

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

**CONJUGACION DE MARCADORES LINFOCITARIOS
MONOCLONALES PARA CITOMETRÍA DE FLUJO.**

**TESIS PRESENTADA EN OPCIÓN AL TÍTULO ACÁDEMICO
DE MASTER EN BIOTECNOLOGÍA
MENCION BIOTECNOLOGÍA INDUSTRIAL**

Autor: Lic. Marlene Toledano Heredia

Tutora: Dra. C Teresita Rodríguez Obaya

Asesor: Dr. C Ramón E. García Rodríguez

2005

INDICE

	Pág.
INTRODUCCIÓN	1
I. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	4
II. MATERIAL Y METODO	10
II.1 Purificación de anticuerpos monoclonales a partir de LAM	10
II.2. Conjugación con Isotiocianato de Fluoresceína	10
II.3 Purificación de los conjugados	11
II.4 Determinación de la actividad biológica	11
II.5 Formulación y Envase	12
II.6 Establecimiento del Proceso de obtención de los conjugados	13
II.7 Estudio de Estabilidad	13
II.8 Evaluación de los conjugados en donantes sanos y en pacientes con VIH	14
III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	15
* Valoración económica	19
IV. CONCLUSIONES	20
V. RECOMENDACIONES	21
VI. BIBLIOGRAFÍA	22

RESUMEN

La necesaria evaluación y seguimiento de los pacientes con VIH/SIDA, utilizando la cuantificación de las subpoblaciones linfocitarias CD3 CD4 y CD8 por Citometría de Flujo, así como el alto costo de los reactivos conjugados con FITC utilizados en esta técnica, fueron las premisas para el presente trabajo. Se propuso como objetivo la conjugación de los Anticuerpos Monoclonales anti CD3, anti CD4 y anti CD8 con Isotiocianato de Fluoresceína (FITC) para Citometría de Flujo.

Se desarrolló el proceso de obtención de estos reactivos con una relación FITC/ Proteína entre 3 y 8 y la actividad biológica requerida; se determinó su utilidad para el diagnóstico y monitoreo de las subpoblaciones linfoides T CD3+, CD4+, CD8+. Los conjugados una vez obtenidos fueron evaluados mediante Citometría de Flujo teniendo como resultado una óptima sensibilidad, especificidad y actividad biológica. Los resultados muestran que no existe variación significativa entre estos productos y los similares de las casas comerciales ofertados internacionalmente.

Se concluye que es posible desarrollar la tecnología propuesta para la obtención de conjugados y su uso en Citometría de Flujo, obteniéndose resultados que demuestran un nivel de calidad comparable a los existentes en el mercado internacional, así como su aplicación en el Sistema Nacional de Salud.

ABSTRACT

The necessary evaluation of HIV/SIDA patient using the cuantification of CD3, CD4 and CD8 linfocitary populations in Flow Cytometry, and the high cost of conjugates reagents with Fluorescein Isothiocianate (FITC) used in this methods were the motivation of the present (paper) research. We proposed as objective the conjugation of Monoclonal antibodies anti CD3, anti CD4 and anti CD8 with FITC to use in Flow Cytometry.

We developed the obtention process of this reagents with a relation FITC / protein between 3 - 8 and required biological activity. We determinated the utility for diagnostic and monitoring of CD3+, CD4+ and CD8+ T cell linfoids population. The conjugated antibodies were evaluated using Flow Cytometry and was obtained the optimal sensibility, specificity and biological activity. The results show that do not exist significative variation between this products and comercial similars used in the world.

We conclude that, is possible to develop the described technology to obtain the conjugated and it use in Flow Cytometry. The results obtained show a level of similar quality to the international market also its application in the National System of Health.

I. INTRODUCCIÓN

Las inmunodeficiencias son un grupo de enfermedades congénitas o adquiridas causadas por la alteración cuantitativa y/o funcional de distintos mecanismos implicados en la respuesta inmunológica. Son enfermedades que requieren exploraciones complementarias complejas para el diagnóstico definitivo. A pesar de que las adquiridas son muchos más frecuentes, hasta 1981 las inmunodeficiencias congénitas eran las que atraían más interés, sobre todo por la información que podía obtenerse sobre la organización y funcionamiento del aparato inmune normal. Pero a partir de la iniciación de la epidemia del Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida (SIDA) la atención en el mundo se ha reorientado y hoy son las formas adquiridas, y muy especialmente el SIDA, las que se estudian con mayor interés por la característica infecciosa de esta enfermedad, la forma como se trasmite y el impacto que produce en la sociedad (1,2).

El SIDA tiene como base fundamental la destrucción de algunas de las células importantes que intervienen en la reacción inmunológica normal y que en dependencia del nivel de destrucción de estas células, se desarrolla una sintomatología muy variada en el paciente, por lo que es necesario conocer mediante técnicas inmunológicas las características de la enfermedad en cada individuo. Según la fase de infección, unas técnicas de diagnóstico pueden tener mayor utilidad que otras. Así durante la infección primaria los métodos directos son más útiles para saber si una persona está infectada. Pasada la infección primaria y hasta el final de la enfermedad, se utiliza como método diagnóstico y de seguimiento la prueba de determinación de anticuerpos frente al Virus de Inmunodeficiencia Humana (VIH) y la determinación de las subpoblaciones linfocitarias en la sangre de la persona infectada.

El desarrollo de la biotecnología de Anticuerpos Monoclonales conjugados con diferentes fluorocromos ha propiciado grandes avances en el diagnóstico y seguimiento de estos pacientes, a través de la Citometría de Flujo, al punto que se ha establecido como un hecho obligado por la Organización Mundial de la Salud (OMS), el empleo de esta técnica como método de rutina en esta enfermedad (3). Para llegar al desarrollo actual de los procesos biotecnológicos ha sido necesario el perfeccionamiento, la intensificación y la automatización de las biotecnologías tradicionales, lo que ha

contribuido a la aparición de nuevos procedimientos biotecnológicos y por tanto al desarrollo de esta industria. En la actualidad el desarrollo de las biotecnologías es prometedor, ya que contribuyen al mejoramiento de las terapéuticas, al desarrollo de la bioquímica celular, la biología molecular y de la inmunología, así como a la Innovación Tecnológica en diferentes ramas de las ciencias biológicas.

El análisis de subpoblaciones linfocitarias en sangre periférica se utiliza para evaluar el estado inmunológico de los pacientes. En la infección por el VIH es necesario mantener la evaluación periódica de los valores de linfocitos CD3, CD4, CD8 como células importantes que participan en la reacción inmunológica y que aportan información para conocer el estado clínico y el pronóstico de los pacientes.

El mantenimiento del estudio diagnóstico y evolutivo de esta enfermedad es muy complejo por la diversidad de reactivos o juegos diagnóstico, así como métodos para su estudio. Además tiene el inconveniente de alto costo de estos reactivos a emplear (anticuerpos conjugados) que hace difícil el mantenimiento de los medios diagnósticos para esta enfermedad en los países en desarrollo.

A pesar de esto nuestro país ha realizado grandes esfuerzos en el diagnóstico, tratamiento y control del SIDA aplicando métodos modernos y confiables internacionalmente, como es el uso de la Citometría de Flujo, que utiliza los anticuerpos conjugados y que deben ser usados sistemáticamente con no menos de 4 determinaciones al año por paciente, como esta orientado por la OMS para este tipo de enfermedad.

Por tal motivo consideramos que la realización del presente trabajo tiene un alcance muy amplio en el Sistema Nacional de Salud, además resulta de gran impacto científico, social y económico para el país por las posibilidades que brinda, al obtener estos diagnosticadotes con la calidad requerida para su uso en el Programa de Medios Diagnósticos del MINSAP. Constituye además una tarea del Proyecto Ramal *Conjugados para su uso en el inmunodiagnóstico* de importancia para el país.

