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

"Obtención del anti-CD45 conjugado con Isotiocianato de Fluoresceína"

Tesis en Opción al Título Académico de Máster en Biotecnología.

Mención Biotecnología Industrial

Autora: Lic. Grisel Rabell Velázquez

Tutora: Dra.C. Suyén Rodríguez Pérez

Santiago de Cuba

2014

DEDICATORIA

A mi Padre Celestial, el creador e inspirador de toda ciencia humana.

A mi esposo por su apoyo inigualable en esta gran obra.

A mi padre quien forjó en mí el carácter de procurar el cumplimiento de una meta, sin temer a ningún esfuerzo. Siempre estarás en mi corazón.

A mis hijos Lia y Abel, el jardín de mis alegrías, como ejemplo de abnegación y sacrificio.

A mi querida madre y mi hermano Marcos.

AGRADECIMIENTOS

Primero que nada a mi Dios, al Rey de reyes, el autor de mi salvación, a EL agradezco todo lo que soy.

A mi esposo por su gran consideración, amor, respaldo espiritual y material en todo momento.

A mi tutora Suyén por su gran apoyo y experiencia metodológica crucial para la redacción de este documento.

Al claustro de profesores de la Maestría por los conocimientos y la ayuda brindada, especialmente a los de mención Industrial y a la profe Rosa.

A mis compañeros de la maestría especialmente a Ariel, Sucel, Johanet, Maibis, Asel, Yamila y Abelardo.

A mis compañeros de LABEX y del CIM, especialmente: Yanet Rivero, Katya Ramírez, Alejandro Miranda, George Fernández, Edelis Ferrer, Elio Cisneros, Nelsa Soria, Luis Rojas, Mercedes Cedeño, Enrique Rengifo, Rancés Blanco, Yenisey Isquierdo, Dariana Palenzuela, por sus aportes imprescindibles en la ejecución de los trabajos experimentales y por el apoyo técnico.

A mis compañeros del departamento de Calidad, mi antigua casa.

A mi amiga Yany por sus consejos en momentos difíciles.

A todos aquellos que de alguna manera u otra me dieron su apoyo.

RESUMEN

Resumen

El reactivo anti-CD45 conjugado con Isotiocianato de Fluoresceína (FITC) es útil para el diagnóstico y estudio de inmunodeficiencias de células T y B. En la actualidad, Cuba no cuenta con este marcador leucocitario, limitando la disponibilidad de este reactivo para el Sistema de Salud cubano. En la propuesta de obtención de este marcador fueron ensayados tres protocolos modificando la relación descrita entre el fluorocromo a conjugar y el anticuerpo (protocolo 2, 1:4,6; protocolo 3, 1:7), basado en la proporción de Harlow, E. and Lane, D, (protocolo 1, 1:2). El anticuerpo IgG 1 murina (anti-CD45) fue purificado por cromatografía de afinidad a una pureza de 99,3%. Se evaluó la densidad óptica del conjugado a 495 nm y 280 nm y el porciento de reconocimiento leucocitario para citometría de flujo. Los tres protocolos ensayados muestran buena actividad biológica con un porciento de reconocimiento leucocitario en el rango de 90,7%-96,8%, destacando el 2 que permite la obtención del anti-CD45 conjugado con FITC a un menor costo de producción y beneficio en comparación con el precio del producto importado SIGMA. Este estudio permitió establecer el proceso de conjugación para el anti-CD45 con FITC en el Laboratorio de Anticuerpos y Biomodelos Experimentales (LABEX), abriendo paso a la fase desarrollo del producto para así alcanzar su posterior registro sanitario.

ABSTRACT

Abstract

The reactive anti-CD45 is useful for the diagnostic and the study of T or B cells immunodeficiency. Nowadays, this leucocyte marker there is not in our country, limiting the availability of this reagent for Cuban Health's system. With the purpose to obtain this reagent were assayed three protocols, modifying the relation among the fluorocrom and the antibody (F:P) to conjugate (protocol 2, 1:4,6; protocol 3, 1:7), based in the proposal of Harlow and Lane (protocol 1, 1:2). The murine IgG 1 (anti-CD45) antibody was obtained by affinity chromatography with 99,3 % of purity. The optic density of the conjugated was evaluated to 495 nm and 280 nm and was obtained the leucocitary recognition percent through citometry of flow. The three tried protocols evidence good biological activity in the range (90,7%-96,8%), better 2 than others, which is obtained to lowest cost of production and better benefit compared to SIGMA product price. This study permitted establishing the process of conjugation to anti-CD 45 FITC conjugated in antibodies and biomodels experimentals Laboratory (LABEX), opening the phase product development for reaching his posterior sanitary register.

INDICE

Obtención de un reactivo anti-CD45 conjugado con FITC.

Índice

Contenido

1. Introducción 1

Hipótesis 2

2. Revisión Bibliográfica 4

2.1- Sistema Inmunológico y su relación con métodos de diagnóstico 4

2.2- Obtención de anticuerpos monoclonales 6

2.2.1. Producción de AcM *in vivo* 6

2.2.2. Purificación de AcM. 6

2.3- Métodos de inmunoquímicos como base del Inmunodiagnóstico. 10

2.3.1. Inmunofluorescencia 11

2.4- Uso de diagnosticadores en Cuba 16

3. Materiales y Métodos 18

3.1- Obtención del Anticuerpo monoclonal purificado. 18

3.1.1. Purificación del AcM. 18

3.1.1.1 Determinación del recobrado del proceso. 19

3.1.1.2 Determinación de la concentración de IgG por espectrofotometría. 19

3.1.1.3 Ensayos de pureza de la muestra 20

3.1.1.4 Determinación de la Actividad Biológica al Ac M purificado. 23

3.2- Obtención del AcM conjugado con Isotiocianato de fluoresceína (FITC). 24

3.2.1. Preparación del AcM 24

3.2.2. Conjugación del AcM con FITC 24

3.2.3. Purificación del Conjugado 26

3.2.4. Determinación de la relación molar F/P por espectrofotometría 26

3.2.5. Determinación de la actividad biológica al producto conjugado 26

3.3- Análisis estadístico 27

4. Resultados y Discusión 28

4.1- Obtención del AcM purificado 28

4.1.1. Determinación de la pureza del IgG 1 purificado. 31

4.1.2. Análisis de la Actividad Biológica de la muestra purificada IgG 1. 33

4.2- Obtención del Conjugado. 36

4.3- Determinación de la actividad de Biológica de los conjugados. 38

4.4 Consideraciones económicas aplicadas a la obtención del marcador leucocitario..... 40
5. Conclusiones..... 44
6. Recomendaciones..... 44
7. Anexos 45
Anexo 1. 45
Anexo 2. 46
Anexo 3. 47
Anexo 4. 48
Anexo 5. 48
Anexo 6. 49
Anexo 7. 50
Referencias Bibliográficas 52

LEYENDA DE ABREVIATURAS

LABEX: Laboratorio de Anticuerpos y Biomodelos Experimentales.

AcM: anticuerpo monoclonal

Ac: Anticuerpo:

Ag: Antígeno

CD: Grupo de diferenciación (Cluster differenciation)

CLA: Antígeno leucocitario común (Common leucocyte antigen)

FITC: Isotiocianato de Fluoresceína

CMF: Citometría de Flujo

HC: Cadena pesada (heavy chain)

LC: cadena ligera (light chain)

Fab: fragmento de unión al antigeno (fragment antigen union)

Fc: fragmento cristalizante

BSA: Albúmina sérica bovina

FPLC: Cromatografía líquida rápida para proteínas (Fast Protein Liquid Chromatography),

HPLC: Cromatografía líquida de proteínas de alto rendimiento (Hight Performance Liquid chromatography)

I.F.I: Inmunofluorescencia Indirecta

I.F.D: Inmunofluorescencia Directa

SNC: Sistema de Salud Nacional

SSC: dispersión lateral de la luz (side scatter)

FSC: dispersión frontal de la luz (forward scater)

Ig: Inmunoglobulina.

SDS-PAGE: Electroforesis en gel de poliacrilamida con duodecilsulfato sódico (sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis)

TEMED: Tetrametiletilendiamina (Tetramethylethylenediamine)

LAM: Líquido Ascítico Murino

MRT: Material de referencia de trabajo.

CV: Coeficiente de Variación

Abs: absorbancia

PBS: Buffer Fosfato Salino 0,01M pH 7,2

DMSO: Dimetilsulfóxido

FITC: Isotiocianato de Fluoresceína

F/P: relación FITC/Proteína

UM: Unidad monetaria

CIM: Centro de Inmunología Molecular

INTRODUCCION

1. Introducción

La tecnología de Anticuerpos Monoclonales se ha desarrollado ampliamente después de su descubrimiento por Georges Köhler y Cesar Milstein en 1975 y constituye una poderosa herramienta que ha revolucionado el uso de las inmunoglobulinas en los campos de la investigación básica, el diagnóstico, la inmunoterapia y los procesos industriales suscitando toda una revolución de la biotecnología y su aplicación a la salud humana, sobre todo en el diagnóstico clínico y en la terapéutica.

El desarrollo de las técnicas que permiten la obtención de anticuerpos monoclonales específicos ha sido de capital importancia para la Inmunología, en general, y para el estudio de los antígenos de diferenciación, en particular. Tanto es así, que generalmente la caracterización bioquímica de los receptores celulares comienza por la obtención de anticuerpos monoclonales que reconozcan esas proteínas; con el fin de identificar e incluso rescatar las proteínas de la membrana citoplasmática lo cual facilita su estudio estructural.

La molécula CD45 es una glicoproteína de superficie celular, con un peso molecular de 180-240 kDa, conocida también como antígeno común leucocitario (common leucocyte antigen) (CLA).[1,2] Se expresa en las células leucocitarias tanto de la serie mieloide como de la serie linfoide, así como en las neoplasias hematológicas tales como los linfomas Hogdkin, linfomas no Hodgkin, mieloma múltiple o incluso en las neoplasias de células histiocíticas como el sarcoma histiocítico y en leucemias agudas se ha descrito una correlación entre su intensidad de expresión y el pronóstico en leucemias agudas. [3, 4]

El estudio de la expresión de este antígeno de superficie por Citometría de Flujo es de particular importancia, ya que permite distinguir el linaje celular y también inferir el estadío de maduración de la mayoría de las células hematopoyéticas. El anticuerpo monoclonal CD45 reconoce a los miembros de la familia CD45 de antígenos *pan*leucocitarios con este fin. [5]

Los conjugados como reactivos biológicos constituyen en la actualidad una de las herramientas indispensables para confirmación del diagnóstico y evolución de las enfermedades. [6, 7]

La producción de un reactivo diagnosticador anti-CD45 conjugado con FITC de origen nacional, consta de gran interés para nuestro país y en especial para el Centro de Inmunología Molecular. El adquirir este reactivo en nuestra red de producción de diagnosticadores nos brinda la posibilidad de abastecer al sistema nacional permitiendo sustituir importaciones y de la realización de contratos con otros países. Por la importancia médica y repercusión económico-social que trae consigo la obtención de este reactivo, nos hemos formulado el siguiente **problema de investigación**:

Cuba no cuenta con un reactivo de producción nacional para identificar y enumerar leucocitos CD45+ en sangre periférica humana, para diagnóstico por Citometría de Flujo (CMF).

En aras resolver el problema científico se formuló la siguiente hipótesis.

Hipótesis

Si se tuviera un reactivo anti-CD45 conjugado con Isotiocianato de Fluoresceína (FITC), obtenido mediante un protocolo que garantice los estándares de calidad establecidos, se dispondrá de un marcador inmunológico para identificar y enumerar leucocitos, por Citometría de Flujo.

Para dar cumplimiento de la hipótesis se proponen los siguientes objetivos.

General

- Obtener el Anticuerpo Monoclonal anti-CD45 conjugado con FITC con estándares de calidad, mediante un protocolo que minimice costos.

Específicos

1. Evaluar un proceso de purificación del AcM anti-CD45 a partir del Líquido Ascítico Murino.
2. Comparar diferentes protocolos de conjugación del anti-CD45 con Isotiocianato de Fluoresceína, para obtener un reactivo de uso en Citometría de Flujo.
3. Seleccionar el protocolo de conjugación para obtener el marcador inmunológico empleando criterios de costo.

REVISION BIBLIOGRAFICA

Revisión Bibliográfica

2. Revisión Bibliográfica

2.1- Sistema Inmunológico y su relación con métodos de diagnóstico.

En la clasificación de las células del sistema inmune tipificadas mediante el uso de los diagnosticadores se encuentran los **leucocitos** o glóbulos blancos, con la función de proteger el organismo de manera inmunitaria, contra agentes patógenos causantes de enfermedades. Estos se dividen a su vez en tres poblaciones celulares (Figura 1):

- Los **granulocitos** que se forman en la médula ósea, representan el 70% de los leucocitos, su función es la de fagocitosis de microbios participando en la inmunidad contra las bacterias, parásitos y alergias, presentan gránulos en su citoplasma y núcleo lobulado. Se dividen en tres tipos de células: los neutrófilos con dos a cinco lóbulos nucleares; Los eosinófilos con núcleo bilobulado y los basófilos con núcleo irregular en forma de “S”.
- Los **monocitos** son células grandes que representan el 5% de los leucocitos, poseen un núcleo en forma de herradura; se mueven activamente tornándose macrófagos y su función es la fagocitosis de microorganismos patogénicos.
- Los **linfocitos** que representan el 25% de los leucocitos poseen un núcleo regular que ocupa casi todo el volumen de la célula; su función es garantizar la inmunidad de los organismos. Estos se clasifican en linfocitos “T” y “B. Los linfocitos T se forman en la médula ósea y migran posteriormente al timo y son los responsables de la inmunidad celular. El papel de los linfocitos B es la producción de los anticuerpos y son por lo tanto responsables de la inmunidad humoral. [8]

Un **anticuerpo** se define como una inmunoglobulina (Ig) capaz de una combinación específica con el antígeno que ha causado su producción en un animal susceptible. Son producidos en respuesta a la invasión de moléculas foráneas en el cuerpo, nombrada antígenos. [8]

Revisión Bibliográfica

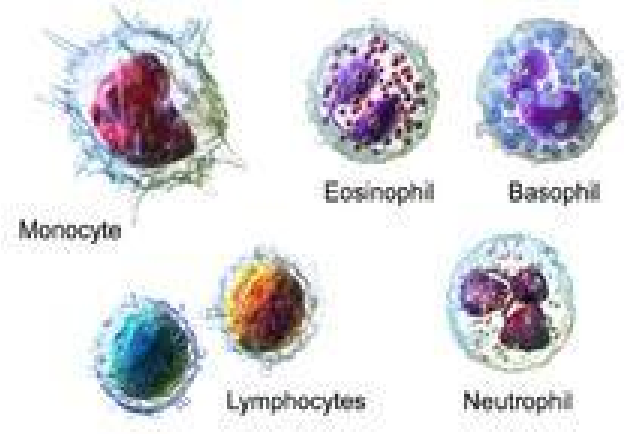


Figura 1. Tipos de glóbulos blancos. tomada de http://salud.kioskea.net/faq/1629-globulos-blancos-polinucleares-y-linfocitos#tipos-de-globulos-blancos.

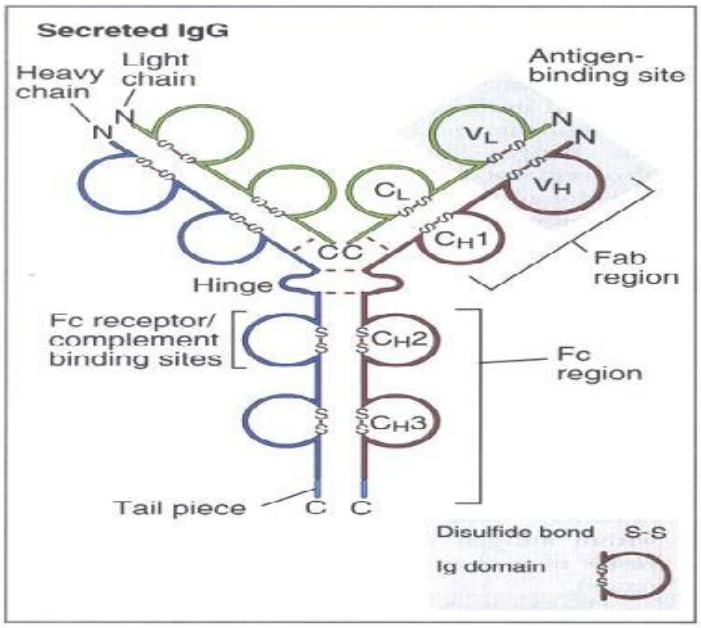


Figura 2. Diagrama esquemático de la estructura del anticuerpo (IgG secretada). Tomada de Inmunología Básica. Abbas y Lichtman.

