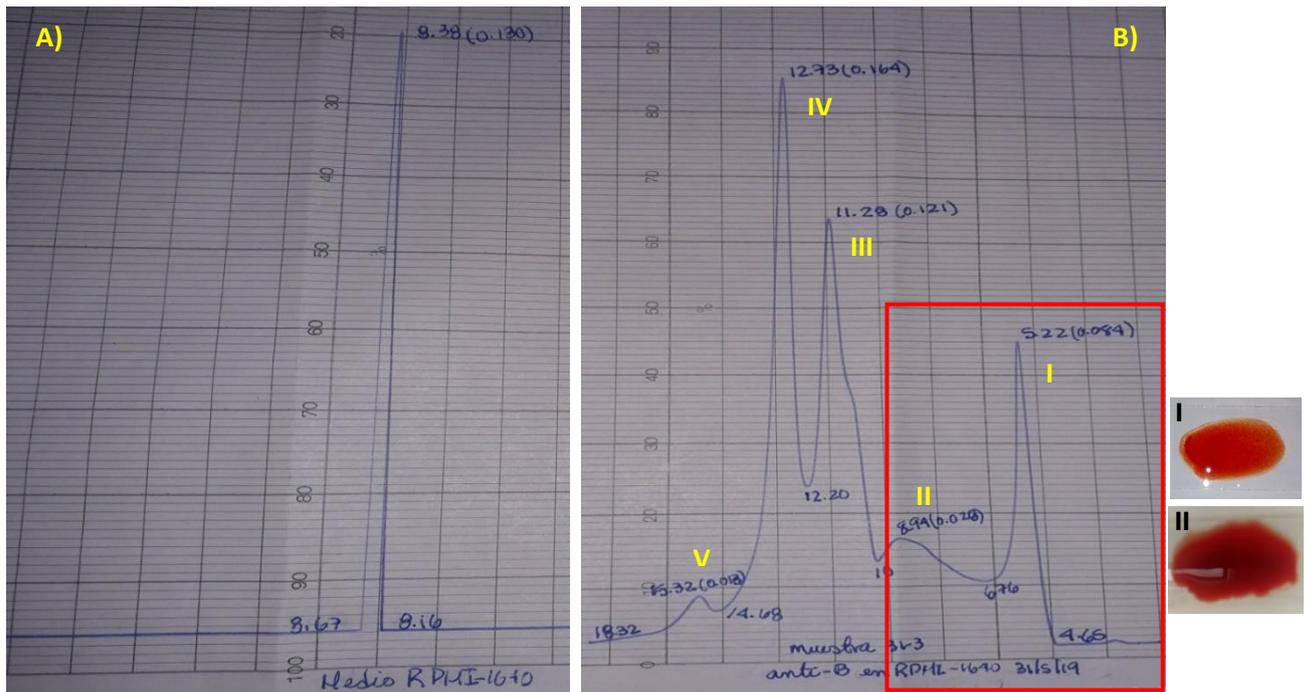
Lote	Potencia	Avidez (s)	Intensidad	Dilución
Sobrenadante de IgM: 18MS1906	4096	8s	4+	1/2
Sobrenadante de IgG: 18GS1907	512	-	3+	1/8
Formulado antiD: 18F1907	512	15s	4+	-



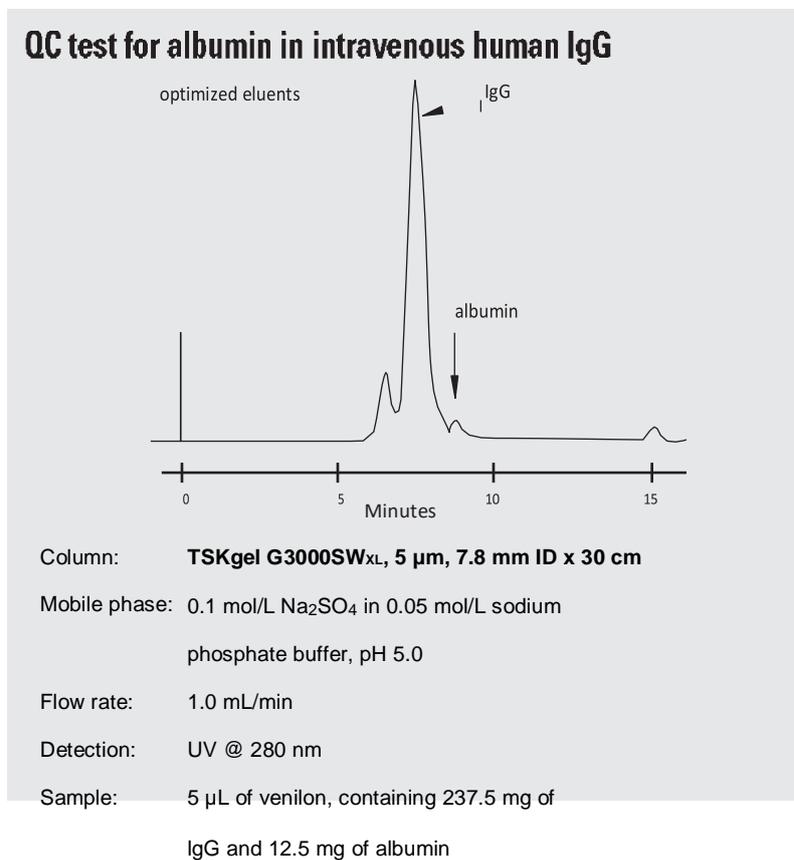
Anexo 4. El potencial Zeta varía directamente con la electronegatividad del glóbulo rojo (γ) e inversamente con la constante dieléctrica (D) y la fuerza iónica (μ) del medio.