Hipótesis:

Teniendo en cuenta que LABEX posee la infraestructura tecnológica requerida, así como el personal capacitado, nos propusimos la siguiente hipótesis de trabajo:

“Es posible obtener Anticuerpos monoclonales anti CD3, CD4 y CD8 conjugados con Isotiocianato de fluoresceína, para citometría de flujo, con una calidad semejante a los ofertados por la firma DAKO, los cuales puedan ser empleados en el diagnóstico y seguimiento de los pacientes con SIDA en nuestro país”.

Con la finalidad de dar respuesta a esta hipótesis de trabajo, nos proponemos los siguientes objetivos:

Objetivo General:

Obtener anticuerpos monoclonales conjugados con FITC, que permitan evaluar a los pacientes que padecen VIH/SIDA en nuestro país.

Objetivos Específicos:

1. Desarrollar la tecnología que permita la obtención de AcM anti CD3, CD4 y CD8 conjugados FITC.
2. Establecer los procesos productivos para la obtención de AcM conjugados con la calidad requerida, comparable con los ofertados en el mercado internacional por la firma danesa Dako
3. Evaluar el funcionamiento de los AcM conjugados obtenidos, en el seguimiento de pacientes con VIH/SIDA utilizando la técnica de Citometría de Flujo.

I. REVISIÓN BIBLIOGRAFICA

Subpoblaciones linfocitarias.

El sistema inmune está formado por un conjunto heterogéneo de células que para su estudio, se dividen según su origen, o separadas en grupos según sus funciones. La clasificación de las células del sistema inmune según sus funciones, permite distinguir cuatro grandes grupos: las que reconocen y las que responden contra los antígenos (linfocitos), las que presentan antígenos o que colaboran en la respuesta de los linfocitos, que derivan de diversas células precursoras, que se encuentran en el tejido hematopoyético de la médula ósea (4).

La identificación definitiva de este conjunto tan heterogéneo de células ha sido objeto de numerosos estudios, desde hace varias décadas. En la actualidad este trabajo se ha simplificado gracias a la caracterización de las proteínas específicas en las membranas de los linfocitos que pueden ser empleadas como marcadores de las diferentes subpoblaciones basadas en los grupos de diferenciación CD (Clusters of Differentiation), los cuales son propios y específicos para cada tipo de población celular (5, 6). Cada tipo de linfocito T maduro, lleva un marcador conocido como grupo de diferenciación linfocitario CD3, CD4 o CD8. Hannet (7) y Gougeon (8) describieron en los pacientes con inmunodeficiencias, niveles de células blancas en sangre disminuidas de manera significativa, sobre todo los linfocitos CD4 los cuales se han identifican por medio de anticuerpos monoclonales específicos.

Anticuerpos Monoclonales.

Los AcM fueron descubiertos en 1975 por los científicos Kohler y Milstein (9), quienes inmortalizaron los linfocitos B, al fusionarlos con células de mieloma y obtener los hibridomas productores de anticuerpos monoclonales con alto nivel de especificidad. En la actualidad, los anticuerpos monoclonales constituyen una herramienta valiosa de la Inmunoematología y son utilizados tanto con fines terapéuticos (antinfeciosos, inmunosupresores, anticancerosos, etc), como diagnósticos mediante imágenes inmunogammagráficas (10). Su uso comercial en pruebas diagnósticas se remonta a 1981, en que se desarrollaron gran diversidad de sistemas de inmunoensayos como el ELISA y el RIA, existiendo hoy día más de cien pruebas específicas de diagnóstico "*in vitro*" para microorganismos, hormonas, toxinas, medicamentos, drogas, pesticidas y células tumorales.

Una de las enfermedades de inmunodeficiencia que en la actualidad tiene gran importancia desde el punto de vista epidemiológico (3) y que necesita de grandes recursos de salud para su prevención, diagnóstico y estudios de seguimiento es el SIDA, el cual es causado por el VIH, que destruye o altera las células del sistema inmune, el cual pierde progresivamente la capacidad de defensa contra las infecciones y ciertos tipos de cáncer que aparecen en el organismo. Después que el virus entra en el organismo, éste va siendo reconocido como antígeno por el sistema inmunológico. Por su incidencia en la población esta enfermedad constituye un grave problema social por la marginación y exclusión a que son sometidos estos pacientes en el mundo y por lo costoso del largo y complejo tratamiento a que deben ser sometidos.

Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida.

El VIH es el virus causante del SIDA, es miembro de la familia de los Retrovirus y de la subfamilia de los Lentivirus, presenta una cubierta externa y un mensaje genético compuesto por ARN, también una enzima (reversotranscriptasa) que convierte el Ácido Ribonucleico (ARN) del virus a Ácido Desoxirribonucleico (ADN) en la célula hospedera. La membrana celular está formada por una capa bilipídica donde están glicoproteínas: gp 120 y gp 41, las cuales se unen al receptor CD4 (sitio de anclaje) de los linfocitos que constituyen una de las células dianas. Dentro de esta membrana está la nucleocápsida compuesta por la proteína p17 y dentro de unidades de proteína p24.

El virus introduce su material genético a la célula por medio de la enzima reversotranscriptasa, lo cambia a ADN, quedando esta información guardada en el núcleo celular. De esta manera, la célula hospedera, cada vez que reciba estímulos de replicación, se convierte en una verdadera fábrica de nuevos virus, que van a infectar nuevas células y progresivamente, el sistema inmune se va debilitando y produciendo las diferentes manifestaciones clínicas (11, 12, 13). La historia de la enfermedad se basa en la relación de los niveles de antígenos y anticuerpos con el momento en que aparecen las diversas formas de manifestaciones clínicas en estos pacientes, en dependencia de la vía de entrada del virus por las mucosas o por vía sanguínea.

La epidemia del VIH/SIDA mantiene un incremento alarmante a nivel mundial, según estimados recientes del Programa Conjunto de las Naciones Unidas (ONUSIDA) y la OMS actualmente existen aproximadamente más de 40 millones de personas que viven con esta infección y unos 22 millones de personas han fallecido a causa del SIDA (1). Esto indica que la epidemia del SIDA todavía está fuera de control.

Para poder estandarizar los protocolos de investigación y tratamiento de estos pacientes la Organización Mundial de la Salud hizo una clasificación de la infección en 1993 (11, 14). La importancia de esta clasificación radica en que para realizar estos estudios y determinar cuándo empezar con algún tratamiento es necesario tener algunos criterios universales determinados por dos parámetros fundamentales como son: a) los aspectos clínicos de la persona y b) *el conteo de las células CD4 que determinan las defensas*, y nos ofrece un indicador seguro sobre la situación inmunitaria de la persona afectada con VIH, lo que permite tomar conductas terapéuticas adecuadas y hacer variaciones en el tratamiento de forma objetiva.

En 1993 la definición del SIDA ofrecida por el Centro de Control de Enfermedades de Atlanta (CDC), incluye a todas las personas positivas del VIH que presenten menos de 200 células T CD4 en sangre periférica, (adultos sanos presentan 800 o más) (1).