Revisión Bibliográfica

La definición clásica de **antígeno** es cualquier sustancia foránea que incita una respuesta inmune es introducid cuando a dentro de tejidos de animales susceptibles y que son capaces de combinar con los anticuerpos específicos formados. Los antígenos son generalmente de alto peso molecular y comúnmente son de naturaleza proteica o polisacarídica. Otras moléculas de menor peso molecular también pueden también funcionar como antígenos; por ejemplo, polipéptidos, lípidos y ácidos nucleicos. [9]

Los anticuerpos existen como una o más unidades en forma de Y, compuesta por cuatro cadenas polipeptídicas. Cada unidad (Y) contiene dos copias idénticas de una cadena pesada (HC, heavy chain) y dos copias idénticas de una cadena ligera (LC, light chain); llamadas así, por sus pesos moleculares relativos que son de aproximadamente 50 kDa y de 25 kDa, respectivamente. Estas cadenas se mantienen unidas mediante enlaces disulfuros S-S intercatenarios y pueden separarse por reducción y acidificación (Figura 2).

Las partes de las regiones hipervariables del anticuerpo que contactan con el antígeno se denominan parátopos y la región de un antígeno que puede específicamente unirse a un anticuerpo es llamado epítope. [10]

Los anticuerpos pueden ser divididos en cinco clases: IgG, IgM, IgA, IgD e IgE, basado en el número de unidades Y y en el tipo de cadena pesada. [8] (Anexo 1)

El anticuerpo más abundante en la circulación es la IgG, por lo que es comúnmente usado en ensayos inmunoquímicos es el de la clase IgG.

Los anticuerpos son producidos naturalmente por los linfocitos B en los mamíferos. Cada estirpe de linfocito B presente en el cuerpo secreta un anticuerpo diferente, por lo que el suero sanguíneo constituye una fuente de anticuerpos heterogéneos (policlonales); siendo los anticuerpos de estructura homogénea (monoclonales) los que se caracterizan por una especificidad constante, útiles en el diagnóstico. [8]

El uso masivo de los anticuerpos monoclonales (AcM) en la investigación, el diagnóstico y la terapéutica de enfermedades del hombre ha creado la necesidad de

Revisión Bibliográfica

estrategias y métodos adecuados para su producción y purificación en cantidades y calidad suficientes para cada aplicación específica. [11, 12].

2.2- Obtención de anticuerpos monoclonales

2.2.1. Producción de AcM *in vivo*

El primer método para producir anticuerpos homogéneos o monoclonales (anticuerpo clonados a partir de una sola célula madre) con una especificidad conocida, fue descrito por Georges Köhler y Cesar Milstein en 1975. El mismo se basa en la fusión de forma *in vitro* de una célula B (linfocito B) productora de anticuerpos, procedentes de un biomodelo previamente inmunizado (generalmente ratón), con una célula de mieloma con la capacidad de dividirse indefinidamente en cultivo celular. Como resultado de esta unión se obtienen los llamados hibridomas, con la capacidad de multiplicarse rápida e indefinidamente y a la vez capaz de secretar el anticuerpo codificado por el linfocito B parental, permitiendo la producción intensiva *in vivo* e *in vitro* de anticuerpos monoclonales. [13, 14]

La Ingeniería Genética ha irrumpido exitosamente en el campo de la producción de los monoclonales y ya se han obtenido anticuerpos quiméricos, humanizados (ratón-humano) y fragmentos de anticuerpos expresados en fagos que permiten el clonaje y manipulación de repertorios de linfocitos B murinos y humanos. Con esta potencialidad, pueden obtenerse anticuerpos que no existen en la naturaleza como los catalíticos y es posible provocar maduración in *vitro* de la afinidad de los anticuerpos recombinantes. [15, 16, 17]

La tecnología de producción *in vivo* consiste en inocular las células de un hibridoma en la cavidad peritoneal de un biomodelo, originando tumores que sintetizan un líquido rico en anticuerpos llamado Líquido Ascítico Murino (LAM) [18](Anexo 2).

2.2.2. Purificación de AcM.

Una parte importante de las investigaciones bioquímicas incluye la purificación de las biomoléculas en cuestión, debido a que estas sustancias deben hallarse relativamente libres de contaminantes. Consiste en una serie de procesos que

Revisión Bibliográfica

permiten aislar un sólo tipo de proteína de una mezcla compleja, siendo vital para la caracterización de la función, estructura e interacciones de la proteína de interés. [19]

Las proteínas se purifican mediante métodos de fraccionamiento como [20] :

- Precipitación por salado, con solventes
- Diálisis
- Concentración previa (Amicón)
- Cromatografía
- Electroforesis

La cromatografía es un método por el cual las sustancias se separan mediante un proceso de migración diferencial, en un sistema que consta de dos fases: una fase móvil que fluye continuamente en una dirección dada y otra, la fase estacionaria que permanece fija. En estos sistemas los componentes de una mezcla pueden presentar diferentes movilidades debido a diferencias en la capacidad de adsorción, partición, solubilidad, tamaño molecular o carga. Entre los mecanismos de separación cromatográfica podemos citar: adsorción, filtración en gel o tamices moleculares, intercambio iónico y otros. [21]

La cromatografía es la técnica más empleada para la purificación de los anticuerpos monoclonales ya sean obtenidos por tecnología *in vivo* o *in vitro*, el empleo de la cromatografía para la purificación es muy usado por las industrias y centros de investigación biotecnológicos haciendo que su valor en el mercado internacional sea más elevado con el transcurso de los años.

2.2.2.1. Cromatografía de Exclusión Molecular.

La cromatografía de exclusión molecular, filtración en gel o tamizaje molecular es un método de cromatografía en columna por el cual las moléculas se separan en solución según su peso molecular, como su nombre lo indica es una técnica que utiliza como medio de separación un lecho de partículas pequeñas en estado de gel, que por lo general se encuentran empaquetadas en un tubo en forma de columna. [22]

En esta cromatografía, la fase estacionaria consiste en largos polímeros entrecruzados que forman una red tridimensional porosa y el tamaño de los poros es

Revisión Bibliográfica

tal que algunas moléculas (las demasiado grandes) no podrán ingresar a esos poros, en tanto que otras (las suficientemente pequeñas) podrán pasar libremente. La conexión que establecen los poros determina una serie de caminos a ser recorridos por las moléculas que acceden al interior de esta. [23]

Los poros de la matriz deben ser de tamaño comparable al tamaño de las moléculas que se desea separar. Las moléculas de mayor tamaño que los poros, harán el camino más corto al nunca entrar en la malla de la fase estacionaria quedando excluidas. Las moléculas pequeñas pueden difundir dentro de la matriz. Cuanto menor es su tamaño, mayor es la probabilidad de que entren a un poro. [19]

En una columna de filtración molecular las moléculas excluidas se mueven continuamente junto con el eluyente (moléculas excluidas); en tanto que aquellas que por su tamaño pueden ingresar a la fase estacionaria son retardadas en función de su tamaño (moléculas no excluidas). (Figura 3)

Entre los polímeros más utilizados son en la cromatografía de exclusión se destacan:

- Sephadex: Este gel es un polímero ramificado de glucosa, entrecruzado y formado en pequeñas perlas, el cual se conoce como gel de dextrano, se comercializa con el nombre de SEPHADEX.
- Sepharose: Es un polisacárido conocido como agarosa, está formada por galactosas alfa y beta que se extrae de las algas de los géneros **Gellidium** y **Gracillaria**.

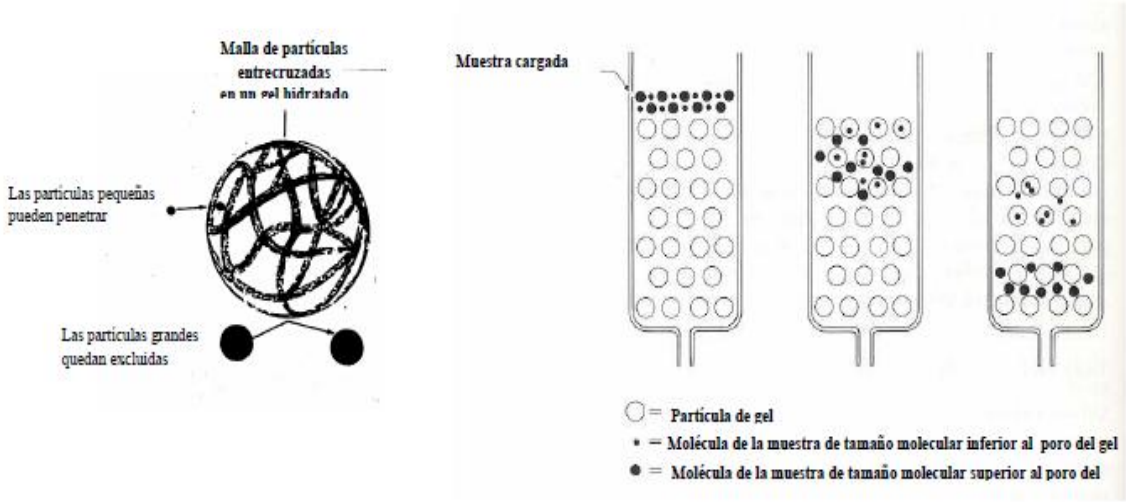
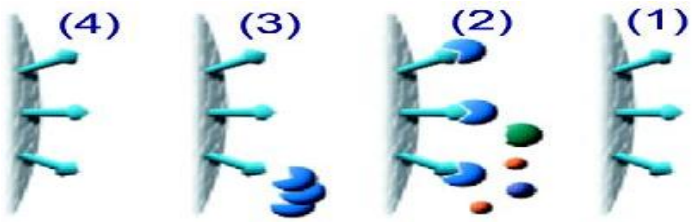


Figura 3. Proceso de filtración en gel o tamizaje molecular. Tomado de Gel Filtration Principles and Methods. 2004. Handbooks from Amersham Biosciences. Edition 18-1022-18.



1*. Se equilibra la columna de afinidad.*
2*. Aplicación de la muestra.*
3*. La proteína objetivo se recupera por las condiciones cambiantes para favorecer la elución de las moléculas de interés, lo cual se puede llevar a cabo por competencia,, cambio de pH, fuerza iónica o polaridad de la proteína.*
4*. Se re-equilibra el medio de afinidad es con el tampón de unión.*

Figura 4. Cuatro etapas de la cromatografía de afinidad. Tomado de Affinity Chromatography, Amershan Pharmacia Biotech, (2004) Edition AC ,18-1022-29.

2.2.2.2. Cromatografía de afinidad

Se trata de un tipo especial de cromatografía de adsorción sólido-líquido en la que la sustancia de naturaleza bioquímica (anticuerpos, cofactores, inhibidores enzimáticos, lectinas y otras moléculas) denominadas ligandos de afinidad y enlazados químicamente en soportes sólidos adecuados, retienen a los solutos (analitos), también de naturaleza bioquímica, de manera reversible y selectiva. Las separaciones se basan en el acoplamiento ¨llave-cerradura¨ principio de la biología molecular. [24]

La cromatografía de afinidad permite la separación de mezclas proteicas por su afinidad o capacidad de unión a un determinado ligando. En este caso, las proteínas que se retienen en la columna son aquellas que se unen específicamente a un ligando que previamente se ha unido covalentemente a la matriz de la columna. Sistema donde luego de que las proteínas que no se unen al ligando son lavadas o eluídas a través de la columna, la proteína de interés que ha quedado retenida en la columna se eluye o libera mediante la ruptura de los enlaces antígeno-anticuerpo por variaciones de pH o por fuerza iónica. [25] (Figura 4)

El uso de AcM en los procesos de inmunopurificación de biomoléculas, ha permitido establecer procedimientos reproducibles, eficientes y escalables.

Por lo general, los AcM se purifican mediante cromatografía de afinidad por proteína A, debido a la alta capacidad que ésta posee para unirse específicamente a la región Fc de las inmunoglobulinas. La obtención de un producto de pureza y recobrado elevados, ha hecho que este procedimiento se utilice ampliamente. [25]

Cada año aumentan significativamente los reportes de nuevos AcM obtenidos en todo el mundo contra una inmensa variedad de antígenos, lo cual avala la extraordinaria importancia de esta tecnología y su infinita aplicación en el desarrollo actual de las ciencias biomédicas y biotecnológicas. [26]

2.2.2.3. Cromatografía de Intercambio iónico

La separación por cromatografía de intercambio iónico depende de la adsorción reversible de las moléculas de soluto cargadas a grupos inmovilizados de intercambio iónico de carga opuesta.

La separación se obtiene debido a los diferentes grados de interacción con el intercambiador de iones por las diferencias de cargas en sus superficies (Anexo 3). Estas interacciones pueden ser controladas mediante la variación de condiciones tales como la fuerza iónica y el pH. [27]

Las diferencias en las propiedades de carga de los compuestos biológicos son considerables para lograr separar especies con diferencias muy pequeñas en las propiedades, como por ejemplo: dos proteínas diferentes por un solo aminoácido cargado. Por lo que la cromatografía por intercambio iónico es una técnica de separación muy potente. [27]

2.3- Métodos de inmunoquímicos como base del Inmunodiagnóstico.

Gran parte de los progresos alcanzados por la biología moderna se deben al perfeccionamiento de los métodos analíticos de medida. La introducción de los procedimientos basados en las reacciones inmunológicas ha representado un importante avance en el análisis de sustancias de interés en biología animal y vegetal difíciles de medir empleando los métodos bioquímicos habituales. [7]

Dentro de los procedimientos inmunológicos, los más útiles y prácticos son aquellos que se basan en la especificidad de la unión Ag-Ac, asociación dependiente de los puentes de hidrógeno, las interacciones hidrofóbicas, fuerzas electrostáticas y las fuerzas de Van Der Waals. [28]

La propiedad que tiene la Ig de unirse a un Ag, la especificidad de esta unión y el hecho de que pueda ser visualizable por los fenómenos de precipitación, aglutinación y otros mecanismos indirectos (marcaje con fluoresceína, con radioisótopos o con enzimas) hacen que estos métodos se empleen ampliamente. [29]

Dado que los antígenos y anticuerpos se caracterizan por sus interacciones mutuas, uno de ellos puede utilizarse para cuantificar al otro. Existen diversos métodos analíticos basados en procedimientos distintos para visualizar la unión Ag-Ac, como por ejemplo: técnicas de inmunoprecipitación, técnicas de imunoaglutinación, técnicas inmunofluorimétricas, técnicas inmunorradiológicas y técnicas inmunoenzimáticas. (Anexo 4)

2.3.1. Inmunofluorescencia

La inmunofluorescencia es una técnica de inmunomarcación que hace uso de anticuerpos unidos químicamente a una sustancia fluorescente, para demostrar la presencia de una determinada molécula. Como todos los inmunoensayos, aprovecha la capacidad que tienen los anticuerpos para unirse con alta especificidad a una determinada molécula blanco; pero se diferencia de otras técnicas inmunoquímicas, en que la señalización del anticuerpo es una molécula fluorescente como por ejemplo, el Isotiocianato de Fluoresceína. [30]

La inmunofluorescencia como técnica inmunoquímica de cuantificación se puede utilizar tanto en muestras de origen biológico como en muestras no biológicas, siempre que se encuentren en un medio favorable para la unión de los anticuerpos. El anticuerpo marcado se hace reaccionar contra un preparado biológico y luego se expone la muestra así tratada a una fuente de luz de onda corta (ultravioleta o azul) seleccionada por medio de un monocromador. Esta luz de onda corta genera un fenómeno de fluorescencia en la molécula marcadora que a su vez emite luz a una longitud de onda mas larga (verde, amarillo o naranja). Esta luz emitida puede ser cuantificada con facilidad por fotometría o por microscopía de fluorescencia en preparados histológicos, donde el fluorescente revela la localización a nivel celular o subcelular de la molécula diana. [30]

2.3.1.1 Tipos de Inmunofluorescencia

Existen dos tipos de técnicas de inmunofluorescencia; primaria (o directa) y secundaria (o indirecta). (Figura 5)

Primaria o Directa

La inmunofluorescencia primaria, o directa, también conocida por sus siglas IFD (Inmunofluorescencia Directa), hace uso de un único anticuerpo que se encuentra químicamente unido a un fluoróforo o fluorocromo. El anticuerpo reconoce la molécula diana y se une a ella directamente.