Anexo 5. Valores de pesos moleculares de las distintas clases de inmunoglobulina y sus fragmentos (Tomado de Gagnon y col., Purification IgM monoclonal antibodies. 2008).

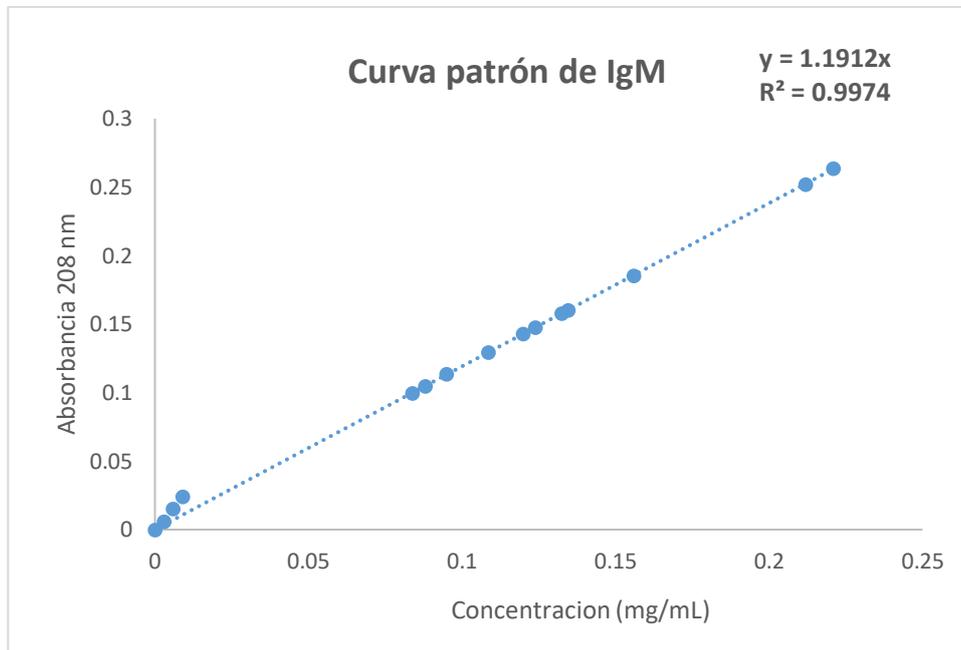
Inmunoglobulinas	Peso Molecular (kDa)
Light chain	23
Fab	50
IgG	150
IgA	335
IgM	950



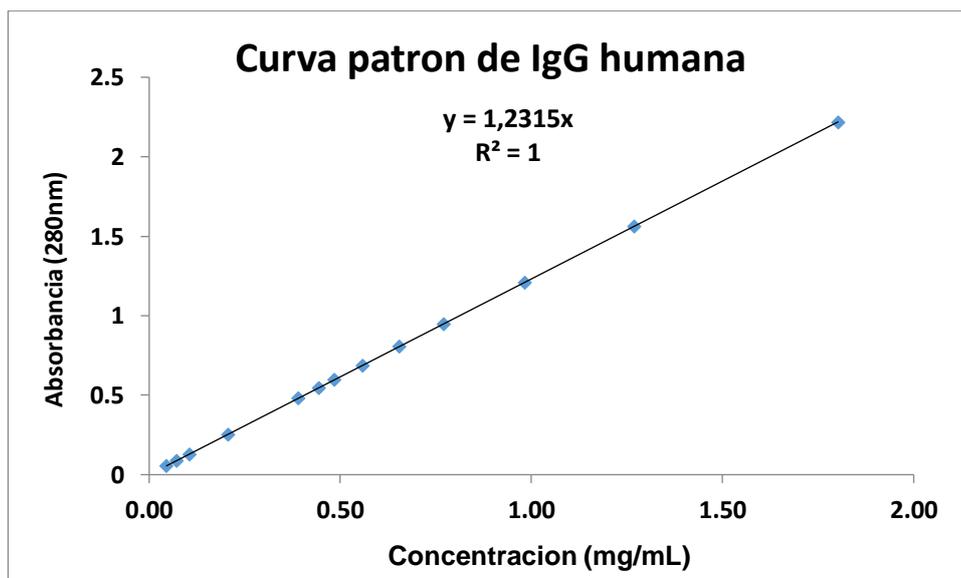
Anexo 6. Cromatograma de la corrida en HPLC de las muestras del medio de cultivo RPMI-1640 + 8% SFB (A) y sobrenadante anti-B obtenido (B): Aglutinación positiva para Pico I (I), Aglutinación negativa para Pico II (II). Tomado de: Zorrilla, 2020.