En nuestro país hasta el 31 de diciembre del 2003 se habían detectado un total de 5,257 personas infectadas por el VIH, desarrollando la enfermedad 2,330, de las cuales han fallecido 1,116 personas por esta causa (3), de allí la necesidad de mantener los recursos necesarios para el estudio evolutivo o de seguimiento de estos pacientes, como son los reactivos conjugados Anti CD3, CD4 y CD8 para la determinación de las subpoblaciones linfocitarias utilizando la tecnología moderna de Citometría de Flujo (CMF), con altos precios en el mercado internacional. El conteo absoluto de linfocitos T CD4 positivos (T cooperadores), continua siendo uno de los parámetros de laboratorio obligado para las decisiones en el tratamiento y seguimiento de estos pacientes (15, 16).

El Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kourí" (IPK) posee la tecnología de Citometría de Flujo para la evaluación y seguimiento de los pacientes con VIH/SIDA en Cuba, que entre sus ventajas se encuentran: la exactitud, precisión, rapidez y capacidad para procesar un gran número de muestras en poco tiempo, con el inconveniente económico de que el equipo, su mantenimiento y reactivos a utilizar son muy costosos, por estas razones solo tres centros en el país lo poseen.

Citometría de Flujo.

La CMF (17, 18) internacionalmente representa un avance en el proceso de contar y medir el tamaño de partículas o células en poblaciones no homogéneas, con contadores celulares automatizados llamados Citómetros de Flujo. Se define como Citómetro de Flujo al aparato que es capaz de medir características, componentes y propiedades de células ó partículas biológicas que fluyen en suspensión, marcadas por colorantes

fluorescentes (fluorocromos) que son capaces de excitarse con una fuente luminosa de alta energía. Esta excitación ocurre en el punto de interacción de la célula y el haz lumínico, dando como resultado la emisión de una luz de longitud de onda superior a la incidente. La posibilidad de emplear múltiples fluorocromos, unidos a enzimas, anticuerpos u otro elemento capaz interactuar con alguna estructura celular y que sean excitables con una fuente de luz única, permiten medidas fluorescentes simultáneas de varios parámetros de una sola célula. Estas señales eléctricas analógicas son convertidas en señales digitales y procesadas por un ordenador, con el fin de generar mapas de puntos o histogramas correlacionados con los parámetros deseados y efectuar el análisis de los mismos.

El Citómetro de Flujo tiene **la posibilidad** caracterizar e incluso separar las diferentes poblaciones linfocitarias “in vitro” mediante el uso de anticuerpos monoclonales que reconocen a los receptores específicos de superficie de las diferentes subpoblaciones celulares que se deseen estudiar, marcados con un fluorocromo. Hoy día se pueden emplear varios anticuerpos marcados con diversos fluorocromos a la vez, y por tanto estudiar diferentes subpoblaciones celulares en la misma muestra de linfocitos. Para llevar a cabo el estudio, puede utilizarse sangre completa, ya que los modernos citómetros permiten trabajar con sangre total o la población linfocitaria separada de la sangre.

Las ventajas que proporciona la CMF frente a otros métodos que emplean fluorocromos incluyen la elevada sensibilidad y velocidad de análisis, así como la posibilidad de realizar mediciones simultáneas sobre una sola célula y su separación según las características deseadas. A diferencia de otras técnicas, el citómetro de flujo mide características celulares individuales de un gran número de células y además, permite medir características de poblaciones concretas en muestras heterogéneas (19, 20).

Los fluorocromos son moléculas químicas que absorben la luz a una determinada longitud de onda y emiten a otra diferente (18). Se caracterizan por sus espectros de excitación y de emisión, por lo que su utilización está condicionada por el tipo de láser del que disponga el citómetro y de la longitud de onda a la que se exciten ellos mismos. El espectro de excitación y emisión varía con los diferentes fluorocromos. Las propiedades ideales de un fluorocromo son: a) alto coeficiente de extinción a la longitud de onda de excitación, b) alto rendimiento cuántico, c) elevada fotoestabilidad, d) corto estado de excitación. La molécula a la que va ser unido el fluorocromo debe ser insensible a cambios de pH, polaridad y microambiente.

AcM conjugados para Citometría de Flujo.

En la tecnología de CMF los anticuerpos monoclonales están unidos con los fluorocromos en forma de conjugados (anticuerpo + fluorocromo), siendo la intensidad de fluorescencia que detecta el Citómetro, directamente proporcional al número de moléculas del conjugado unidas al antígeno.

Los fluorocromos utilizados en CMF (Anexo1) ofrecen un método sensible para obtener información acerca de la estructura, función y vitalidad de las células objeto de estudio. Cuando el fluorocromo va unido a un anticuerpo monoclonal (conjugado), este le confiere especificidad de marcaje, y debe ser insensible a cambios de pH, polaridad y microambiente, el colorante que más se utiliza internacionalmente es el Isotiocianato de Fluoresceína (FITC), aunque se han descrito otros como la rodamina, rojo texas, cianinas y ficoeritrina (18). El fluorocromo que se conjuga al anticuerpo actúa como un simple marcador con el que se pueden marcar distintos anticuerpos. El FITC es una molécula orgánica pequeña, y se conjuga típicamente a las proteínas vía aminas primarias. Normalmente a cada anticuerpo se conjugan de 3 a 6 moléculas de FITC; mayor cantidad de uniones pueden producir problemas de solubilidad (21, 22, 23, 24).

Los conjugados como reactivos biológicos constituyen en la actualidad una de las herramientas indispensables para la confirmación del diagnóstico y evolución de las enfermedades de causa inmunológica, son múltiples los productos de este tipo que se ofertan en el mercado internacional por diferentes firmas comerciales dedicadas a la distribución de estos productos biotecnológicos en todo el mundo, bajo la clasificación de diagnosticadores para uso in Vitro (17). Un requisito indispensable para la producción de un diagnosticador es la demostración de que sus características funcionales responden al propósito para el cual fue diseñado (25).

En la siguiente tabla A se exponen productos que se ofertan actualmente por diversas compañías, destinados a la evaluación y seguimiento de Inmunodeficiencias, los cuales en su mayoría están diseñados para Citometría de Flujo con diferentes presentaciones:

Tabla A. Conjugados ofertados por compañías internacionales, para su uso en CMF.

Compañía/País	Producto	Uso
Becton Dickinson,	AcM Conjugados p/Citometria de Flujo.	Inmunodeficiencias

EE.UU.,	Presentación: frascos de 100 determinaciones	
COULTER, EE.UU.,	AcMs Conjugados p/ Citometria de Flujo. Presentación: frascos de 50- 100 determinaciones	Inmunodeficiencias
HARLAN, EE.UU.,	AcMs Conjugados p/ Citometria de Flujo. Presentación: frascos de 25-50 determinaciones	Inmunodeficiencias
SEROTEC, EE.UU.,	AcMs Conjugados p/ Citometria de Flujo. Presentación: frascos de 100-200 determinaciones	Inmunodeficiencias
BIODESIGN INTERNATIONAL, EE.UU.,	AcMs Conjugados p/ Citometria de Flujo. Presentación: frascos de 150 determinaciones	Inmunodeficiencias
O.E.M. EE.UU.,	AcMs Conjugados p/ Citometria de Flujo. Presentación: frascos de 200 determinaciones	Inmunodeficiencias
DAKO, DINAMARCA	AcMs Conjugados p/ Citometria de Flujo. Presentación: frascos de 100 determinaciones	Inmunodeficiencias
SIGMA, EE.UU.,	AcMs Conjugados p/ Citometria de Flujo. Presentación: frascos de 200 determinaciones	Inmunodeficiencias

AcM – Anticuerpo Monoclonal

II. MATERIAL Y METODO.

Para la realización del presente trabajo se utilizaron los hibridomas C9G10 para el Anti CD3, 93/24/51 para el Anti CD4 y F18/71/12 para el Anti CD8, los cuales después de expandidos en cultivo celular fueron inoculados en ratones Balb/c adultos de 22-25 grs. con una concentración de 2 millones de células por animal, obteniéndose el Líquido Ascítico Murino (LAM) a partir de los 7 a 15 días después de la inoculación. El LAM obtenido se somete a centrifugación a 2 000 x g por un tiempo de 20 min, para separar las células y algunos elementos que permanecen en suspensión. Luego se filtra por gravedad para pasar seguidamente al proceso de purificación. A partir de este momento el proceso continúa con una serie de pasos que se describen a continuación:

II.1 Purificación de anticuerpos monoclonales a partir de LAM.