Esta técnica presenta algunas ventajas con respecto a la IFI (indirecta). Reduce el número de etapas necesarias, por lo tanto es más rápida, y por otro lado es menos sensible a interferencias debidas a reactividad cruzada de los anticuerpos o a reacciones no específicas.

Secundaria o IFI

La Inmunofluorescencia secundaria, o indirecta (también conocida por sus siglas IFI) hace uso de dos anticuerpos; el anticuerpo primario es el que reconoce y se une a al molécula diana, mientras que el secundario que es el que se encuentra marcado con el fluorocromo reconoce al primario y se une a él. Esta técnica es un poco mas compleja que la IFD, requiere mas pasos y es mas posible que sufra interferencias, pero en contrapartida es mucho mas flexible que una técnica directa y debido a que es posible que un anticuerpo primario una a más de un anticuerpo secundario, implica un efecto de amplificación que también aumenta la sensibilidad de la técnica. [30]

Esta técnica es posible, debido a la existencia de varios anticuerpos que reconocen diferentes antígenos (tienen diferentes regiones variables) pero comparten la misma región constante. Todos estos anticuerpos con diferentes especificidades pueden ser reconocidos a su vez por un único anticuerpo secundario que reconozca la región constante. Esto minimiza el esfuerzo técnico y el costo de modificar cada uno de los anticuerpos primarios para acarrear el fluorocromo. [31]

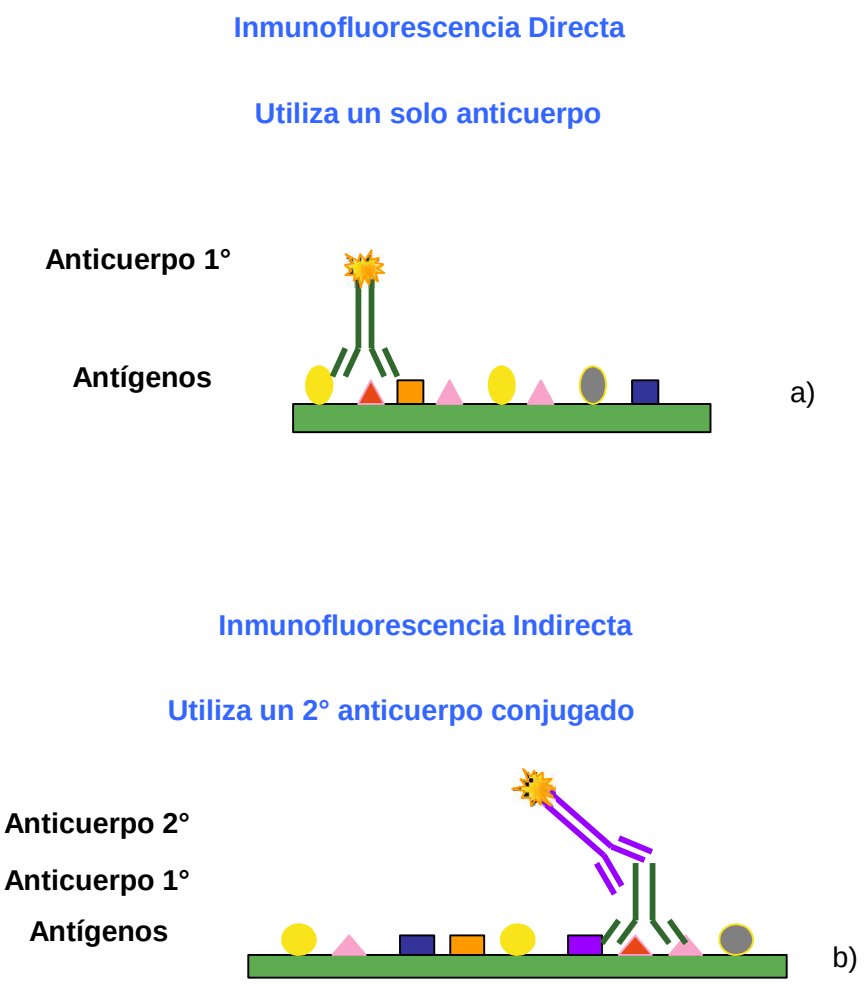


Figura 5. Esquema de la inmunofluorescencia: a) directa; b) indirecta.

Los fluorocromos son moléculas químicas que absorben luz a una determinada longitud de onda y emiten a otra diferente, estos se caracterizan por sus espectros de excitación y de emisión. Estos espectros varían en los diferentes fluorocromos. [32]
Las propiedades reconocidas de un buen fluorocromo reportada en literatura [33]son:

1) Alto coeficiente de extinción a la longitud de onda de excitación.
2) Alto rendimiento cuántico
3) Elevada fotoestabilidad
4) Corto estado de excitación
5) Su espectro de absorción debe ser lo más cercano posible al espectro de emisión del láser utilizado.
6) El espectro de emisión debe ser diferente al de absorción para asegurar que ambas señales se separan.
7) Se deben utilizar colorantes que formen uniones con las proteínas (sin afectar los grupos de combinación específica del anticuerpo).
8) Que sean fotoestables.

Se describen dos clases de fluorocromos, según la interacción que establece con el anticuerpo:

- Fluorocromos de unión covalente
- Fluorocromos de unión no covalente

Los Fluorocromos de unión covalente son moléculas orgánicas pequeñas (FITC, biotina) los que forman una unión covalente con grupos amino libres en los anticuerpos. Como ejemplo tenemos el Isotiocianato de Fluoresceína (FITC), phicoeritrina, rodamina, rojo texas, cianinas. El más utilizado para marcar proteínas es el FITC. [38]

Esta es una molécula pequeña con afinidad por las proteínas, incluidas las inmunoglobulinas, se excita con luz azul a 488 nm, y emite luz a 520 nm.

El grupo isotiocianato reacciona con los grupos amino de los residuos de lisina en la proteína. [34]

Los fluorocromos de unión no covalente se unen no covalentemente a estructuras dentro de la célula son por ejemplo: Hoechst, DAPI, Naranja de acrimina, yoduro de propidio y otros. [38]

2.3.1.2 Conjugados con Fluorocromos

Los conjugados como reactivos biológicos constituyen en la actualidad una de las herramientas indispensables para confirmación del diagnóstico y evolución de las enfermedades inmunológicas. [6, 34, 43, 35]

La conjugación del fluorocromo al anticuerpo IgG depende de varios factores como son: cantidad de fluorocromo añadido, pH del medio, tiempo de contacto, temperatura, naturaleza de las proteínas y especie de la que procedan las globulinas y el fluorocromo empleado debe reunir una serie de cualidades citadas en el acápite anterior.

El FITC es una molécula pequeña que se conjuga normalmente por vía aminas primarias, a cada anticuerpo se conjugan de 3 a 6 moléculas de FITC, algunos autores reportan que la razón molar puede ser de 3-10, mayor cantidad de uniones de fluorocromo al anticuerpo puede provocar problemas de solubilidad. [36, 37]

En la tecnología de CMF los anticuerpos monoclonales están unidos en forma de conjugados (anticuerpos + fluorocromos), y es la intensidad de fluorescencia directamente proporcional al número de moléculas del conjugado unidas al antígeno, confiriendo el anticuerpo especificidad al marcaje.

2.3.1.3 Citometría de Flujo

Con la aparición de los anticuerpos monoclonales (AcMs) a finales de los setenta y su ulterior desarrollo en las décadas siguientes, se produce un mayor conocimiento de las características moleculares y antigénicas de las células.

Una herramienta poderosa para definir y enumerar leucocitos, es la Citometría de Flujo. La CMF es una técnica sencilla que se aplica en la rutina diaria de algunos

laboratorios clínicos y de investigación en el fenotipaje de estirpes celulares diferentes. [38]

El nombre original de la citometría de flujo era "citofotometría de pulso" (en Alemán: Impulszytophotometrie), que fue el nombre publicado en la primera patente de aplicación práctica de la citometría de flujo fluorescente. En la 5ta Conferencia sobre Citometría Automatizada de la American Engineering Foundation realizada en Pensacola, Florida en 1976 -ocho años después de la presentación del primer citómetro de flujo fluorescente (1968) se acordó utilizar el nombre de citometría de flujo, un término que rápidamente ganó popularidad.[39]

Es una tecnología que permite la medición simultánea de múltiples características de células en suspensión por medio del instrumento llamado Citómetro. En el sistema se utilizan Acs marcados con Fluorocromos como el Isotiocianato de Fluoresceína (FITC) para la detección de antígenos sobre las superficies celulares; de forma tal, que cuando el Ac reacciona con el antígeno se forma un complejo inmune y el fluorocromo acoplado al Ac al recibir la luz incidente emite una señal fluorescente que revela la reacción detectada por el Citómetro.

Los primeros citómetros de flujo para el recuento de partículas fueron diseñados por Moldavan en 1934 y por Kielland en 1941; a finales de los 40 y principio de los 50, fueron diseñados citómetros contadores de partículas que medían su tamaño y volumen por Gucker, Crossland, Taylor y Wallace Coulter, en el año 1965 Kamentsky y col. diseñaron un equipo capaz de medir varios parámetros de una célula, la dispersión de luz de las célula presentando un citómetro de flujo que realiza hasta cuatro medidas simultáneas por célula y analizan los datos multiparamétricos mediante un ordenador.

En 1965, Meyer-Doering y Knauer diseñaron un contador de partículas en base a la dispersión de luz, en 1968, Dittrich y Góhde un instrumento que medía la fluorescencia de partículas que se movían en una corriente de flujo. A comienzo de los años 80 del pasado siglo, aparece una nueva generación de citómetros de flujo como el FACS-SCAN de Becton-Dickinson y el EPICS Profile de Coulter, que se incorporaron a los laboratorios clínicos. [38]

Entre las ventajas de la citometría de flujo respecto a otros métodos para el diagnóstico de células tumorales se distinguen los siguientes: permite disponer de los resultados en breve tiempo, posee sensibilidad (10^{-4} o 10^{-5}) y especificidad diagnóstica en la discriminación de diferentes poblaciones celulares, así como información simultánea sobre varios parámetros celulares. [40]

Esta técnica permite el análisis de dos parámetros de dispersión: dispersión lateral (SSC), dispersión frontal (FSC) y fluorescencia (con un solo láser). Estos parámetros de dispersión se refieren en el caso de SSC (Side Scatter) a la granulosidad de la partícula y en FSC (Forward Scatter) al tamaño de la partícula en análisis. [40]

2.4- Uso de diagnosticadores en Cuba

El desarrollo de la biotecnología de anticuerpos monoclonales conjugados con diferentes fluorocromos ha propiciado grandes avances en el diagnóstico de enfermedades; así emerge la Citometría de Flujo como una herramienta poderosa e importante en la diferenciación de subpoblaciones celulares. De igual forma, se ha demostrado que proporciona datos con valor pronóstico en cáncer gástrico y el síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA). En esta última enfermedad se ha comprobado que el monitoreo de las subpoblaciones linfoides, específicamente el conteo absoluto de linfocitos CD4 tiene tanto valor pronóstico como terapéutico; así como conteo de leucocitos CD45 en la leucemia. [41, 42, 43]

La producción de diagnosticadores en Cuba es de considerable importancia por la repercusión social que tiene, al permitir un seguimiento clínico de enfermedades de origen inmunológico, labor que engloba gran importancia desde el punto de vista cultural, social, económico y político.

En la actualidad la ciencia cubana ha destinado sus mejores esfuerzos en el desarrollo de los métodos diagnósticos y de seguimiento de este tipo de enfermedades. Por lo que disponer de AcMs conjugados, producidos en nuestro país, con la calidad requerida para este tipo de estudio, hace más económico el diagnóstico y lo garantiza para todos los pacientes inmuno-comprometidos.[6, 7, 17, 35]

En Cuba, el Laboratorio de Anticuerpos y Biomodelos Experimentales (LABEX) es la unidad de producción de los diagnosticadores como: anti-CD3 conjugado con FITC, anti-CD4 conjugado con FITC, anti-CD8 conjugado con FITC, constituyendo el suministrador nacional de conjugados primarios para C.F y otros inmunodiagnosticadores, del Sistema Nacional de Salud (SNS) y en especial del Instituto de Medicina Tropical *Pedro Kourí*.

El hecho de tener un producto diagnosticador como el anti-CD45 conjugado con FITC que nos brinde la posibilidad de identificar y cuantificar la población de leucocitos humanos en sangre periférica humana, nos da la ventaja, de hacer un pronóstico de las diferentes enfermedades de origen inmuno-hematológico y así disponer de un seguimiento a los pacientes con leucemias, linfomas y el SIDA de nuestro país. Ofreciendo también la posibilidad de insertarnos como proveedores de estos productos al resto del mundo.

Por todo lo antes expuesto, constituye de especial importancia contar con productos de esta especialización en nuestro servicio de salud Nacional.

MATERIALES Y METODOS

3. Materiales y Métodos

3.1- Obtención del Anticuerpo monoclonal purificado.

El anti-CD45 fue purificado a partir Líquido Ascítico Murino (LAM) obtenido en ratones Balb/c, como resultado de un proceso de inmunización descrito en trabajos anteriores. [44], [45]

Para ello se descongeló el LAM en baño de agua atemperada entre 2 y 8 ºC, y posteriormente se filtró a gravedad con papel de filtro para eliminar los lípidos obtenidos del proceso de obtención de la materia prima (LAM).

3.1.1. Purificación del AcM.

Para la obtención del anticuerpo purificado se utilizó un sistema de purificación FPLC (Fast Protein Liquid Chromatography) Cromatografía líquida rápida de proteínas, mediante el software Unicorn 4.12®, utilizando una matriz de Afinidad con proteína A-Sepharose.

La columna cromatográfica se equilibró con buffer Tris 50 mM, NaCl 1M a pH 8.5, hasta que la matriz de afinidad tomó el pH del buffer de equilibrio. El flujo de trabajo fue de 61cm/h.

Luego de equilibrada la matriz hasta lograr el pH del buffer, se aplicaron 50 mL de LAM filtrado seguido de la aplicación de 2 a 3 volúmenes de columna del Buffer de equilibrio.

Se continuó lavando la matriz con el buffer de equilibrio hasta que el registrador marcó cero de absorbancia, y se procedió a la elución de la IgG1 murina con Buffer Citrato 0.1M pH 4. Se colectó un volumen de la muestra purificada de 20 mL y luego se regeneró la columna de proteína A con Buffer Citrato 0.1M pH 3.

Se procedió luego a la diálisis del material purificado en Buffer Fosfato Salino pH 7,2 (PBS) para su cambio de pH, durante 24 horas, a una temperatura entre 2-8 °C; con tres cambios de diálisis. [46]

3.1.1.1 Determinación del recobrado del proceso.

El recobrado del proceso de purificación se calculó según la siguiente ecuación:

$$Y = \frac{masa\ 2}{masa\ 1} \times 100 \qquad (1)$$

Dónde:

Y: Recobrado (%).

Masa 2: Masa del AcM purificado (g).

Masa 1: Masa del Ac M en el LAM (g).

La masa del anticuerpo se calcula a partir de la concentración en el volumen total de la muestra colectada.

3.1.1.2 Determinación de la concentración de IgG por espectrofotometría.

La determinación de la concentración de la IgG 1 murina, se realizó mediante espectrofotometría (UV-visible) utilizando el espectrofotómetro marca PG INSTRUMENTS modelo T80.

La determinación de la concentración de proteína en el purificado se realizó aplicando el método espectrofotométrico, utilizando la ecuación de Lambert-Beer. [47]

$$A = a \times I \times C \qquad (2)$$

Dónde:

A: absorbancia de la molécula.

a: coeficiente de absortividad del Ac. (1,44 para IgG)

I: distancia en centímetros o camino óptico. I = 1

C: la concentración de la especie absorbente.

Se realizó una dilución al producto purificado de 1/10 en PBS y se aplicó la ecuación 3:

$$C(Anti - CD45) = A \times \frac{1}{a} \times D \qquad (3)$$

Dónde:

C (anti CD45): concentración del purificado CD45 (mg/mL)

A: absorbancia de la proteína.

D: factor de dilución aplicado.

1/a: el inverso del coeficiente de absortividad.

Se preparó como Tampón de lectura, un buffer Fosfato Salino 0,01 M pH 7.2, se vertió la dilución 1/10 de la muestra purificada en una cubeta de cuarzo y se midió la densidad óptica a 280 nm, se realizaron tres lecturas con el fin de lograr repetibilidad.

3.1.1.3 Ensayos de pureza de la muestra

Para la determinación de la pureza del purificado se utilizaron dos métodos: la electroforesis y la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).