Anexo 7: Prueba de control de calidad de una solución terapéutica de IgG intravenosa humana estabilizada con albúmina, usando la misma columna cromatográfica utilizada en este estudio.

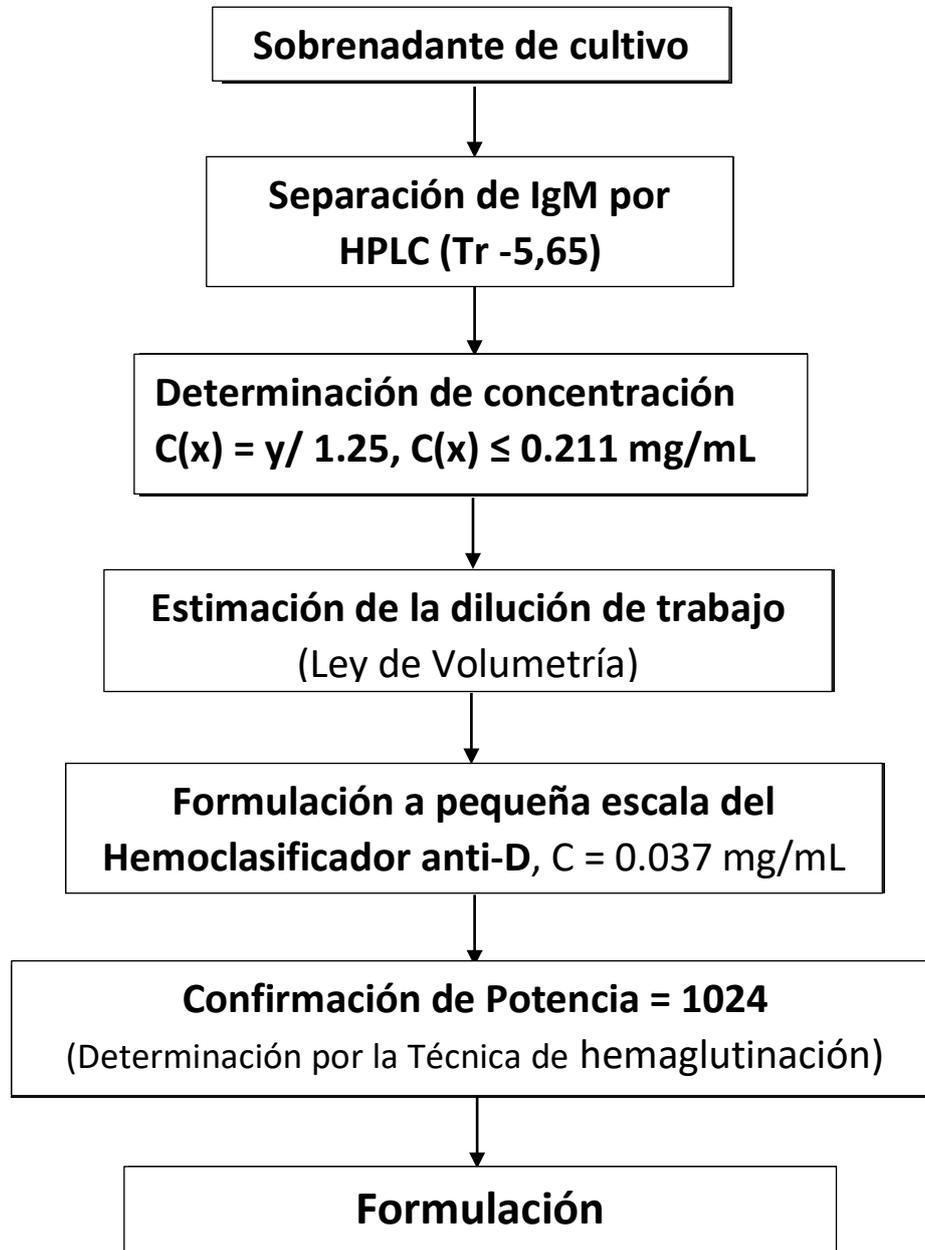


Anexo 8. Curva patrón para la determinación de la concentración de IgM en los sobrenadantes de cultivos anti-D.



Anexo 9. Curva patrón para la determinación de la concentración de IgG en los sobrenadantes de cultivos anti-D débil (D^u).

Anexo 10. Procedimiento propuesto para la determinación de la dilución de trabajo del Hemoclasificador anti-D a partir de concentraciones de IgM en el sobrenadante (Salgado, 2018).



Anexo 11. Adecuación de la metodología para el cálculo de la concentración IgM e IgG en los sobrenadantes.