La purificación de los anticuerpos se realizó partiendo de 10 mL de LAM por cromatografía de afinidad en una columna C10/10 Pharmacia, utilizando una matriz de Proteína A-Sepharosa CL4B, con solución reguladora de pH glicina 3mM y Cloruro de Sodio 1,5 Mm y pH de 8.9, se eluyó con tampón citrato 0.1 mM, (pH 5 para anti CD3 y anti CD8; pH 4 para el anti CD4), con cambio posterior de pH (a 7.2) mediante cromatografía de filtración en gel en Sephadex G-25 (26, 27, 28), para lo que se utilizó una columna de 25 cm de largo y 1 cm de diámetro, empleando un equipo de cromatografía líquida de baja presión LKB Pharmacia.

Después de purificados se determinó la concentración de los AcMs mediante lecturas de unidades de absorbancia a λ 280 nm, en un Espectrofotómetro UV/Visible Ultrospec 1000 Pharmacia Biotech. La pureza se determinó mediante electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) al 12,5 % en condiciones no reductoras (29), utilizando un sistema de electroforesis vertical Pharmacia LKB, con patrón comercial SIGMA. De esta manera se obtiene un AcM con un alto grado de pureza.

II.2. Conjugación con Isotiocianato de Fluoresceína.

II.2.1. Preparación de los reactivos para la conjugación.

Se ajustaron las condiciones de concentración y de pH de los anticuerpos en un rango de 5 a 10 mg y 9,5 respectivamente para la conjugación con FITC, este último se diluyó en 500 μ l de dimetilsulfóxido y teniendo en cuenta la relación FITC / PROTEINA (F/P) = 8, para

lo que se determinaron las concentraciones molares del anticuerpo y del FITC necesarias, descritas en los trabajos de Gavilondo (30). y Roederer (21).

II.2.2 Mezcla FITC con Anticuerpo.

Para la mezcla se coloca un frasco ámbar conteniendo el anticuerpo sobre un agitador magnético, agitando lentamente al mismo tiempo que se le añade gota a gota y manteniendo la agitación constante, la solución de FITC en Dimetilsulfóxido.

II.3 Purificación de los conjugados.

La purificación de los conjugados se realizó en una columna PD-10 (Pharmacia) por filtración en gel utilizando una matriz de Sephadex G-25 y un tampón fosfato salino, pH 7,2-7,4 para eliminar las moléculas de la mezcla que no se conjugaron. Se tomaron las primeras cinco fracciones eluidas. Luego se determinó la efectividad de las conjugaciones mediante dos lecturas en unidades de absorbancia (280 nm y 495 nm) a cada una de las fracciones y se le determinó además la relación F/P. Se seleccionaron aquellas fracciones con valores de F/P de los conjugados entre 3 y 8 (21, 31). La relación fluorocromo/proteína se determinó mediante la siguiente fórmula (24, 30, 32):

$$F/P = \frac{2.87 \times A_{495nm}}{A_{280nm} - 0.35 (A_{495nm})}$$

Donde:

F/P	Relación FITC/Proteína
A 495nm	Absorbancia a 495nm
A 280nm	Absorbancia a 280nm.

II.4 Determinación de la actividad biológica del conjugado.

Para la determinación de la actividad biológica en las muestras de conjugados después de su purificación se enviaron al Departamento de Control de la Calidad del Centro de Inmunología Molecular con la finalidad de ser evaluados mediante la técnica de citometría de flujo, la cual describiremos brevemente. Para el análisis de las muestras se tomaron 100 µL de la sangre humana total en un tubo Falcon. Se prepara la cantidad de tubos teniendo en cuenta las cantidades de muestras de conjugados a analizar, así como las diluciones y controles necesarios (positivos y negativos). A continuación se añaden en tubos diferentes 20 µL de la dilución del conjugado a ensayar y del conjugado de referencia. Se agitan los tubos utilizando el Vortex para que la sangre se mezcle completamente con los AcMs conjugados a la dilución ensayada. Se incuba durante 30 min. a 4 °C. Luego se añade a cada tubo 2 mL de la solución lisante Facs Flow de la

firma Becton Dickinson. Esta solución se incubó en la oscuridad durante 10 min, agitándola cada 2 ó 3 min en el Vortex. Se centrifuga a 1200 x g durante 5 min a 4 °C y se desecha el sobrenadante. Para continuar se añaden 2ml de la solución de Facs Flow y se centrifuga a 1200 x g durante 5 min. a 4 °C y se desecha el sobrenadante. (esta operación se repite más de dos veces). Se añaden 200 µL de Facs Flow y se agita suavemente. Finalmente se realizan las lecturas de las muestras en el Citómetro de Flujo marca FACScan de Becton Dickinson y se aplica el programa CellQuest utilizando la plantilla específica para linfocitos obteniéndose los resultados finales de la lectura y se determina el % de reconocimiento respecto al conjugado de referencia. Los resultados obtenidos a partir de las muestras se comparan con los Límites de Aceptación definidos internacionalmente como rangos normales de linfocitos en sangre periférica. A partir de los resultados obtenidos con las muestras y los conjugados a diferentes diluciones, se toma como criterio aceptable de actividad biológica aquellas muestras que *cumplen con los rangos normales* de linfocitos en sangre periférica y que posean un % de reconocimiento *por encima del 90 %* con respecto al obtenido con el reactivo control o comercial de referencia, que en el caso del control utilizado fue de una concentración $\leq 10 \mu\text{g/mL}$. Se selecciona como adecuada aquella dilución de trabajo que cumpla con los dos requisitos anteriormente mencionados. Como controles de referencia positivos se usaron los AcMs anti CD3, CD4 y CD8 de la firma Dako, mientras que para el control negativo se emplearon los linfocitos resuspendidos en solución de Facs Flow.

II.5 Formulación y Envase.

Para la formulación se toma como base el purificado anterior, al cual se le añaden los componentes (Solución de Azida sódica al 20 %, Albúmina Sérica Bovina al 30 %, Solución Buffer Fosfato Salino (PBS), pH 7,2-7,4) de manera que la concentración del preservó y el estabilizador en el formulado final corresponda al 0.1 % respectivamente para este reactivo, proporciones que garantizan su durabilidad y estabilidad necesarias para su uso, al cual se le realiza la determinación de la actividad biológica.

II.6 Establecimiento del Proceso de obtención de los conjugados.

Después de obtenido el reactivo hasta su envase y presentación final, se estableció el proceso de obtención de los conjugados, el cual se basó en la elaboración de numerosos documentos que posibilitan la reproducibilidad de los resultados obtenidos durante la investigación.. Además se realizaron los cinco lotes de consistencia de cada tipo de reactivo, utilizando los documentos antes mencionados.

En esta etapa se confeccionaron los Procedimientos Normalizados de Operación (PNO), Registros Maestros de Producción, Registros de Calidad, Especificaciones, Literatura interna y el Expediente Maestro de producción, siguiendo lo establecido para este tipo de biodiagnosticador (25, 33, 34).

II.7 Estudio de Estabilidad.