3.1.1.3.1 Electroforesis en geles de poliacrilamida.

Para comprobar la pureza e integridad del anticuerpo Anti-CD45 purificado a partir de LAM, se aplicó la técnica de electroforesis reducida y sin reducir en geles de poliacrilamida. La técnica de electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE) en presencia Duodecil Sulfato de Sodio (desnaturalizante) y en condiciones reductoras (2-mercaptoetanol) es un método rápido, reproducible y de bajo costo ampliamente utilizado para cuantificar, comparar y caracterizar proteínas (Laemmli, 1970). [48, 49]

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

La Tabla 1 muestra la preparación del gel de acrilamida con respecto a las soluciones y al tampón de muestras utilizado en la electroforesis reducida y sin reducir aplicada.

Una vez preparada la cámara para añadir las muestras, se tomó el volumen de muestra necesaria para la corrida garantizando que este no sobrepase el volumen del pocillo. Posteriormente, se introdujeron las muestras en un beaker con agua en ebullición para desnaturalización durante 5 min, se centrifugaron a 1000 rpm por 5 min igualmente.

En el primer pocillo del gel se aplicaron 10 µL del patrón de peso molecular (Unstained de Biorad®) y a continuación se aplicaron 15 µL de las muestras en otro pocillo. La corrida electroforética se realizó durante 45 min, en un equipo de electroforesis vertical Mini Protean 3®Cell (Bio-rad; Alemania).

Las bandas correspondientes al producto resuelto, en ambos geles, se visualizó con Azul de Coomassie (Biorad®; catálogo: 161-0436). Para ello, se incubó a temperatura ambiente con una solución de tinción durante 1 hora. Transcurrido este tiempo se adicionó una solución de lavado hasta visualizar las bandas de la proteína.

Ingredientes químicos utilizados para la SDS PAGE:

- **Tris (hidroximetil) aminometano**. Su pKa es 8,3 a 20 °C, lo que lo convierte en un tampón idóneo para el intervalo de pH entre 7 y 9.
- **Glicina**, o **ácido aminoacético**. fuente de iones de arrastre (o lentos).
- **Acrilamida**. Responsable de la polimerización vinílica formando polímeros de cadena larga. La formación del gel requiere que varias cadenas queden trabadas (lo que se consigue con la bisacrilamida
- **Bisacrilamida o N,N'-metilenbisacrilamida**. Agente de reticulación más frecuente para los geles de poliacrilamida, la bisacrilamida polimeriza conjuntamente con la acrilamida.
- **Duodecilsulfato sódico (SDS)**. Detergente desnaturalizante de proteínas nativas en sus polipéptidos individuales.
- **Persulfato amónico(APS)**. El APS genera radicales libres y es por ello un iniciador de la reacción de polimerización que finalmente forma el gel.

- **TEMED** La tasa de polimerización y las propiedades del gel resultante dependen de la concentración de APS y TEMED. Se utilizó la menor concentración posible de catalizadores para lograr la polimerización en un tiempo óptimo.
- **2-Mercaptoetanol**. Agente reductor utilizado para romper los enlaces disulfuro de la proteína y asegurarse de que la proteína esté completamente desnaturalizada antes de ser cargada en el gel.

Tabla 1. Soluciones para la preparación del gel de acrilamida de la electroforesis reducida y no reducida

Soluciones para SDS en Ac Ms	**Geles separadores**		**Gel concentrador**
	7,5 %(no reducido)	12,5% (reducido)	
30% acrilamida/bisacrilamida	3,75 mL	6,35 mL	
1,5M Tris-HCL pH8,8	3,75 mL	3,75 mL	
1M Tris-HCL pH6,8	-	-	2,5 mL
Dodecil sulfato de sodio 10%	150µL	150µL	100µL
Persulfato de Amonio 10%	100µL	100µL	100µL
Tetrametiletilendiamino(TEMED)	10µL	10µL	10µL
Agua para inyección	7,5 mL	4,9 mL	6 mL

Tabla 2 Ubicación de la muestras en el auto- inyector del HPLC

Tipo de corrida	**ID muestra**
Blanco	Solución fase móvil
MRT	Muestra control1
MRT (1/20)	Muestra control 2 diluida
Muestras (hasta 15)	Número de parte /consecutivo
MRT	Muestra control1

Tabla 3. Valoración de resultados en la detección por HPLC

Criterio	**Límite**
CV del % área de dímero de las 4 inyecciones de MRT	CV≤ 2%
CV del % área de monómero de las 4 inyecciones de MRT	CV ≤ 2%
Exactitud de la detección para la inyección del MRT al 5%	4% - 6%

3.1.1.3.2 Determinación de Pureza por HPLC

Al AcM purificado se determinó pureza por HPLC utilizando la cromatografía de filtración en gel de exclusión molecular, por una columna TSK-GEL G3000 SWXL, para el análisis de las corridas se utilizó el software LC solution® versión 1.03 SP6 (Shimadzu® corporation). [50, 51]

Se vertieron en dos viales 250 µL del material de trabajo de referencia (MRT Bh-R3). En un tercer vial se vertió el mismo volumen del material de referencia diluido 1:20 con Buffer Fosfato Salino 0,01 M pH 7.2 (PBS), la concentración de la muestra se ajustó con PBS a 5 mg/mL. Luego de ajustar el equipo al funcionamiento, se colocaron las muestras en el auto-inyector como se mostró en la Tabla 2.

Se equilibró la columna 15 min antes de comenzar la corrida, se inyectó por duplicado cada uno de los viales de la muestra control 1; posteriormente se analizaron los resultados obtenidos en el cromatograma. Se determinó el coeficiente de variación (CV) entre las 4 repeticiones de las determinaciones de las muestras controles 1 del porciento de área bajo la curva los dímeros y monómeros y se determinó la exactitud de la detección de la muestra control 2 diluida utilizando al área bajo la curva del monómero mediante la siguiente expresión 4:

$$Exact\ de\ detec. = \frac{area\ muestra\ control\ 2}{prom.area\ de\ 4\ inyecc.de\ la\ muestra\ 1} \times 100 \qquad (4)$$

Los resultados obtenidos en la detección fueron valorados según los criterios de la Tabla 3.

3.1.1.4 Determinación de la Actividad Biológica al Ac M purificado.

La actividad biológica del purificado se determinó mediante inmunofluorescencia Indirecta por Citometría de Flujo.

Se prepararon diluciones del purificado a diferentes concentraciones de AcM con PBS y del anti-CD45 comercial (1/5, 1/10, 1/15, 1/20). Como controles positivos se utilizaron un anti-CD45 (DAKO®) y un anti-CD45 conjugado con FITC (DAKO®).

En tubos de 5 mL Falcon®, se añadió 100 µL de sangre total humana, 20 µL de las diluciones del Anti-CD 45 comercial y del AcM a evaluar (en paralelo). Se agitó suavemente los tubos con el vórtex e incubó de 2-8 °C durante 30 min, se añadió 20 µL de Anti-ratón/FITC se agitó suavemente e incubó de 2-8 °C en oscuridad durante 30 min. Posteriormente se centrifugó a 1200 r.p.m. durante 5 min a 4 °C desechando el sobrenadante, se añadió 2 mL de PBS a cada tubo y luego se resuspendió la muestra en 200 µL de una solución al 1% de formaldehído en PBS. Se agitaron suavemente y se leyeron las muestras en el Citómetro de Flujo utilizando los valores de adquisición específicos para leucocitos. El ensayo fue analizado en el programa WinMDi® y se determinó el porciento de reconocimiento del producto según la siguiente ecuación 5.

$$R = \frac{\%\, recon.AcM\ evaluado}{\%\, recon.de\ AcM\ ref.} \times 100 \qquad (5)$$

3.2- Obtención del AcM conjugado con Isotiocianato de fluoresceína (FITC).

3.2.1. Preparación del AcM

Para la conjugación con el FITC (isómero I, Sigma Catálogo F4274) del anticuerpo monoclonal purificado, se verificó que la concentración de proteína fuese mayor de 4 mg/mL. [36] Para realizar el cambio de pH del AcM, de 7.3 a 9.5, se dializó por 24 h en buffer carbonato-bicarbonato de pH 9,5 utilizando bolsas de diálisis (Spectral/Por4®). [52]

3.2.2. Conjugación del AcM con FITC

La conjugación del AcM se realizó mediante tres protocolos (1, 2, 3) en los cuales se varió la cantidad del fluorocromo empleado en la mezcla de conjugación, utilizando como disolvente del fluorocromo, el Dimetilsulfóxido (DMSO) Hybri-max SIGMA®. Se trabajó con una concentración constante del anticuerpo.

Se desarrollaron tres protocolos de conjugación del AcM IgG1 obtenido a partir del Líquido Ascítico Murino. El protocolo de conjugación 1 se estableció partiendo de la relación establecida FITC/proteína (1:2) por Harlow, E. and Lane D.; siendo aplicada dicha relación en este caso a nuestra molécula en particular. Los protocolos 2 y 3 se obtuvieron variando la relación descrita por los autores a una proporción de 1:4,6 y 1:7, respectivamente; en correspondencia con una razón molar F/P de 3-8 reportada por Roederer y col. [36]

Protocolo de conjugación 1:

Este protocolo fue basado en la proporción FITC/Proteína establecida por Harlow, E. and Lane, D., para las proteínas en general, en el protocolo 1 fue aplicada esta proporción a la IgG 1 murina y se realizaron modificaciones en dicha relación para formar el protocolo 2 y 3. [53]

Se preparó la solución FITC-DMSO con 3,5 mg de FITC (isómero I, Sigma F4274) para 500 µL de Dimetilsulfóxido (DMSO) (Sigma), utilizando un frasco de vidrio ámbar se adicionaron al anticuerpo en agitación constante, 50 µL de la mezcla FITC-DMSO, en alícuotas de 5 µL, luego se incubó el Ac con el fluorocromo durante 24 h hasta lograr la conjugación Ac-FITC a una temperatura de 2-8ºC.

Protocolo de conjugación 2:

Se preparó la solución FITC-DMSO con 1,5 mg de FITC (isómero I, Sigma F4274) para 500 µL de Dimetilsulfóxido (DMSO) (Sigma), utilizando un frasco de vidrio ámbar se adicionaron al anticuerpo en agitación constante, 50 µL de la mezcla FITC-DMSO, en alícuotas de 5 µL, luego se incubó el Ac de 7,01 mg/mL con el fluorocromo, por 24 h de 2-8 ºC.

Protocolo de Conjugación 3:

Se preparó la solución FITC-DMSO con 1,0 mg de FITC (isómero I, Sigma F4274) para 500 µL de Dimetilsulfóxido (DMSO) (Sigma), utilizando un frasco de vidrio ámbar se adicionaron al anticuerpo en agitación, 50 µL de la mezcla FITC-DMSO, en alícuotas de 5 µL, luego se incubó el Ac con el fluorocromo, por 24 h de 2-8ºC.

3.2.3. Purificación del Conjugado

La purificación del anticuerpo conjugado por los tres protocolos de conjugación descritos se realizó por filtración en gel en columnas PD-10 (Pharmacia®) utilizando una matriz de Sephadex G-25 y un Buffer Fosfato Salino 0,01 M como tampón a pH 7,2 para remover del gel de exclusión las moléculas de FITC que no se conjugaron al anticuerpo.

3.2.4. Determinación de la relación molar F/P por espectrofotometría

La determinación de la relación F/P en la muestra purificada se realizó por espectrofotometría a una densidad óptica de 280 nm para detectar las moléculas de anticuerpo fluorescente en el producto conjugado y a 495 nm para detectar la presencia de moléculas de fluorocromo acoplado a la proteína en el espectro visible del equipo. Como Tampón de lectura se utilizó el Buffer Fosfato Salino pH 7.2 a 0,01 M, se vertió la dilución 1/10 de la muestra purificada en una cubeta de cuarzo y se midió la densidad óptica. Se realizaron tres lecturas con el fin de lograr repetitividad. Para determinar la razón molar se utilizó la ecuación 6. [54]

$$\frac{F}{P} = \frac{2{,}77 \times A(495\ nm)}{A(280\ nm) - 0{,}35\ (A\ 495\ nm)} \qquad (6)$$

Dónde:

F/P Relación FITC/Proteína

A 495nm Absorbancia a 495nm (del fluorocromo)

A 280nm Absorbancia a 280nm (del anticuerpo)

Se compilaron y tabularon los datos obtenidos.

3.2.5. Determinación de la actividad biológica al producto conjugado.

La determinación de la actividad biológica en las muestras de conjugadas después de su purificación se realizó por la técnica de Inmunofluorescencia directa mediante citometría de flujo en muestras de sangre humana.

Se prepararon diluciones del producto conjugado del anti-CD45 comercial a cuatro diluciones (1:5, 1:10, 1:20, 1:40) con buffer Facs Flow, cada dilución se homogenizó con el vórtex. Como control positivo se utilizó un Anti-CD45 conjugado con FITC (DAKO®).

En 4 tubos Falcon de 5 mL, se añadió 100 µL de sangre total humana, 20 µL de cada dilución del Ac M conjugado a evaluar. Se montó un control negativo (con 100 µL de sangre total del donante) y se comparó con otros dos tubos a dos diluciones del Anti CD45 conjugado con FITC (DAKO®) 1:5 y 1:10, a los cuales se le añadió 100 µL de sangre total del donante y 10 µL del producto de referencia. Todos los tubos de homogenizaron en el vórtex e incubaron a 4 °C durante 30 min a poca luminosidad. Luego de la incubación a cada tubo se le añadió 2 mL de solución de lisis y se centrifugó por 5 min a 1500 r.p.m. a 4 °C, con cuidado de no perder las células. Se desechó el sobrenadante y se añadió 4 mL de buffer Facs Flow para lavar las células mediante centrifugación a 1500 rpm durante 5 min. Luego de comprobar la transparencia del sobrenadante, se le añadió a cada tubo 200 µL del buffer Facs Flow y se homogenizaron en el vórtex, se filtró con membrana de 0,2 µm para evitar tupición en los conductos del citómetro y se leyeron las muestras en el citómetro de Flujo marca Facs Scan®, utilizando los valores de adquisición específicos para leucocitos. El ensayo fue analizado en el programa WinMDI®. Se determinó el porciento de reconocimiento del producto por la ecuación 5.

3.3- Análisis estadístico

Se procedió a determinar los valores promedios y las desviaciones estándares, para las respuestas a los tratamientos (protocolos ensayados): la relación FITC/Proteína y la actividad biológica. Se realizó análisis de normalidad usando la prueba de Kolmogorov-Smirnov, a los valores obtenidos en las fracciones de purificación de cada protocolo, indicando transformación de escala. Posteriormente se compararon cada protocolo mediante ANOVA tipo II y comparación de medias *a posteriori*.

RESULTADOS Y DISCUSION

4. Resultados y Discusión

El desarrollo de métodos y técnicas para la purificación de proteínas ha sido un prerrequisito esencial para muchos de los avances de la biotecnología. Específicamente, la purificación de anticuerpos monoclonales ha sido una herramienta de obtención de diagnosticadores y muchos productos biotecnológicos de uso biofarmacéuticos en general. Por lo tanto, es preciso seleccionar un método de purificación adecuado que permita realizar un balance entre resolución, capacidad, rapidez y recobrado.[19]

El anticuerpo monoclonal IgG1 murina obtenido a partir de Líquido Ascítico Murino (LAM) ha sido purificado por diferentes grupos de investigación, utilizando varios principios de separación, como es el de: intercambio iónico, exclusión molecular, interacción específica etc. [55,11,12]. La purificación por interacción específica con los ligandos de la matriz constituye un método que permite la obtención del producto a un solo paso cromatográfico, ofreciendo alta selectividad en la unión entre la molécula de interés y el ligando.

4.1- Obtención del AcM purificado

La materia prima utilizada para la obtención del anti-CD45 purificado fue el LAM L3 el cual, según documentos técnicos, debe tener una concentración ≥ 0,2 mg/mL de anticuerpo específico. Para el desarrollo de esta investigación se trabajó con una concentración de 3,60 mg/mL, por lo que la materia prima superó la concentración ideal del producto. [56]

El cromatograma del proceso de purificación, bajo el principio de selectividad por afinidad con proteína A-sepharose, se muestra en la Figura 6. La aplicación de la muestra se realiza a partir de la adición a la columna de 50 mL de LAM con una concentración de IgG 1 de 3,60 mg/mL. El pico cromatográfico de elución se obtuvo a partir de 20 mL (Ve); determinado por un cambio de pH de 7,5 a 4,0 utilizando un tampón de ácido cítrico 0,1 M que provocó la separación de la proteína de interés de la proteína A soportada en el gel de Sepharosa.

En trabajos realizados por Sarmiento en el 2012, utiliza la cromatografía basada en el principio de exclusión molecular.[12] En este principio el poder de separación lo ejerce la diferencia de pesos moleculares característicos de las moléculas. Por lo general, en este método de separación las columnas cromatográficas deben tener mayor altura (con respecto a la de afinidad), para facilitar que las moléculas se puedan separar a través del fraccionamiento en el eluato. Esta metodología tiene como inconveniente la dilución de la muestra por la presencia en mayor medida de la fase móvil (tampón de equilibrio). Por eso no se recomienda este método para la purificación y recobrado de una proteína, que posteriormente se necesitará en una concentración superior a los 5 mg, pues se plantea que el rango ideal de concentración de la proteína a conjugar con FITC debe ser entre 5-10 mg/mL. [25, 57]

Otro de los métodos que también se han empleado para la purificación del LAM L3 es mediante el principio de intercambio iónico, en el cual mediante un intercambiador cargado se establece una unión por atracción de las cargas opuestas entre la molécula de interés y el intercambiador de la matriz. Se han utilizado muchos intercambiadores para lograr esta interacción; entre ellos el más usado es el intercambiador aniónico DEAE (anexo 3) en soporte de Sephadex. Este método, al igual que el anterior, precisa de un tiempo de interacción mayor del material biológico con el gel de separación; pues facilita una mayor interacción con el intercambiador al pH útil de intercambio. [11, 12]

En otros trabajos se han combinado dos métodos para la obtención de este producto, como el de Intercambio iónico seguido del principio interacción específica por afinidad, combinación de ambos métodos a los efectos de mantener una concentración en el rango óptimo de 5-10 mg. No obstante, al incluir dos pasos cromatográficos consecuentemente se encarece el proceso de obtención del anticuerpo purificado.

Por lo que el método seleccionado para la obtención de la IgG 1 murina purificada a partir del LAM fue el de afinidad con proteína A, debido a que en un solo paso cromatográfico se obtiene el anticuerpo concentrado y en menor tiempo. [25]

Varios autores reportan que los costos de la etapa de purificación se encuentran entre el 40 y el 80 % de los costos de producción total de anticuerpos monoclonales (Jagschies y cols., 2006; Sofer y cols., 2006) [58, 59]

Para determinar la recuperación obtenida del anticuerpo anti-CD45 se calculó el porciento de recobrado, según metodología descrita en Materiales y Métodos (3.1.1.1).

El resultado arrojó un porciento de recobrado de 128 %, lo cual demuestra que el proceso empleado para la purificación de la molécula IgG1 fue eficaz para la obtención del anticuerpo; estando acorde con el método cromatográfico empleado. Este método de purificación permite la captura de los anticuerpos en un solo paso, recuperando gran parte del anticuerpo de interés debido a la alta selectividad de la misma. Resultados similares obtuvo Oliva en el 2010 y Sarmiento en el 2012. [11, 12]

La concentración de Inmunoglobulinas en el purificado se determinó por espectrofotometría UV-visible. Esta es una técnica analítica que permite determinar la concentración de un compuesto en solución, en este caso en presencia de una sola especie absorbente.[47] El valor de la concentración obtenido fue de 7.08 mg/mL de IgG1 murina, superando el criterio de aceptación para la IgG1 purificada a partir de LAM; que según los documentos técnicos aplicados LABEX para este producto debe ser mayor de 0,50 mg/mL. [60]

Teniendo en cuenta que el purificado (IgG 1) constituye un producto intermedio que constituirá la materia prima del conjugado, es importante garantizar las condiciones óptimas para el proceso de conjugación; entre las cuales se destacan una concentración del anticuerpo mayor de 4 mg/mL, según plantean lo autores Kantor y Roederer. [36]

Figura 6 Cromatograma del proceso de purificación de la IgG1 murina partir de LAM por Cromatografía de Afinidad.

4.1.1. Determinación de la pureza del IgG 1 purificado.

En los procesos de conjugación con anticuerpos monoclonales resulta vital para la obtención de un producto marcador específico, el que no se detecte otra biomolécula en solución con el anticuerpo de interés, constituyendo un contaminante en la muestra. Entre los efectos que causa la presencia de dicho contaminante proteico se distingue el acoplamiento al fluorocromo marcador, creando luego un reactivo inespecífico para el diagnóstico.

Por lo que resulta de gran importancia aplicar métodos que comprueben la presencia en la muestra biológica de un solo tipo de molécula (IgG 1).

La electroforesis de proteínas, cuyo fundamento es la separación de las moléculas según su carga eléctrica, nos permite aislar, separar y caracterizar moléculas según su peso molecular. [61] Se conoce que la IgG 1 tiene un peso molecular aproximado de 150 kDa, y la presencia de una única banda a este nivel puede ser determinado como un criterio de pureza, teniendo en cuenta el número de bandas que aparecen en el gel. [8, 62]

La Figura 7 muestra el gel de electroforesis no reducida en ausencia del 2-mercaptoetanol, pero desnaturalizado el anticuerpo purificado del LAM. El resultado demuestra que en el purificado obtenido, comparado con el patrón (Unstained de Biorad®) de pesos moleculares, solo exhibe una banda con un peso molecular aproximado de 150 kDa que debe pertenecer a la IgG 1. El hecho de no observarse ninguna otra banda en la corrida de la electroforesis evidencia que en la muestra purificada no se detecta otra biomolécula, resultado que nos permite fundamentar que el producto obtenido no contiene ningún contaminante detectable en las condiciones de ensayo.

La molécula de Inmunoglobulina al separarse en sus cadenas ligera y pesada, favorecida por las condiciones reductoras, se obtienen sus pesos relativos que son de aproximadamente 25 kDa y 50 kDa respectivamente, según plantean los autores Kumagai y col. [9]

En la Figura 8, se muestra la electroforesis en condiciones reductoras con desnaturalización de la conformación nativa de la molécula purificada; donde se observan dos bandas correspondientes a la cadena pesada (50 kDa) con un 48,83% del total de proteínas y la cadena ligera (25 kDa) representando un 23,08% de proteínas; referidos al patrón utilizado, en correspondencia con el trabajo citado.

La cromatografía líquida en alta presión (HPLC), es un método 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 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. [63]

Entre los mecanismos de interacción utilizados en el HPLC se encuentran: adsorción superficial, partición, intercambio iónico, exclusión molecular. El principio aplicado estuvo basado según el peso molecular de las moléculas presentes en el purificado, en presencia de un gel de exclusión TSK-GEL G3000 SW_{XL}; donde las moléculas de mayor peso molecular son aquellas que ofrecen menor tiempo de retención en la matriz de exclusión, seguidas de la de menor peso molecular que al tener menor peso molecular y mayor tiempo de retención, demoran más en abandonar la fase estacionaria. [64]

La Figura 9, muestra los parámetros del HPLC en el gel de filtración y el cromatograma obtenido en el proceso. En este cromatograma se muestra en el eje X, el tiempo de retención de la proteína a través del gel de filtración y el eje Y representa, la intensidad que reporta el equipo en relación a la masa de anticuerpo aplicada; puesto que a mayor masa, mayor intensidad de la señal. En el cromatograma se reportan cuatro picos.

El primer pico se corresponde con aquellos agregados de la IgG 1 formados por más de dos moléculas, conocidos como multímeros; los cuales al tener mayor tamaño que los poros del gel, no demoran en abandonar la fase estacionaria.

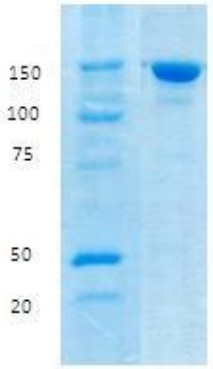


Figura 7. Electroforesis no reducida de la IgG1. Izquierda Patrón de peso molecular, a la derecha banda obtenida a los 150 KDa perteneciente a la IgG1 purificada. Se aplicaron 10 µL del patrón de peso molecular (Unstained de Biorad®) y 15 µL de la muestra purificada.

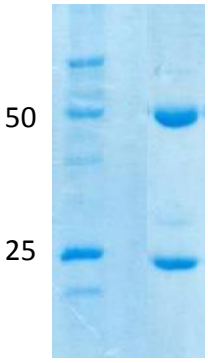


Figura 8. Electroforesis reducida de la IgG1. Izquierda patrón de peso molecular, a la derecha una banda a los 50 kDa (cadena pesada), una banda a los 25 kDa (cadena ligera) perteneciente a la IgG1 purificada. Se aplicaron 10 µL del patrón de peso molecular (Unstained de Biorad®) y 15 µL de la muestra purificada.

El segundo pico graficado representa los dímeros formados de la agregación de dos anticuerpos, los cuales tienen menor tamaño que los multímeros ofreciendo por lo tanto, mayor tiempo de retención a través de la malla del gel de exclusión. El tercer pico y de mayor tamaño, corresponde a los monómeros constituidos por las moléculas del Ac no agregados, los que tuvieron mayor tiempo de retención en la columna de purificación por tener menor peso molecular con respecto a los multímeros y a los dímeros. Esto coincide con el tiempo de retención reportado para los anticuerpos monoclonales, según trabajo de Miranda.[65] A continuación se observa otro pico correspondiente a pequeños fragmentos de Ac, lo cual podría adjudicarse a la liberación de pequeños péptidos que se obtienen como resultado de la presión del sistema sobre las moléculas de IgG 1.

Este ensayo muestra una pureza de 99,3% para la IgG 1 en relación al porciento de área reportada por los picos monómeros y dímeros, estimada del aporte de proteínas detectada por espectrofotometría, correspondiente a la sumatoria del área bajo la curva de los picos monómero y dímero. Similar cromatograma se obtiene a partir de un patrón de IgG 1 comercial obtenido en el Centro de Inmunología Molecular (CIM) (*datos no mostrados*). Se resalta que este valor, no tiene en cuenta la aportación por la presencia en la muestra de los multímeros y los fragmentos peptídicos del Ac; por lo que se asume que estos últimos no constituyen contaminantes, sino sólo agregados moleculares de la misma proteína por las condiciones de purificación, conservación y estabilidad.

A diferencia de la electroforesis, el método de HPLC permitió evaluar en este ensayo la predominancia de la IgG 1 en forma nativa, a partir de los datos de purificación obtenidos.

4.1.2. Análisis de la Actividad Biológica de la muestra purificada IgG 1.

La actividad biológica del producto purificado se comprobó mediante la reacción de I.F.I por Citometría de Flujo. En esta reacción se establece una reacción indirecta o secundaria, donde participan dos anticuerpos; el anticuerpo primario (anti-CD45 purificado) reconoce y se une a los antígenos celulares CD45 presente en la superficie de los leucocitos, mientras que el anticuerpo secundario que es el

anticuerpo fluorescente, reconoce al primario y se une a él, siendo detectada dicha reacción por el citómetro, luego de los lavados necesarios para eliminar los anticuerpo fluorescentes no acoplados.

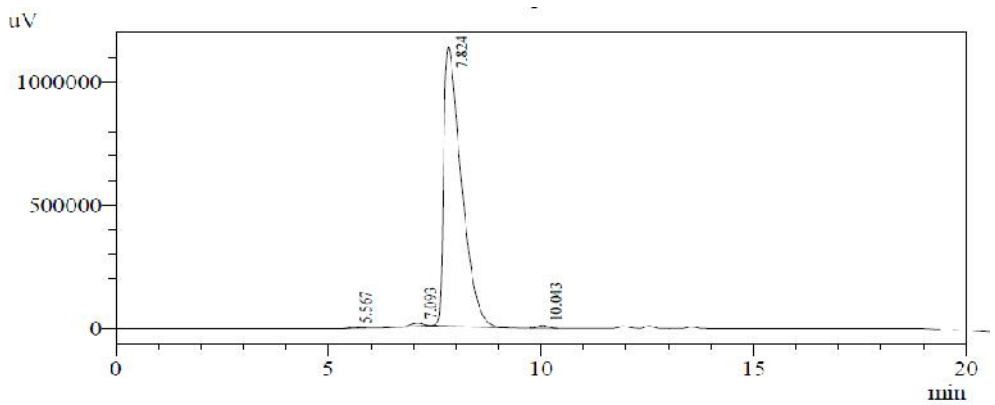
La Figura 10, representa el comportamiento del porciento de reconocimiento leucocitario del anticuerpo purificado, en comparación con el patrón de referencia de la DAKO® conjugado con FITC. En el eje de las **X** se representa el tamaño celular de los leucocitos marcados, revelado por la incidencia de la luz frontal (FSC); mientras que en el eje de las **Y** (SSC) se grafica la presencia de gránulos en el citoplasma celular, revelado por la incidencia de la luz lateral en los leucocitos. [38] En el anexo 5, se muestra el patrón de identificación celular obtenido en citometría de flujo, con un marcador *pan*leucocitario.

En el gráfico de la Figura 10, se observan tres "nubes". La nube 1 se asocia a la presencia de los granulocitos en el citoplasma, puesto que corresponde a la mayor granulosidad con valores de tamaño inferiores al resto de los componentes identificados en el purificado. [66,67] La nube 2 corresponde a La detección de los monocitos y en la 3, se identifica la presencia de linfocitos; mostrando la diversidad celular reconocida por el marcador, compuesto por el anti-CD45 conjugado con FITC.

Existen otros marcadores leucocitarios, específicos para los linfocitos. Los marcadores linfocitarios como es el caso del anti-CD3, anti-CD4, anti-CD8, conjugados con FITC, sólo identifican los linfocitos portadores de estos antígenos de superficie (linfocitos T4, T3 y T8). [6, 68]

A diferencia de estos, el anti-CD45 interacciona con todo el complejo leucocitario, siendo útil en la identificación de las distintas isoformas del antígeno CD45 presente en los leucocitos. Por lo que este marcador permite ser nombrado como antígeno común leucocitario, que se expresa en las células leucocitarias tanto de la serie mieloide como de la serie linfoide; y en leucemias agudas, su expresión puede verse reducida en intensidad a nivel de las células blásticas malignas, donde se ha descrito una correlación entre la intensidad de la expresión de este antígeno de superficie y el pronóstico. [3]

En estos ensayos el porciento de reconocimiento leucocitario del Ac purificado fue de 98,6 con respecto al patrón utilizado (DAKO®); a partir de una dilución de 5 µg/mL. El rango reportado para un marcador leucocitario en las especificaciones técnicas para producción como reactivo de marcaje es de 89-100 %; por lo que el producto ensayado se encuentra en dicho rango de marcaje y permite se utilice para fines diagnóstico empleando la técnica de citometría de flujo.



pico	Tiempo de retención	Área	Área %	Resolución
1	5.57	51411	0.16	0.000
2	7.09	241365	0.73	3.274
3	7.82	32675961	98.58	1.107
4	10.04	176233	0.53	3.631
total		33144970	100.00	

Figura 9. Cromatograma obtenido de la aplicación de una muestra de IgG1 murina purificada, mediante HPLC. La muestra fue aplicada a una concentración de 5 mg/mL.

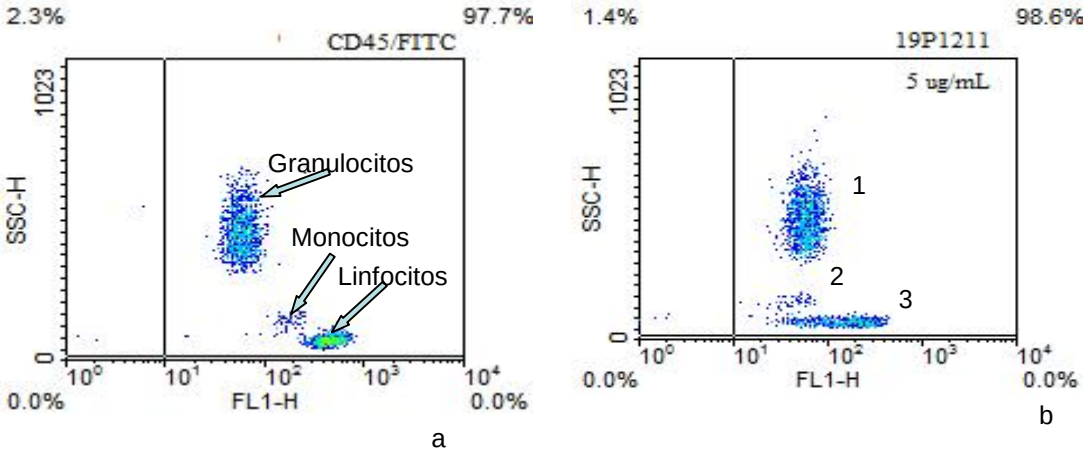


Figura 10. Histogramas que representan el porciento de Reconocimiento Leucocitario en una muestra de sangre. a. patrón comercial conjugado con FITC; b. la muestra purificada (IgG 1 murina).