Para el estudio de estabilidad se tomaron tres de los cinco lotes obtenidos para el estudio de consistencia, de acuerdo a las exigencias regulatorias para estos productos (35) como se muestra a continuación:

Anti CD3-FITC			Anti CD4-FITC			Anti CD8-FITC		
Lote 1	Lote 2	Lote 3	Lote 1	Lote 2	Lote 3	Lote 1	Lote 2	Lote 3
060201	060202	060301	070201	070202	070301	080201	080202	080203

Siguiendo los requisitos de Calidad del producto envasado, la estabilidad real se estimó mediante el análisis de la actividad biológica tomando como indicador el % de reconocimiento del reactivo, según los siguientes métodos de ensayos:

Requisitos de Calidad	Métodos de ensayo	Límites de aceptación
Actividad Biológica	Procedimiento para realizar el conteo de CD3, CD4 y CD8 por citometría de flujo	Reconocimiento de diferentes linfocitos en sangre periférica: CD3 59 y 84 %. CD8 15 y 39 %. CD4 33 y 59 %.
Relación FITC/Proteína	Espectrofotométrico	De 3 a 8
Características organolépticas	Inspección visual.	Líquido amarillo claro, transparente y sin presencia de partículas sólidas insolubles.
Integridad de la formulación	Electroforesis Determinación del pH	Presencia de las bandas iniciales Mantenimiento del pH igual al inicial

Para verificar la estabilidad y duración de los requisitos de Calidad se tomaron 20 frascos por lotes de forma aleatoria y se almacenaron a una temperatura estable de 2 a

8 ° C y se siguió el siguiente cronograma:

MES	PRUEBA A REALIZAR	LEYENDA
0	1, 2, 3, 4, 5	1. Actividad biológica 2. Electroforesis 3. Determinación de pH 4. Relación F/P 5. Inspección Visual
1	1	
2	1	
3	1	
4	1	
5	1	
6	1, 2, 3, 4, 5	
7	1	
8	1	
9	1	
10	1	
11	1	
12	1, 2, 3, 4, 5	

II.8 Evaluación de los conjugados en donantes sanos y en pacientes con VIH.

Para evaluar el funcionamiento de los conjugados obtenidos en el presente trabajo, se compararon los resultados del marcaje de los mismos con respecto a los patrones internacionales de la DAKO en 169 individuos, de ellos 59 pacientes con VIH/SIDA y 110 seronegativos aparentemente sanos (serología negativa, no VIH, no antígenos de hepatitis). Para la cuantificación mediante la CMF se utilizó la técnica descrita en el aspecto II.4 correspondiente a la determinación de la actividad biológica.

Para la comparación de los reactivos obtenidos con los de la casa comercial DAKO, se calcularon los estadígrafos: media (X), desviación estándar (DE), coeficiente de variación (CV). Las medias para cada reactivo se compararon mediante la prueba de t de Student para muestras pareadas.

III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El proceso de purificación para cada tipo de anticuerpo estudiado comienza con la preparación del LAM obtenido previamente clarificado. Durante el proceso de purificación se observó que los perfiles cromatográficos obtenidos en cada uno de los anticuerpos se comportaron de forma muy similar, donde se aprecia la separación de las diferentes moléculas presentes en el LAM de partida (fig.1), durante la etapa fundamental del proceso de purificación por cromatografía de afinidad, que coincide con lo descrito por los laboratorios de Separación de Proteínas de la firma Pharmacia (27).

La purificación de los anticuerpos monoclonales a partir del LAM obtenido fue exitosa, exhibiendo un alto nivel de pureza. ya que, la electroforesis realizada a cada uno de los anticuerpos mostró banda única en la zona de los 150 KDa (fig.2), significando la presencia de un solo tipo de proteína, lo que demuestra la pureza de las moléculas utilizadas en la conjugación y confirma que el método de purificación seleccionado es adecuado para estos fines.

La determinación de la eficiencia del proceso de purificación fue muy similar en todos los casos como se muestra en la Tabla 1, donde el rendimiento osciló entre 89,7 % y 96,1 %, valores que se comportan de forma similar a los reportados en la literatura (27).

El nivel de eficiencia de la conjugación del purificado (IgG) con el fluorocromo quedó demostrada al obtenerse un valor F/P de 4,5 para el anti CD3-FITC, 4,2 para el anti CD4-FITC y 5,3 para el anti CD8-FITC, todos dentro del rango de valores seleccionado para la F/P, descritos en la literatura por Roederer (21), Sigma (30), Dako (36). Sin embargo Gavilondo en 1995 (30) plantea como valores óptimos para la relación F/P de 1 a 4, al respecto consideramos que este autor en su artículo se refiere a la conjugación con FITC para otros fines y no para su uso en Citometría de Flujo, téngase en cuenta que las concentraciones utilizadas por este autor en el proceso de conjugación son menores a las que reportan la mayoría de los autores en trabajos similares. Es posible que en nuestro caso, así como los autores tomados por nosotros como referencia los conjugados para uso en Citometría de Flujo necesiten una mayor relación de F/P para su funcionamiento eficiente en este tipo de tecnología.

Otro parámetro que permite conocer las características de los conjugados obtenidos es la electroforesis, en la misma aparecen solo 2 bandas, una en la zona del estabilizador utilizado en la formulación (BSA) y otra ligeramente por encima de los 150 KDa (Fig.3)

lo que confirma la calidad de los conjugados obtenidos y por tanto demuestran que las cantidades tomadas para la conjugación son exactas.

Luego de la obtención de los conjugados con resultados satisfactorios evidenciados por los valores de F/P y la presencia de solo 2 bandas en la electroforesis, con una dilución óptima de trabajo de 1/1000 para el Anti CD3, 1/1500 para el Anti CD4 y 1/1250 para el Anti CD8, se consideró que a partir de los resultados obtenidos hasta el momento era posible continuar con la etapa de formulación y envase, como parte del desarrollo del proceso de obtención de los reactivos y conseguir los objetivos propuestos. Después de envasado “listo para el uso” con la dilución de trabajo recomendada, se determinó el porcentaje de reconocimiento, cuyos valores para cada uno de los conjugados se mantuvieron dentro de los límites apropiados para estos tipos de reactivos, con lo que se confirma que cumplen con los requerimientos de Calidad exigidos.

La documentación elaborada durante todo el desarrollo de la investigación se organiza de manera que, cumpla con los requerimientos para la elaboración documental y el establecimiento del proceso productivo.

Como se puede apreciar (Tabla 2), la variedad y cantidad de documentos confeccionados están encaminados a garantizar que los resultados obtenidos en la parte investigativa sean reproducibles en la parte productiva, cuestión que queda demostrada a través de los lotes de consistencia.

Según las etapas previstas en el desarrollo de proyectos de investigación relacionados con la obtención de productos biotecnológicos, después de los resultados descritos anteriormente se impone la realización de 5 lotes llamados de Consistencia que permitan demostrar la repetibilidad en nuevos lotes de cada uno de los conjugados obtenidos, que presenten en todos los casos las mismas características finales del reactivo, o con un rango de desviación aceptable.

En la fig. 4 se muestran los resultados de la relación F/P en cada uno de los Lotes de Consistencia para cada tipo de conjugado. Como se puede observar en todos los casos los valores de F/P se encuentran dentro del rango permitido de 3 a 8, con poca diferencia entre los lotes en cada uno de los conjugados. Los valores correspondientes se expresan en la tabla 3.

La fig. 5 muestra el comportamiento de la actividad biológica de los diferentes lotes de consistencia, la cual se comporta dentro de límites normales por debajo de 10 $\mu\text{g/mL}$. Puede observarse que los diferentes lotes en cada tipo de conjugado se mantienen con

pocas fluctuaciones. Las cifras correspondientes a la actividad biológica se encuentran en la tabla 3.