4.2- Obtención del Conjugado.

Para lograr un proceso de conjugación eficiente, primeramente se garantizó que la proteína cumpliera con los parámetros críticos según plantean los autores Roederer y Kantor para lograr la efectividad del acoplamiento entre las dos moléculas: [36]

- Concentración del anticuerpo ≥ 5 mg/mL.
- Ausencia de Azida Sódica (NaN_3) en la solución del anticuerpo.
- pH básico del anticuerpo (9,5) en el cual ocurre la interacción de los amino de la lisina con el cloruro de sulfonilo del fluorocromo.
- La solución del fluorocromo en el disolvente (DMSO) debe ser preparada al momento de ser utilizada para evitar la oxigenación del mismo.

El trabajar con una concentración mayor de 5 mg/mL garantizó la efectividad de la conjugación, al permitir mayor interacción entre el anticuerpo y el FITC. Esta interacción es de tipo covalente y se produce entre el grupo amino de la cadena lateral del aminoácido lisina, presente en el extremo carboxílico de la proteína, y el grupo cloruro de sulfonilo del FITC. Esta interacción ocurre a pH básico por ser la lisina un aminoácido clasificado como básico que requiere estar cargado positivamente.

La presencia de una sal como la azida sódica en solución con el anticuerpo, provoca que ocurra un fenómeno llamado *salting in;* donde en un medio poco salino, la solubilidad de las proteínas aumenta al incrementar la concentración de sales. Según se aumenta la fuerza iónica del medio, los iones en que éstas se disocian rodean a las proteínas e interaccionan con sus grupos ionizables; evitando así, que se establezcan interacciones atractivas entre las cadenas laterales o extremos cargados de las proteínas. Dicho fenómeno puede impedir que ocurra la interacción de la proteína con el fluorocromo por sus grupos activos. [69]

Para la obtención del Anti CD45 conjugado con FITC se aplicaron tres protocolos de conjugación. En esta tesis se toma como referencia la proporción 1:2 (FITC/Proteína), asumida por Harlow y Lane [53] validada por Xia y col [70] y Roederer y

col. [36], para las proteínas conjugadas con FITC; obedeciendo a una relación F/P aplicada por los autores de 3-10 para una proporción descrita de 1:2. Esta última fue aplicada a la IgG1 murina para obtener el protocolo 1 del ensayo, y fue modificada a proporciones de 1:4,6 y de 1:7 en los protocolos 2 y 3, respectivamente.

Los valores de absorbancia característico de cada molécula resultó ser el parámetro de seguimiento de la FITC/Proteína (F/P): 495 nm y 280 nm, respectivamente. Además se realizó la determinación de la actividad biológica por Inmunofluorescencia Directa (I.F.D), mediante Citometría de Flujo (C.F).

La relación F/P se establece para dar a conocer la cantidad de moléculas de fluorocromo que hay acopladas por molécula de anticuerpo IgG 1 murina, en un conjugado fluorescente con FITC.

En la Figura 11 se representa, el comportamiento gráfico de la relación de los tres protocolos de conjugación para la IgG1 murina con FITC; donde se muestra que el producto obtenido mediante los tres, conserva una razón molar FITC/Proteína en el rango especificado por M. Roederer de 3-8.

Como se observa en el protocolo 1, el rango de la relación F/P se obtuvo entre 7,1-9,7 en correspondencia con el rango de 3-10 aplicado por los autores Harlow y Lane para las proteínas; mostrando mayor cantidad de moléculas de FITC por moléculas de anticuerpo. [53]

En el protocolo 2 la relación F/P se obtuvo en el rango de 4,8-7,1 en correspondencia con el primer rango reportado citado. No obstante, estar el protocolo 3 en el rango especificado, su relación fluorocromo/proteína resulta más baja (5,1-5,3), lo cual infiere que hubo anticuerpos sin acoplar en mayor proporción que el resto de los protocolos. Esto pudo estar influenciado por la limitación del fluorocromo en la mezcla de conjugación, aspecto que se han de tener en cuenta en investigaciones sobre conjugaciones.

En la discusión de los resultados obtenidos en este parámetro de respuesta se destaca que la influencia de la cantidad de fluorocromo en el conjugado, manteniendo una concentración constante del anticuerpo a 7 mg/mL, permitió una

variación de la relación en aumento o disminución según la cantidad de FITC utilizado. Por lo que se puede concluir de este análisis, que los protocolos de conjugación empleados se efectuaron con una razón molar en correspondencia con lo reportado en la literatura para un marcador conjugado. [36, 53, 70]

No obstante, se sugiere emplear a la par, una técnica sensible de detección del reconocimiento celular, por la influencia negativa que puede tener el exceso de fluorocromo al ocupar los sitios de unión al antígeno en el anticuerpo conjugado; pudiendo afectar funcionalmente la molécula. Teniendo en cuenta lo anteriormente expresado, se utiliza la técnica de inmunodetección directa Inmunofluorescencia directa (I.F.D).

4.3- Determinación de la actividad de Biológica de los conjugados.

La determinación de la actividad biológica de los conjugados se realiza mediante una técnica que permita la visualización de la reacción de fluorescencia, presente luego de la reacción entre el antígeno y el anticuerpo específico. Con este fin pueden ser empleadas las técnicas de: microscopía de fluorescencia y citometría de flujo. [71]

La actividad biológica del producto conjugado se determinó mediante la detección del porciento de reconocimiento leucocitario del Anticuerpo fluoresceinado por la técnica de Inmunofluorescencia Directa (I.F.D), revelando por Citometría de Flujo (C.F) la reacción antígeno anticuerpo que se establece entre el anticuerpo fluorescente y el antígeno CD45 presente en la superficie celular de los leucocitos en sangre periférica humana. Esta reacción es detectada a través del Citómetro de Flujo. [38]

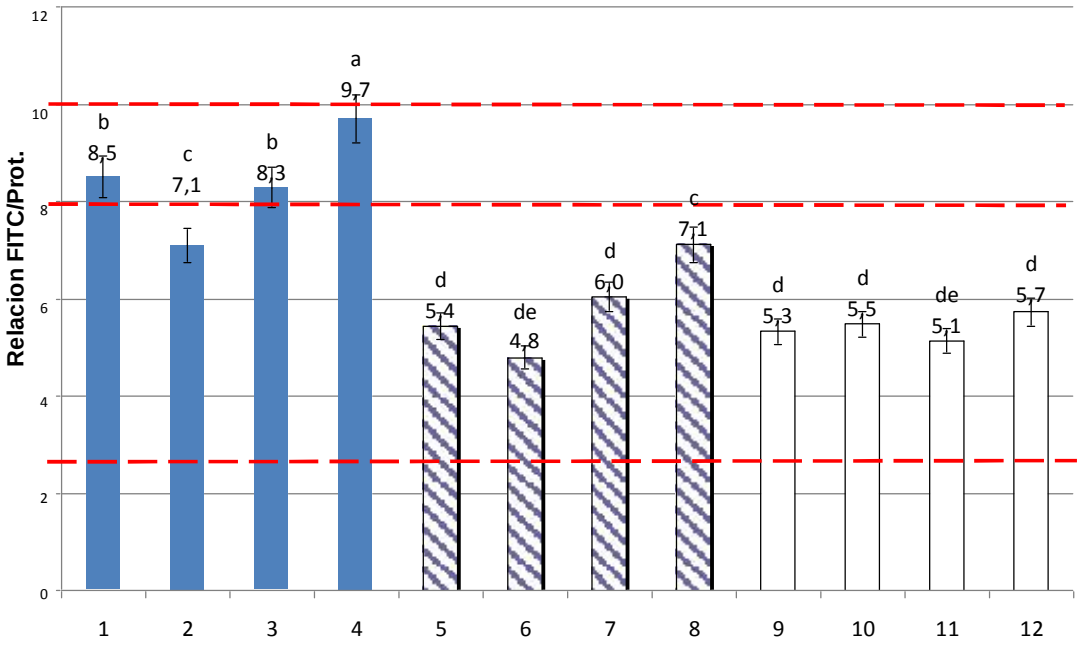


Figura 11. Comportamiento de la Relación FITC/Proteína de los conjugados obtenidos por los diferentes protocolos de conjugación empleados: protocolo 1(barras oscuras), protocolo 2 (barras rayadas), protocolo 3 (barras en blanco)

El comportamiento gráfico del porciento de Reconocimiento Leucocitario se representa en la Figura 12, utilizando el mismo código de colores de la Figura 11, para los protocolos ensayados. Los tres protocolos de conjugación muestran que los valores de reconocimiento se encuentran en el rango reportado por la literatura, según la norma de Calidad para un marcador Leucocitario de sangre periférica humana, el cual debe tener un porciento de reconocimiento de células leucocitarias en el rango de 89-100%. [60]

En las fracciones del producto conjugado obtenido mediante el protocolo I de Harlow y Lane se observa que el porciento de reconocimiento, para una relación de conjugación de 1:2, se comportó en el rango de 93,8-96,8. En el protocolo II, con un empleo de FITC según la relación 1:4,6 (FITC/Proteína), se obtuvo un porciento de reconocimiento en el rango de 93,8-95,6, similar al obtenido en el protocolo 1. En ambos los valores de porciento de reconocimiento del producto, son adecuados según lo establecido. [60]

El resultado obtenido gráficamente para el parámetro de respuesta que indica la actividad biológica del producto muestra, que los tres protocolos de conjugación aplicados a la IgG1 murina, dieron lugar a la obtención de un producto conjugado con una razón molar según los criterios reportados y un porciento de reconocimiento leucocitario en el rango adecuado para un marcador leucocitario.

Los valores de Reconocimiento obtenidos en los protocolos 1 y 2 estuvieron más cercanos al 100 % de identificación celular, por la presencia en el producto conjugado de la mayor cantidad de anticuerpos fluorescentes; ya que la mayor existencia de fluorocromos en la mezcla de conjugación, facilita la interacción de las moléculas presentes (anticuerpos y fluorocromos), sustentado en el principio de que a mayor cantidad de moléculas presentes en una muestra, mayor será la cantidad de interacciones moleculares efectivas que finalmente pueden favorecer el acoplamiento entre ambas moléculas. [47]

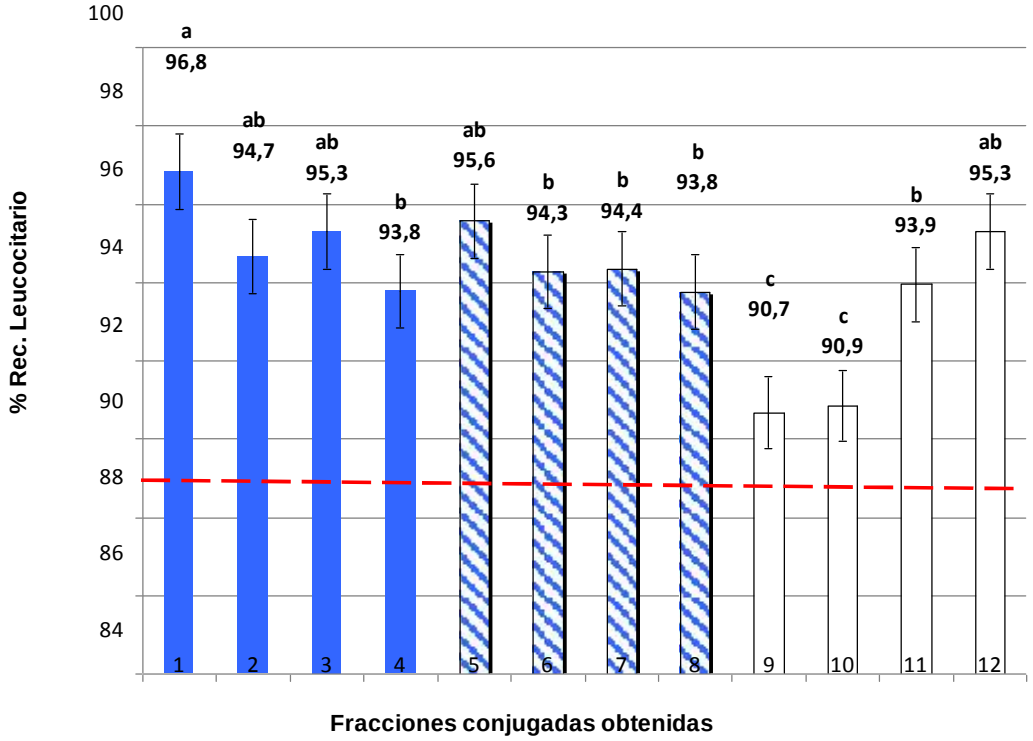


Figura 12. Comportamiento del Porciento de Reconocimiento Leucocitario de los conjugados obtenidos evaluados por Citometría de Flujo

En el anexo 6 se muestran los histogramas obtenidos de la Citometría de Flujo para los conjugados obtenidos por los tres protocolos de conjugación, coincidiendo con el patrón de reconocimiento leucocitario (ver Anexo 5), soportando la posibilidad de utilizar dicho conjugado para este fin.

4.4 Consideraciones económicas aplicadas a la obtención del marcador leucocitario.

Se realizó una valoración económica en función del costo de producción de los tres protocolos empleados, según los resultados obtenidos en las fichas de costo mediante el uso del programa Microsoft Access® 2010, (anexo 7)

La Figura 13, representa el costo de producción de los protocolos de conjugación, por frasco del reactivo obtenido; donde en el eje X se representan los protocolos ensayados 1, 2 y 3 en el eje Y se representa el costo del frasco obtenido por cada uno de los protocolos.

Los protocolos de conjugación que reportaron un menor costo de producción fueron el 1 y 2, para los que se obtuvo una actividad biológica que permitió una mayor dilución y por tanto, una mayor cantidad de frascos por protocolo. No resulta así en el caso del protocolo 3, el cual demostró un costo de producción 3,3 veces mayor con respecto a los dos primeros aplicados, por una menor dilución del producto causada por una menor actividad biológica. (ver acápite 4.8).

La Tabla 4 muestra el estudio de rentabilidad realizado a los protocolos de conjugación aplicados, donde se analizó el costo por mg de FITC empleado en cada protocolo; el rango de diluciones óptimas por Citometría de Flujo, el volumen obtenido para cada protocolo (mL) y el costo de producción unitario por protocolo.

Hay que destacar que aún cuando desde el punto de vista comercial, el producto se evalúa su costo por frasco, existe un costo social puesto que cada determinación donde se hace uso del producto representa un paciente al que se le realiza el conteo celular. Por esta razón se incorpora la determinación de Costos por Paciente y así evaluar su relación, en el impacto económico-social que se obtiene de la obtención

del producto por las variantes estudiadas, con respecto al que se compra en el mercado exterior.

Se infiere del análisis realizado a los datos reportados en la tabla 4, que mediante los protocolos de conjugación 1 y 2 empleados a la IgG 1 murina se obtiene un producto anti-CD45 conjugado con FITC, con un costo unitario de 0,209 para ambos. No obstante, el mayor volumen del producto se obtiene por medio del protocolo 1, el que permite la obtención de 1100 mL (110 000 conteos celulares a pacientes) de producto partiendo de las diluciones definidas por la actividad biológica detectada. Mientras que por la aplicación del protocolo 2 se obtuvieron 1050 mL para 105 000 determinaciones. En el protocolo 3, se obtiene un volumen de 800 mL para unas 80 000 determinaciones con un costo total de 28 032 UM, superior al 2 y al 1, arrojando este primero un costo total de 22 039, menor que el 1 con un costo total de 23 089; siendo el protocolo 2 el que arrojó menor costo total (Figura 14). Señalamos que 1 frasco de anti-CD45 conjugado con FITC consta de 1 mL de producto, con el que se realizan 100 determinaciones por citometría de flujo, según procedimiento técnico de formulación.

Al analizar la influencia del empleo del fluorocromo para la obtención del producto, se destaca que el protocolo 1 fue el de mayor empleo de FITC, con un costo de 0,938 USD, lo que constituye un gasto por este concepto de 3,5 veces más con respecto al protocolo 3 y de 2,3 veces más con respecto al protocolo 2.

Teniendo en cuenta que se trabajó con la misma cantidad de proteína, siendo por tanto el costo del anticuerpo un parámetro fijo, existe una compensación del costo total del producto obtenido mediante el protocolo 2, resultando la mejor variante.