A partir de los lotes de consistencia se tomaron aleatoriamente 3 lotes de cada conjugado para el estudio de estabilidad. Este estudio consta de análisis periódico del pH, relación F/P, actividad biológica, electroforesis e inspección visual de los conjugados en las condiciones de conservación requeridas para este tipo de preparado biológico.

En la tabla 4 se muestran los resultados de las variaciones del pH y la relación F/P en el tiempo que duró el estudio de estabilidad. Como se puede apreciar de forma general tanto el pH como la relación F/P no tuvieron variaciones de consideración en el período de un año en ninguno de los 3 lotes de cada conjugado.

Como parte del estudio de estabilidad se determina la actividad biológica de los lotes objeto de investigación, comparándola con la actividad biológica de un reactivo similar de una firma comercial que se utiliza como patrón, los resultados se expresan en por ciento, ya que, se compara el nivel de actividad de los conjugados obtenidos en el presente trabajo con el del reactivo utilizado como patrón. Las figuras 6, 7 y 8 muestran los mapas de punto del ensayo comparativo por Citometría de Flujo, del reconocimiento de los AcMs conjugados comparados con el conjugado patrón. Los círculos muestran el valor del reconocimiento en % de células positivas. Es evidente la gran similitud del comportamiento de las nubes entre los conjugados obtenidos en el presente trabajo (C) y los utilizados como referencia de la firma DAKO (D).

Las tabla 5, 6 y 7 contienen las cifras correspondientes al estudio de estabilidad de la actividad biológica de los lotes de conjugados estudiados durante un año. Se puede apreciar que en todos los casos los valores de marcajes correspondientes a la columna "B" de cada lote se encuentran por encima del 90 % al comparar los resultados obtenidos en "A" (conjugado estudiado) con el patrón, lo que indica que no ha ocurrido un deterioro de las características funcionales de los conjugados objeto de estudio. La integridad de los componentes de los conjugados durante el tiempo, se estudia además a través de electroforesis en gel de poliacrilamida (fig. 9, 10 y 11), donde se puede apreciar que los reactivos no tuvieron degradación, ya que no aparecieron nuevas bandas, lo que evidencia la estabilidad del formulado y por tanto la no aparición de otras moléculas contaminantes. Lo anteriormente expuesto demuestra que los conjugados obtenidos mantienen las características del producto intacto por un tiempo de un año.

Para evaluar el funcionamiento de los conjugados obtenidos, se diseñó un estudio con individuos sanos y pacientes con VIH/SIDA, y se compararon los resultados en términos de porcentaje de reconocimiento, utilizando los conjugados obtenidos, así como el reactivo patrón comercial DAKO, mediante la técnica de Citometría de Flujo en los 169 individuos, de ellos 59 pacientes con VIH/SIDA y 110 seronegativos.

Los resultados del estudio confirman que ambos grupos tanto en los individuos sanos (Tabla 8), como en los enfermos (Tabla 9) no tienen diferencia ($p \geq 0.05$) y por tanto la existencia de similitud en el desempeño de los reactivos anti-CD4-FICT, anti-CD8-FICT y anti-CD3-FITC obtenidos en nuestro trabajo y los obtenidos con el reactivo de la firma DAKO. Lo anterior significa que los conjugados estudiados permiten mantener la especificidad y la sensibilidad adecuadas de acuerdo con el método aplicado.

Las características mencionadas anteriormente fueron demostradas en las muestras de pacientes en que los conjugados detectaron casos de pacientes con muy bajos porcentajes de CD4, en un grupo de pacientes infectados (Tabla 9 A2). Como se conoce, tras la infección primaria y debido a una intensa replicación viral, se produce una caída importante de las células CD4+; algunos pacientes mantienen cifras bajas, lo que es un indicador de mal pronóstico. Sin embargo Nickolson (37) ha descrito en algunos pacientes el llamado fenómeno de rebote, en que se produce un incremento de los CD4 en la misma fase descrita para los casos en que ocurre lo contrario. Uno de los factores asociados a este proceso es la respuesta de los linfocitos T CD8+, pues al parecer participan en el control inicial de la replicación viral. Coincidentemente, el mismo grupo CD8 de los infectados, mostró las más altas concentraciones de estas células (Tabla 9 A3).

Finalmente, uno de los aspectos importantes de cualquier investigación que termine en la obtención de un producto es, no solo el impacto científico técnico, sino en la esfera social y económica. Esto último puede resultar invalidante para introducir el resultado en la industria y que llegue a cumplir el objetivo para el que fue realizado, fundamentalmente por problemas financieros, aún a pesar de las posibles ventajas que del resultado deben recibirse. Los anexos 2 y 3 demuestran las posibilidades de la aplicación y avalan la calidad de los conjugados obtenidos durante la realización del presente trabajo.

Al evaluar los beneficios económicos obtenidos como resultado de la introducción de estos reactivos en el mercado nacional, se tuvo en cuenta los costos de producción de los conjugados fluorescentes de AcMs, para su uso en citometría de flujo. Estos

conjugados constituyen uno de los reactivos esenciales más costosos en el inmunofenotipaje.

Valoración Económica

Para conocer las posibles ventajas desde el punto de vista económico se determinó el costo de producción de estos conjugados, apoyados en los asesores económicos de la Consultoría Económica CANEC, S.A. contratados para la realización de esta tarea, durante la realización del proyecto de investigación, así como la comparación con productos similares existentes en el mercado internacional con estos fines.

El precio de un frasco de conjugado de anti-CD3, CD4, CD8-FITC de 100 determinaciones, se comercializa por DAKO AG entre 300 y 400 USD, cada uno; estos reactivos producirlos en LABEX con las mismas características de calidad, presentación y uso, tienen un costo de 10,30 USD y 5.85 MN cada uno. El país tiene actualmente una demanda anual de 24 000 determinaciones, que representan una cantidad de frascos de cada uno de los conjugados que totalizan frascos.

Al comparar el costo de producción para las necesidades del país (7 416 USD y 4 212 MN) con los gastos necesarios para comprarlos (288 000 USD), es evidente las ventajas de su producción nacional, teniendo un ahorro anual por sustitución de importación de unos 276 372 USD aproximadamente. Esta sería la forma en que se traducen los resultados de este trabajo desde el punto de vista económico

IV. CONCLUSIONES

1. Se logró desarrollar una tecnología para la obtención de AcM conjugados con FITC, para su uso en Citometría de Flujo..
2. Se demostró que el proceso productivo establecido es consistente para la obtención de conjugados FITC anti CD3, CD4 y CD8 con calidad comparable a los existentes en el mercado internacional.
3. La evaluación del funcionamiento de los conjugados obtenidos, comprobó que son útiles para el diagnóstico y monitoreo de las subpoblaciones linfoides T CD4 + y CD8 +, CD3+ en las personas infectadas por el VIH/SIDA, así como en individuos que requieran una evaluación del sistema inmunológico.

V. RECOMENDACIONES.

- 1.- Que estos reactivos conjugados sean empleados para el control sistemático de los pacientes con SIDA o inmunodeficiencias adquiridas.
- 2.- Continuar las investigaciones en este campo con la finalidad de obtener anticuerpos monoclonales conjugados con diferentes fluorocromos tales como: la ficoeritrina, rodamina o Rojo Texa.
- 3.- Ampliar los estudios de conjugación de los Anticuerpos monoclonales y policlonales con enzimas, que permitan al país contar con juegos diagnóstico útiles en los departamentos de anatomía patológica y laboratorios de Inmunología.

VI. BIBLIOGRAFIA

1. Informe sobre la epidemia mundial del VIH/SIDA. Ginebra. ONUSIDA / OMS. Diciembre 2003:3- 8.
2. Horsburgh C Epidemiology of mycobacterial diseases in AIDS. En: Mycobacteria and AIDS: epidemiological and genetic markers, virulence factors and interactions with the immune system. Paris. Res. Microbiol. 1992;143:372-375
3. Pérez F Epidemiología. En: Conociendo sobre VIH. Manual para Médicos de la Familia y personal de salud de Cuba. Cuba. Ed. Centro Nacional de Prevención de ITS/VIH/SIDA, 2004:9-10.
4. Abbas A, Andrew A. Lichtman J Inmunología Celular y Molecular. 3ra Edición. Madrid. Interamericana Mc Gran Hill, 1998:35-55.
5. Las células y los antígenos CD. En: depa.pquim.unam.mx/inmuno/contenido/capi-3/CELULA-0.htm. Consultada el 14 de agosto del 2004.
6. Su sistema inmunitario. En http://www.kaletra.com/spanish/immune_system.cfm Consultada el 14 de agosto del 2004.
7. Hannel I, Erkeller Y, Lydyard P Development and malnutricional changes in human blood lymphocyte subpopulation. Immunol Today, 1992;13(6):215-8.
8. Gougeon M, Montagnier L New concepts in the mechanisms CD4+ lymphocyte depletion in AIDS, and the influence of opportunistic infections. En: Mycobacteria and AIDS: epidemiological and genetic markers, virulence factors and interactions with the immune system. Paris. Res. Microbiol. 1992;143:361-436.
9. Kohler G. y Milstein C., “Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity”. Nature. 1975;256: 495-499.
10. Ramos M. y cols. “ior-egf/r3: a murine monoclonal antibody for diagnosis of epithelial tumors. J. Radioanalytical Chemistry. 1999;240(2): 499-503.
11. Álvarez A Clínica y tratamiento del VIH/SIDA. En: Conociendo sobre VIH. Manual para Médicos de la Familia y personal de salud de Cuba. Cuba. Ed. Centro Nacional de Prevención de ITS/VIH/SIDA, 2004 :15-29.

12. AIDS Nutrition Services Alliance. Fact sheet 3: general nutrition recommendations. En: <http://www.aidsnutrition.org/fact3.shtml>. Consultada el 10 de agosto del 2004.
13. AIDS Nutrition Services Alliance. Fact sheet 4: treatment for diarrhea. En: <http://www.aidsnutrition.org/fact4.shtml>. Consultada el 20 de enero del 2005.
14. Informe sobre la epidemia mundial del VIH/SIDA. Ginebra. ONUSIDA / OMS. Diciembre, 2002: 15-17.
15. Fahey J, Taylor J, Detels R The prognostic value of cellular and serologic markers in infection with human immunodeficiency virus type 1. N Eng J Med 1990;322:166-172.
16. Reyes-Terán G, Ponce de León-R S Conteo de células T CD4+ y su uso en el manejo de pacientes con VIH-1. Rev Invest Clin 1993;45:363-370.
17. Citometría de flujo. Centro Nacional de Biotecnología. Universidad Autónoma de Madrid. En: <http://photonics.cnb.uam.es/>. Consultada el 20 de enero del 2004.
18. Citometría de Flujo. En: <http://www.udl.es/dept/medicina/sedaicmf /adn.htm>. Consultada el 20 de enero del 2004.
19. Hines M Análisis of DNA fragmentation in epidermal keratinocytes using the apoptosis detection system, fluorescein. Promega Notes Magazine, 1996;59:30-36.
20. Johson J Fluoresce Technology: a bright future. Life Science, 1997;23:3-7.
21. Roederer M Conjugation of monoclonal antibodies (August 2004). En: <http://drmr.com/abcon.htm>. Consultada el 29 de enero del 2005.
22. A Guide to Fluorescent Probes and Labeling Technologies, 10 Ed. Washington, ASM Press, 2005:100-275.
23. Albani J Absorption et fluorescence: Principes et applications, Lavoisier 2001: 3-26.
24. Nivaldo da Silva Producción y evaluación de conjugados fluorescentes para diagnostico de mancha y gangrena gaseosa. Revista de Medicina Veterinaria (Brazil). 2001; V.82, (2): 68-70.
25. Buenas Prácticas para la Producción de los Diagnosticadores, Regulación No.20-2004. Cuba. Ed. CECMED. MINSAP, 2004.
26. Gel Filtration.. Theory and Practice. En: Pharmacia Fine Chemicals. Sweeden. 1985:32-34.

27. Specific monoclonal antibody purification techniques: The use of Protein-A Sepharose. En: Separation News, Pharmacia, 1986;Vol 13.5:1-6.
28. Affinity Chromatography: "Principles and Methods", Uppsala, Sweden; Ed. Pharmacia, 1995: 20-26, 30-55.
29. Polyacrilamide gel electrophoresis of proteins and total protein in polyacrilamide gel, En: Western Blotting Technical Manual. U.K. Amersham International Plc., 1991:7-11.
30. Gavilondo J Anticuerpos Monoclonales. La Habana. Ed. Elfos Scientiae, 1995: 160-1.
31. Catálogo: Products for Life Science Research. Washington. Ed. SIGMA.FD, 2004-2005:1239-1242.
32. Nilson L Handbook of Experimental Immunology. Oxford. Ed. Blackwell Scientific Publication. 1996, Tomo 1:22-32, 120-125.
33. Información proporcionada por el fabricante con los reactivos de diagnóstico *in vitro* para uso profesional. En: Norma Internacional EN 375:2001. USA. Ed. FDA. 2001:2-4.
34. Requisitos generales para el Registro de Diagnosticadores. No.8. La Habana. Ed. CECMED. 2001.
35. Stability testing of in vitro diagnostic reagents. En: Norma Internacional EN 13640:2002. USA. Ed. FDA. 2002:1-3.
36. Catálogo: DAKO Biochemicals and Reagents. Washington. 2003-2004:1030.
37. Nicholson J Immunophenotyping of lymphocytes by flow cytometry. En: Manual of Clinical Laboratory Immunology. 6th Ed. Washington. Ed. ASM Press, 2002:137-147.

ANEXO 1

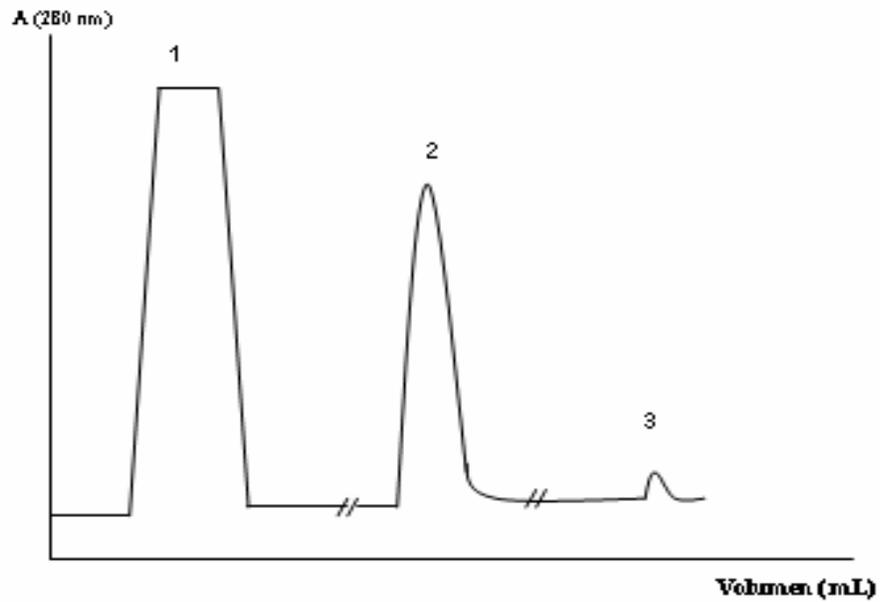
Características de los fluorocromos utilizados en CMF.