De esta forma podemos seguir el comportamiento del empleo del FITC con respecto a la obtención del producto y destacar que la rentabilidad del proceso depende, del volumen obtenido del producto conjugado por cada uno de los tres métodos en su relación con el costo total; lo que se revierte en una mayor cantidad de determinaciones por paciente que se pueden realizar mediante C.F, para un mayor beneficio del Sistema Nacional de Salud.

En la Figura 15 se muestra el costo de producción por determinación (paciente), de los protocolos de conjugación aplicados, en comparación con el costo de la determinación del producto SIGMA el cual tiene un precio de 0,93 USD.

Se observa en el gráfico, que el protocolo 1 y 2 no muestran diferencias (0,209 UM), permitiendo obtener mayor cantidad de determinaciones, que las obtenidas mediante el protocolo 3 (0,350 UM), el cual importa mayor costo de producción. Si comparamos el costo de las determinaciones obtenidas por los tres protocolos, con respecto a la determinación del producto importado, se destaca que los protocolos 1 y 2 muestran un costo 4,4 veces menor con respecto al reactivo comercial; mientras que para el protocolo 3 se determinó un costo 2,6 veces menor con respecto al reactivo comercial de SIGMA. Los tres protocolos son rentables en base al costo de producción por determinación con respecto al producto SIGMA.

Se puede plantear que los tres protocolos permiten una sustitución de importaciones (Tabla 4); mayormente el 1 y 2, reflejando una relación de costo beneficio favorable teniendo en cuenta que el producto importado tiene un precio de 186,50 USD/2 mL (200 determinaciones) y el reactivo que se obtiene por el protocolo menos rentable tiene un costo de 70,08 UM/2 mL. Se destaca lo favorable que resulta la aplicación de cualquiera de los tres protocolos ensayados para la obtención del anti-CD45 conjugado con FITC.

Hasta el momento del estudio se ha señalado la similitud existente entre el protocolo 1 y 2, en cuanto costo y rentabilidad, al determinar el costo fijo/ frascos obtenidos de estos tres protocolos se deriva, que de los protocolos 1 y 2 el más rentable del estudio resultó ser el protocolo 2 quien permitió la obtención de 954 frascos a un costo total de 20 024 UM; mientras que mediante el protocolo 1 se obtuvieron 1000 frascos a un costo total de 20 990 UM, siendo el protocolo 3 el menos rentable para una obtención de 727 frascos a un costo total de 25 481 UM.

El impacto que se produce en lograr esta sustitución de importación, reviste especial importancia y beneficio para el Sistema Nacional de Salud, haciendo notar que la obtención del producto *per se* reporta beneficios a nuestro este beneficio producto a

que en nuestro país no se dispone de un marcador *pan*leucocitario, siendo la única vía de adquisición la compra del producto importado.

En la Tabla 5 se muestra, el análisis realizado para determinar la sustitución de importaciones del producto anti-CD45 conjugado con FITC. Se analizó el costo de producción de cada determinación obtenida de los protocolos ensayados, en comparación con el precio de la determinación del producto que se importa a un costo de 0.93 USD, si se cubriera la demanda ascendente a 6000 determinaciones. Como resultado se identificó un beneficio de la aplicación de los protocolos 1 y 2, en base al costo total, de 4,4 veces menor con respecto al producto importado. Por otro lado, el protocolo 3 ofrece un beneficio de 2,6 veces menor costo; siendo los protocolos 1 y 2 lo que aporta mayor sustitución a las importaciones.

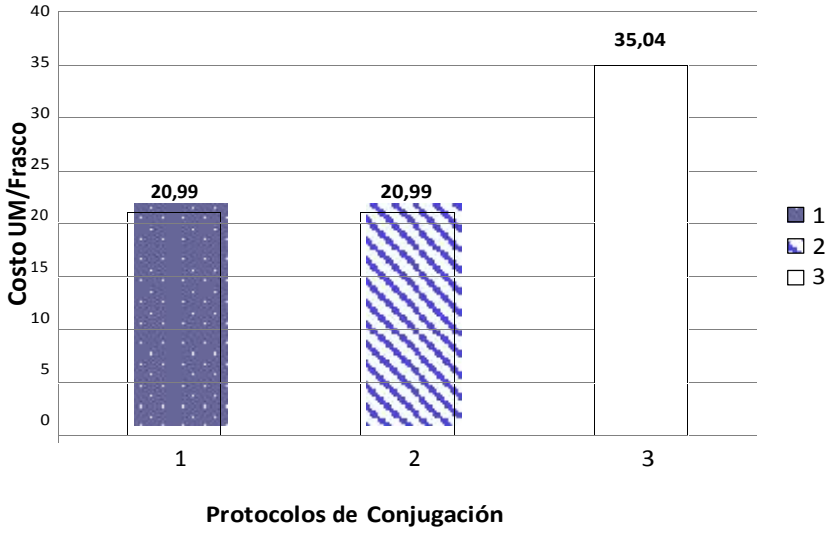


Figura 13. Relación Costo de Producción de los protocolos de conjugación empleados

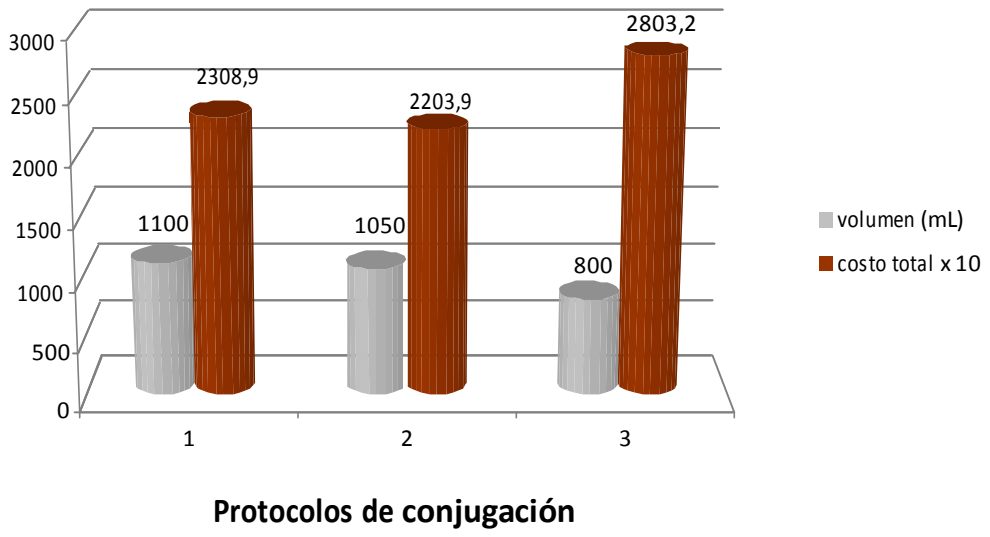


Figura 14. Volumen del anti-CD45 conjugado con FITC obtenido por los protocolos ensayados en relación con el costo total

Tabla 4. Estudio de rentabilidad de los protocolos aplicados

Protocolos de Conjugación aplicados.	**Fracciones obtenidas**	**FITC/PROT.**	**% Reconocimiento. Leucocitario (IFD)**	**Costo de FITC (USD) empleado**	**Rango de las diluciones óptimas por Citometría de Flujo**	**Volumen conjugado obtenido por variante. (mL)**	**Costo de Producción (UNIT)**
1 (4 réplicas)	I	9,8	96,8	0,938	1/50-1/200	1100 (110000det)	23 089 $(total) 20,99 $ /mL 0,209 $/det
Harlow, E. and Lane, D	II	9,3	94,7				
	III	10,5	95,3				
	IV	9,7	93,8				
2 (4 réplicas)	I	7,1	95,6	0,402	1/50-1/100	1050 (105000det)	22 039 $(total) 20,99 $ /mL 0,209 $/det
	II	7,5	94,3				
	III	7,7	94,4				
	IV	7,6	93,8				
3 (4 réplicas)	I	5,3	90,7	0,268	1/50	800 (80000 det)	28 032 $(total) 35,04 $/mL 0,350$/det
	II	5,5	90,9				
	III	5,1	93,9				
	IV	5,7	94,5				

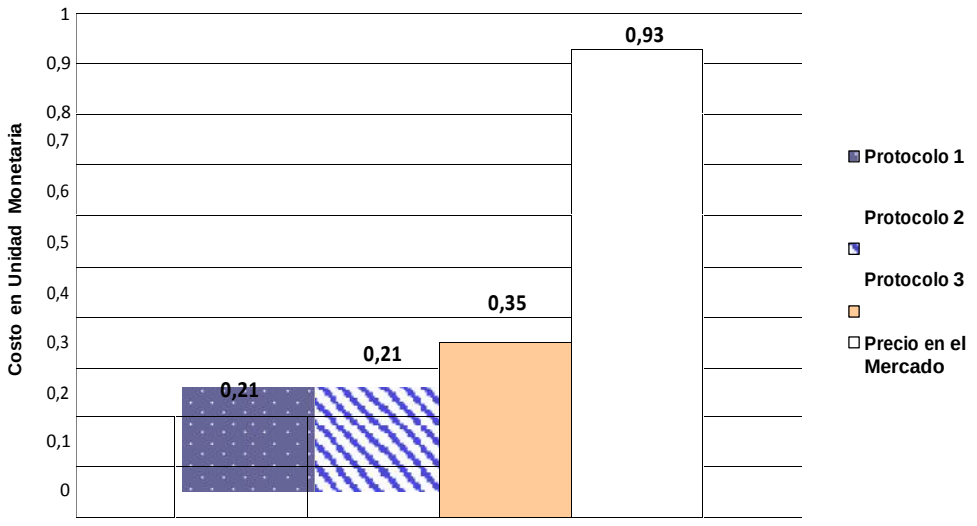


Figura 15. Costo por Determinación del producto anti-CD45 conjugado con FITC con respecto al producto importado

Tabla 5. Análisis de sustitución de importaciones por los protocolos aplicados

Sustitución de Importaciones anual (determinaciones)								
Protocolos	Costo		Demanda	Costo/demanda		Importación	Ahorro	
	UM	CUC		UM	CUC	USD	UM	CUC
1	0,209	0,0136	6000	1254	81,6	5580	4326,00	5498,4
2	0,209	0,0136	6000	1254	81,6	5580	4326,00	5498,4
3	0,350	0,0218	6000	2100	130,8	5580	3480,00	5449,2

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5. Conclusiones

1. Se obtuvo el anti-CD45 purificado a partir de LAM mediante cromatografía de Afinidad con un porciento de pureza de 99,3 determinada por HPLC.
2. Se obtuvo el anti-CD45 conjugado con Isotiocianato de fluoresceína, mediante tres protocolos de relación F/P, cumpliendo con el rango de 3-10 como parámetro técnico para este producto.
3. Las tres variantes ensayadas mostraron un porciento de reconocimiento leucocitario en el rango de 90,7%-96,8% en correspondencia con un marcador leucocitario, para Citometría de Flujo.
4. Los protocolos de conjugación más económicamente factibles en el ensayo fueron el 1 y el 2, los cuales reportan un costo de producción 4,4 veces menor que el costo de la determinación en el mercado internacional; siendo favorecido según la relación de costo total el protocolo 2 >1>3.
5. La obtención del Diagnosticador anti-CD45 conjugado con FITC, garantiza la disponibilidad de este reactivo en el Sistema Nacional de Salud y un ahorro por concepto de sustitución de importaciones de 0,98 USD por determinación.

6. Recomendaciones

Iniciar la fase de desarrollo del producto, para alcanzar su registro Sanitario

ANEXOS

7. Anexos

Anexo 1.

Propiedades fisicoquímicas de inmunoglobulinas de ratón. Tomado del capítulo 34. Fisiología Molecular. Bioquímica Voet.

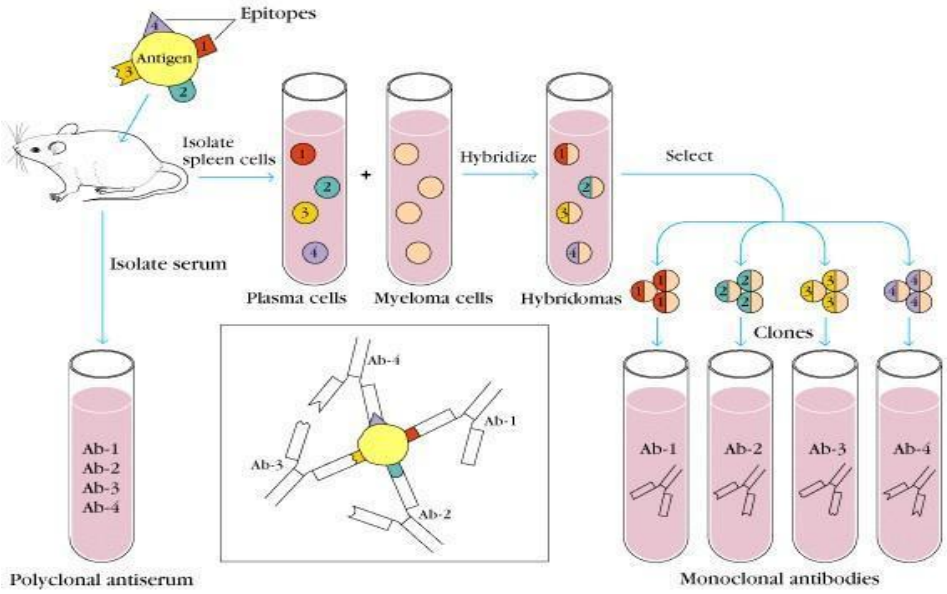
Clase	Cadena pesada	Cadena ligera	Estructura de la subunidad	Masa de la subunidad (kD)
IgA	α	κ o λ	$(\alpha_2\kappa_2)_n J$[a] $(\alpha_2\lambda_2)_n J$[a]	360–720
IgD	δ	κ o λ	$\delta_2\kappa_2$ $\delta_2\lambda_2$	160
IgE	ε	κ o λ	$\varepsilon_2\kappa_2$ $\varepsilon_2\lambda_2$	190
IgG[b]	γ	κ o λ	$\gamma_2\kappa_2$ $\gamma_2\lambda_2$	150
IgM	μ	κ o λ	$(\mu_2\kappa_2)_5 J$ $(\mu_2\lambda_2)_5 J$	950

[a] $n = 1, 2$ o 3.

[b] Las IgG tienen cuatro subclases, IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4, las cuales difieren en sus cadenas γ.

Anexo 2.

Esquema de la producción de Anticuerpos monoclonales.



Anexo 3.

Tipos de intercambiadores iónicos

Intercambiadores aniónicos

*Aminoetil cuaternaria (QAE) cargado positivo a pH < 12
(-O CH2 CH2 **N+**(C2H5)2-CH2 CHOH CH3 / **Cl-)**

*Amina cuaternario (Q) cargado positivo a pH >12

(-O CH2 CHOH CH2 O CH2 CHOH CH2 **N+**(CH3)3 / **Cl-)**

Dietilaminoetil (DEAE) cargado positivo a pH > 5

(-O CH2 CH2 **N+**H (CH2 CH3)2 / **Cl-)**

Intercambiadores catiónicos

Carboximetil (CM) cargado negativo a 4,5 < pH < 5.5
(-O CH2 **COO- / Na+)**

*Sulfopropil (SP) cargado negativo a pH > 2

(-O CH2 CHOH CH2 O CH2 CH2 CH2 **SO3- /Na+**)

*Sulfometil (S) se mantiene cargado a pH< 2

-O CH2 CHOH CH2 O CH2 CHOH CH2 **SO3- /Na+**

(*) Intercambiadores iónicos fuertes

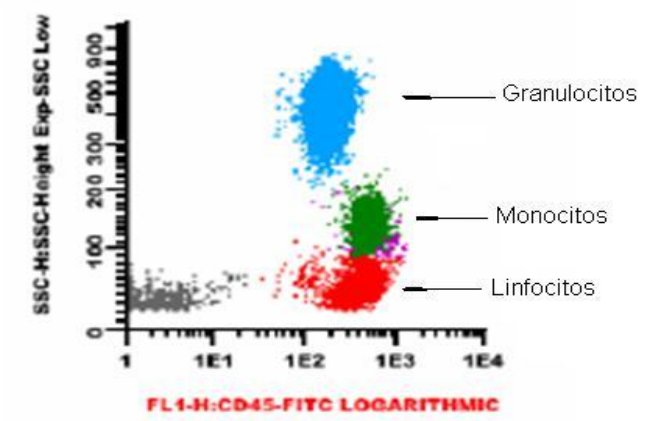
Anexo 4.

Técnicas de Inmunomarcaje.

Trazador	Denominación
Complejo Ag-Ac	Técnicas de inmunoprecipitación (técnica de Ouchterlony, Inmunoelectroforesis, difusión radial Mancini, nefelometría, etc.)
Aglutinado	Técnicas de inmunoaglutinación. (Hemaglutinación directa e indirecta y otras técnicas con látex, etc.)
Fluorocromo	Técnicas inmunofluorimétricas
Radioisótopos	Técnicas inmunorradiológicas (Radioinmunoensayo -RIA-)
Enzimas	Técnicas inmunoenzimáticas

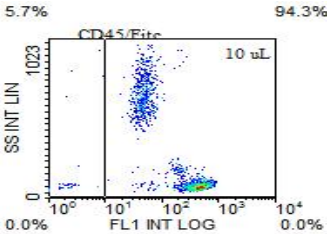
Anexo 5.

Patrón de Reconocimiento Leucocitario en citometría de Flujo del Anti-CD45 conjugado FITC. Tomado del libro Hand book de citometría [38]

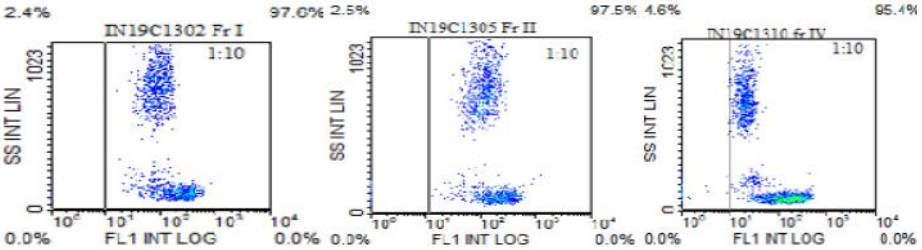


Anexo 6.

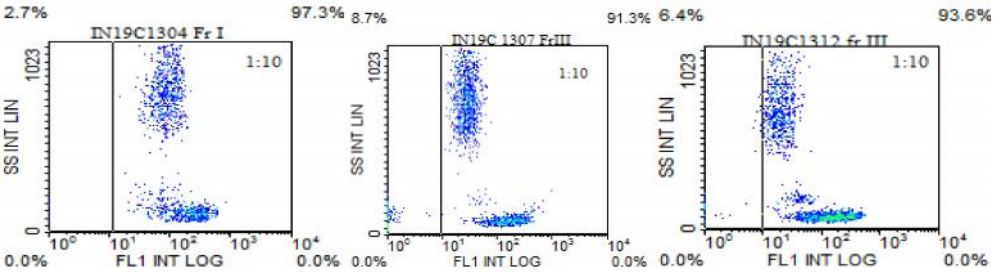
Histogramas de los conjugados obtenidos por los tres protocolos de conjugación empleados, por Citometría de Flujo



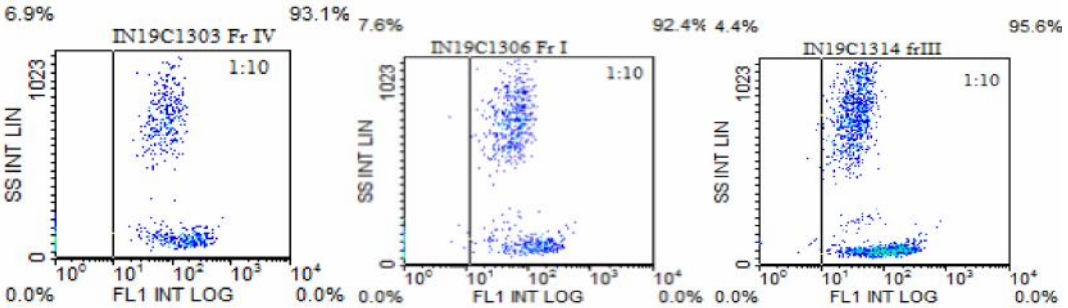
Patrón para el CD 45 conjugado con FITC



Gráficos del protocolo I.



Gráficos del protocolo II.



Gráficos del protocolo III.

Anexo 7.

A continuación se muestran las fichas de costo estimadas mediante el programa Microsoft Access® 2010 para la obtención del producto anti CD45 conjugado con FITC, por los tres protocolos ensayados

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

Referencias Bibliográficas

[1]Trowbridge, I. S. and Thomas, M. L. (1994) CD45: an emerging role as a protein tyrosine phosphataserequired for lymphocyte activation and development. Ann. Rev. Immunol. 12: 85-116.

[2]Adelsman MA, Shimizu Y, 1998. Adhesión molecules. En RoittIM, Delves PJ Encyclopedia of Immunology, Academic Press, Oxford, RU.

[3] KhosraviShahi P, Gil Herrera J, del Castillo Rueda A. La importancia clínica de los polimorfismos del gen CD45. AnMed Interna (Madrid) 2005; 22: 459-460.

[4]Nakamura, A. et al. (2001). Prognostic impact of CD45 antigen expression in high-risk, childhood B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia.Leuk. Lymphoma 42: 393-398.

[5] Hermiston ML, Xu Z, Weiss A. CD45: a criticalregulator of signalingthresholds in immunecells. Ann Rev Immulogy 2003; 21: 107-37.

[6] MEDISAN 2006; 10(4). Evaluación del desempeño de los conjugados anti-CD4/FITC y anti-CD8/FITC producidos en LABEX MsC. Marlene Toledano Heredia, Lic. Randelys Molina Castro, Dra. Teresita Rodríguez Obaya, Dr.C José M. Aviñó Marrades y Dr. Orlando R. Serrano Barrera. Laboratorios de Anticuerpos y Biomodelos Experimentales

[7] Patología Revista latinoamericana Volumen 45, núm. 3, julio-septiembre, 2007. Interpretación básica de inmunohistoquímica. Características generales de diversos anticuerpos y su localización celular y subcelular. Diego L Jorge Buys, César O Lara Torres, Carlos Ortiz Hidalgo.

[8] Abbas AK., Lichtman, AH and Pober JS. Inmunología Celular y Molecular. Tercera Edición. McGraw-Hill-Interamericana. 2010

[9]Kumagai, I., Tsumoto, K., 2001, Antigen-Antibody Binding, Encyclopedia of life sciences, Macmillan Publishers Ltd. Nature Publishing Group/www.els.net

[10] Basic Inmunology(2001)(Abbas & Lichtman)(307pp). Chapter 4. Antigen Recognition in the Adaptative Immune System: Structure of Lymphocyte Antigen receptor and the development of Inmune Repertoires. Capitulo 4.

[11] Tesis de Diploma. Propuesta de un proceso de purificación para el anticuerpo monoclonal diagnosticador ior-T4. Gonzalo Oliva Artimez. Año 2010

[12] Tesis de Diploma. Propuesta de Purificación Cromatográfica del Anticuerpo Monoclonal Anti-CD45. Iván Sarmiento Sierra. Año 2012.

---

[13]Abbas A. K.; Lichtman A. H. 2004; "*Basic Immunology.Functions and Disorders of the Immune System".*s.l.: Elsevier Inc; 2004.

[14]Saleem M.; Kamal M. "Monoclonal antibodies in clinical diagnosis: A brief review application". African Journal of Biotechnology. 2008; 7(8): 923-925.

[15]Winter G, Milstein C. Man-made antibodies Nature 1991; 388: 58-62.

[16]Little M, Kipriyanov SM, Le Gall F, Moldenhauer G. Of mice and men: hybridoma and recombinant antibodies. Immunol Today. 2000 Aug;21(8):364-70. Review. PMID: 10916138; UI: 20377416

[17]Kim, S. J. et al. (2005). Antibody Engineering for the Development of Therapeutic Antibodies. Mol. Cells 20 (1):17-29.

[18]Rev. Salud Anim. Vol. 23 No. 1 (2001): 62-64.Influencia de la edad y el sexo de ratones balb/c sobre la influencia de la edad y el sexo de ratones balb/c sobre la producción de líquido ascítico rico en anticuerpos monoclonales. Dasha Fuentes, R.R. González y Roxana Arroyo.

[19]Antibody Purfification, 2004, Hand book, Amersham Pharmacia Biotech, Edition AC, 18-1037-46.,

[20]Rodríguez, S. conferencia de Bioquímica Avanzada. Maestría en Biotecnología, 2012.

[21]The Essence of Chromatography. Colin F. Poole. Tercera Edición (2003) ELSEVIER.

[22]***http://cromatografia-por-exclusion-molecular.html*** Fecha de consulta: 27/3/2012

[23]Gel Filtration Principles and Methods. 2004. Handbooks from Amersham Biosciences. Edition 18-1022-18

[24]***http://www.teknokroma.es/es/Productos/cromatografia-de-hplc/5/biocromatografia/44/181/cromatografia-de-afinidad-afc.aspx***
Fecha de consulta: 27/3/2013

[25]Affinity Chromatography, 2004, Principles and Methods: Amersham Biosciences, Amershan Pharmacia Biotech, Edition AC ,18-1022-29.

[26]I Congreso Nacional del Laboratorio Clínico – Sevilla, 17/20 Octubre 2007. B - 44.763 - 2007 - ISBN: 978-84-89975-29-9.

[27]Ion Exchanger Chromatography, (2002) Principles and Methods, Amersham Biosciences, Edition AB, 18-1114-21. ISBN 91 970490-3-4

[28]Roitt , I.M., Delves, P.J., Inmunología, fundamentos, Editorial Medica Panamericana, Argentina, 2003.

[29]Conferencia de Introducción al Inmunodiagnóstico. (2009) Universidad de los Andes, facultad de farmacia. César Pérez-Maldonado, PhD.

[30]Burtis CA, Ashwood ER, Burns DE, Sawyer BG.(2008). «Tietz Fundamentals of Clinical Chemistry» Saunders (Elsevier) 6º ed. ISBN 978-0-7216-3865-2.

[31]Acta bioquím. clín. latinoam. vol.46 no.1. 2012. Primer Consenso Argentino para la Estandarización de la Determinación de Anticuerpos Anti-Nucleares por Inmunofluorescencia Indirecta-HEp-2. ISSN 0325-2957.

[32]A Guide to fluorescent probes and Labeling Technologies, 10 Ed. Washington, SM Press, 2005: 100-275.

[33] Peng, X., Chen, H., Draney, D.R., Volcheck, W.M., A Non-fluorescent, Broad Range Quencher Dye for FRET Assays, Analytical Biochemistry, 2009; (Vol. 388).

[34] Rev. bras. hematol. hemoter. 2007; 29(4):361-368. Conjugação e validação de controle isotípico IgG1-FITC para uso em citometria de fluxo.

[35] Revista CENIC Ciencias Biológicas, Vol. 38, No. 1, 2007. Obtención de un conjugado anti IgG de ratón – FITC mediante la tecnología IgY para uso como anticuerpo secundario en la detección de antígenos de superficie celular.

[36]M. Roederer, Conjugation of monoclonal antibodies (August, 2004). http://www.drmr.com/abcon/ (Consultado: 15 de octubre de 2013.)

[37]http://www.molbiol.ox.ac.uk/www/pathology/tig/fitc.html. Quick and simple method for conjugating mAbs. (Consultado: 15 de octubre de 2013.)

[38]Handbook of Flow Cytometry Methods by J. Paul Robinson, et al. 2006.

[39]Flow Cytometry in Clinical Diagnosis, v4, (Carey, McCoy, and Keren, eds), ASCP Press, 2007. ISBN 0-89189-548-5 .

[40] Rev Latinoamer Patol Clin, Vol. 59, Núm. 3, pp 134-141 • Julio - Septiembre, 2012.

[41]Melchers F. (2005)The pre-B-cell receptor: selector of fitting immunoglobulin heavy chains for the B-cell repertoire. Nat Rev Immunol., 5: 578-84.

[42]Ortiz R, Cortés L, González C, Cortés E, Betancourt M. Subpoblaciones de linfocitos en sangre periférica de jóvenes mexicanos sanos: estudio por medio de citometría de flujo. Bioquímica 1999;24(1):18-22.

[43]Tesis de maestría. Conjugación de marcadores linfocitarios monoclonales para citometría de flujo. Lic. Marlene Toledano Heredia. 2005

[44]Tesis de maestría. Obtención de un reactivo hemoclasificador anti B con el hibridoma C6G4 en biomodelos murinos Ofbalb(F1) y Balb/c¨. Lic Nelsa Soria Peñalver. 2010

[45] Rev. Salud Anim. Vol. 23 No. 1 (2001): 62-64 Influencia de la edad y el sexo de ratones balb/c sobre la producción de líquido ascítico rico en anticuerpos monoclonales. Dasha Fuentes, R.R. González y Roxana Arroyo.

[46]Documento de Calidad. Procedimiento Normalizado de Operación. Purificación del anticuerpo monoclonal de la subclase IgG1. O5 NO.003 Edición No: 01 Fecha: 1/3/13.

[47] Kenneth A. Rubinson, Judith F. Rubinson. Análisis Instrumental. PERSON EDUCACION, S.A., Madrid, 2001. page 353 L ISBN: 84-205-2988-5.

[48]Laemmli UK. Clavage of estructural proteins during de assembly of the head of bacteriophage T4. Nature, 227: 680-685. 1970.

[49] Procedimiento Normalizado de Operación. Análisis e identificación mediante electroforesis desnaturalizante en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE) de Ac M. G10-PNO-0015. (2007)

[50]Procedimiento Normalizado de Operación. H10 PNO-002. Título. Análisis y pureza por filtración en Gel en HPLC para AcM en solución y Kit fríos. (2007)

[51] Procedimiento Normalizado de Operación. PNO-3087. Título. Operación del HPLC. (2007)

[52]Goding, J.W., *J.* Immunol. Methods, **v. 13**, 215-226 (1976).

[53] Harlow, E. and Lane, D. (eds), Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, NY, p. 353-355 (1988).

[54]Catálogo: Products for Life Science Research. FITC conjugation of Antibodies by Aaron Cantor Washington.Ed. SIGMA.FD, 2004-2005:1239-1242.

---

[55] Biotecnologia Aplicada Vol. 17, Num. 2, 2000, pp. 109-111 Reducción del tiempo de purificación de la IgG2b mediante cromatografía de afinidad por proteína A Padilla y colaboradores . ISSN: 0684-4551 .

[56]Documento de Calidad. Especificación para: LAM L3 anti-CD45. Código : ESP-5034 Edición : 01 Fecha 9/10/09

[57]Quick and simple method for conjugating mAbs. Steve Cobbold - April 1997

[58] **J**agschies G., Gronberg A., Bjorkman T., Lacki K., Johansson H. 2006. Technical an Economical Evaluation of Downstream Processing Options for Monoclonal Antibody (Mab) Production. BioPharm International. Disponible en: **www.biopharminternational.com**.

[59] Sofer G., Chirica L., 2006. Downstream Processing: Improving Productivity in Downstream Processing; BioPharm International. Disponible en: www. biopharminternational.com.

[60]Documento de Calidad. Especificación para: Anti-CD 45 purificado a partir de LíquidoAscítico Murino. Código : ESP- 5036 Edición : 02Fecha : 1/3/12

[61]2-D Electrophoresis. Principles and Methods. Hand books from GE Healthcare. 80-6429-60. September 2004

[62] Galaktionov VG. (2004). Evolutionary development of the immunoglobulins super family. Izv Akad Nauk Ser Biol,, (2): 133-45.

[63] Kenneth A. Rubinson, Judith F. Rubinson. Análisis Instrumental. PERSON EDUCACION, S.A., Madrid, 2001. page 648 L ISBN: 84-205-2988-5.

[64]Handbooks from Amersham Biosciences. Gel Filtration. Principles and Methods. 18-1022-18. 2004.

[65] Tesis de maestría. Evaluación del Hibridoma t4 anti-CD4 para la producción in vitro del AcM IOR -T4. Lic Alejandro Miranda Ariza. 2011.

[66]http://salud.kioskea.net/faq/1629-globulos-blancos-polinucleares-y-linfocitos#tipos-de-globulos-blancos Fecha de consulta1/3/13.

[67] Guyton, Arthur C. e Hall, John E.. Tratado de Fisiologia Médica, Rio de Janeiro – RJ: Elsevier, 2006.

---

[68] Cuantificación de subpoblaciones de linfocitos de sangre periferica por citometría de flujo determinación de intervalos de referencia en población adulta sana de la ciudad de mexico. Revista Mexicana de Patología Clínica 1996; Volumen 43(1): 21-26. Razo y colaboradores

[69] ftp://10.30.143.183/BibliotecaVirtual CEBI/ Fecha de consulta 15/1/14

[70] Xia, Z., et al., Br. J. Haematol, v. 93, 204-214 (1996).

[71] Rojas, W. 1995. Inmunología. Corporación para Investigaciones Biológicas. Medellín, Colombia. Capítulo 14. pg. 197-200.