Compuesto	Absorción (max)	Emisión (max)	Compuesto	Absorción (max)	Emisión (max)
FITC-NH-Ab	490	520	di-D-Cn	485	505
XTRIC-NH-Ab	580	604	DII-Cn	548	567
TR-NH-Ab	596	620	di-Cn	646	668
R-PE	480-565	578	diBA-Isopr	493	517
APC	650	660	Rodamina 123	511	
Hoechst 33342	340	450	RN-heptano	485	525
DAPI	350	470	RN-acetona	530	605
B Etidio	510	595	6-CF-pH alto	495	520
IP	536	623	6-CF-pH bajo	450	
NA-DNA	480	520	Indo 1 Ca alto	330	390-410
NA-RNA	440-470	650	Indo 1 Ca bajo	350	505-510
Pironina Y-DNA	560\$	570\$	Per Clor	470	680
Pironina Y-RNA	497	563	PE-Cy5	PE	670
N Tiazol	453	480	PE-TR	PE	613

Tabla 1. Resultados obtenidos durante el proceso de purificación de un lote de cada tipo de anticuerpo monoclonal.

	LAM			Purificado		
	anti CD3	anti CD4	anti CD8	anti CD3	anti CD4	anti CD8
Concentración de IgG (mg/mL)	8.15	5.12	4.92	4.35	2.84	2.97
Volumen (mL)	10	10	10	18.0	16.1	15.2
mg totales	81.5	51.2	49.2	78.3	46.0	45.1
% Rendimiento	100	100	100	96.1	89.7	91.9

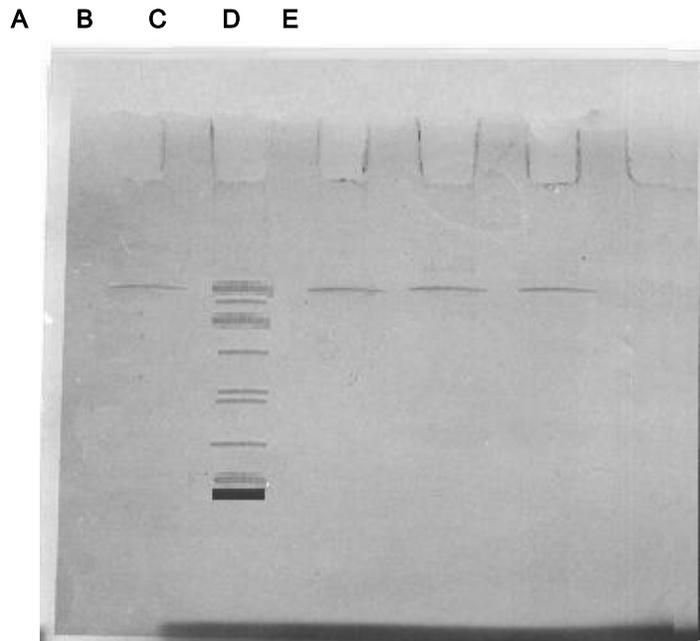
Fig. 1. Esquema del perfil cromatográfico del AcM anti CD3. Obsérvese los diferentes tipos de moléculas presentes en el LAM.



Leyenda:

1. Moléculas no enlazadas a la matriz
2. AcM de interés (**anti CD3**)
3. Otras Inmunoglobulinas G

Fig.2. Electroforesis de proteínas. Se aprecia una sola banda en cada uno de los anticuerpos estudiados (C, D, E), las cuales se corresponden con el patrón de IgG de la Sigma(A).



Leyenda:

A: patrón de IgG (firma comercial SIGMA)

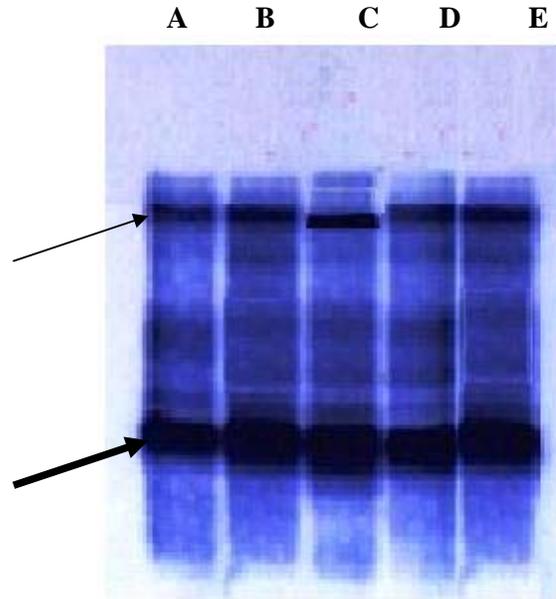
B: LAM Anti CD3

C: Anti CD3 purificado

D: Anti CD4 purificado

E: Anti CD8 purificado

Fig. 3. Electroforesis de proteína. Dos bandas mayoritarias en cada uno de los reactivos. La flecha superior corresponde a la IgG conjugada, la inferior a la Albúmina Bovina que se añade como estabilizador de estos productos.



Leyenda:

A: Conjugado Anti CD3-FITC

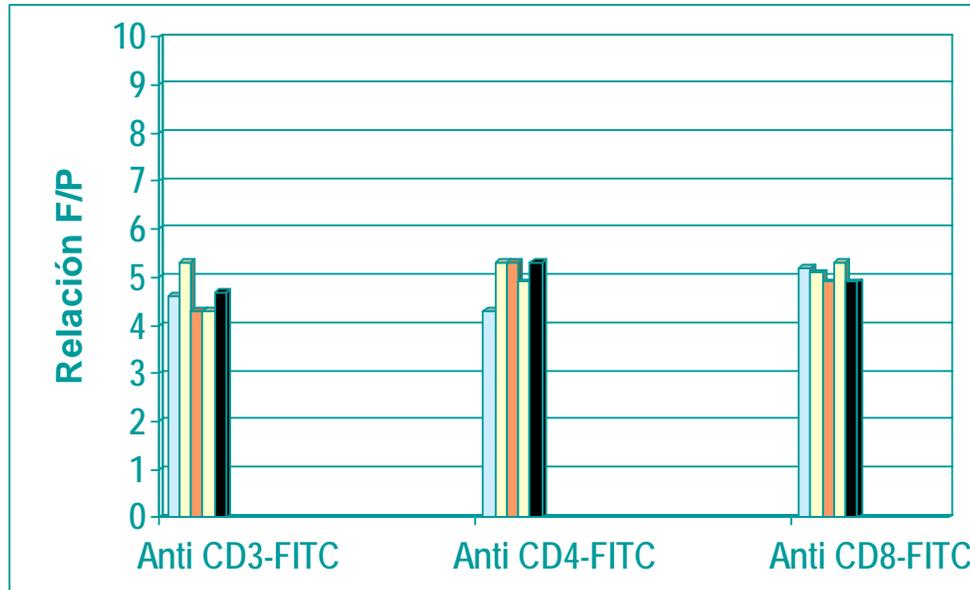
B: Conjugado Anti CD4-FITC

C: Patrón Sigma de IgG (150 KDa) – albúmina (68 KDa)

D: Conjugado Anti CD8-FITC

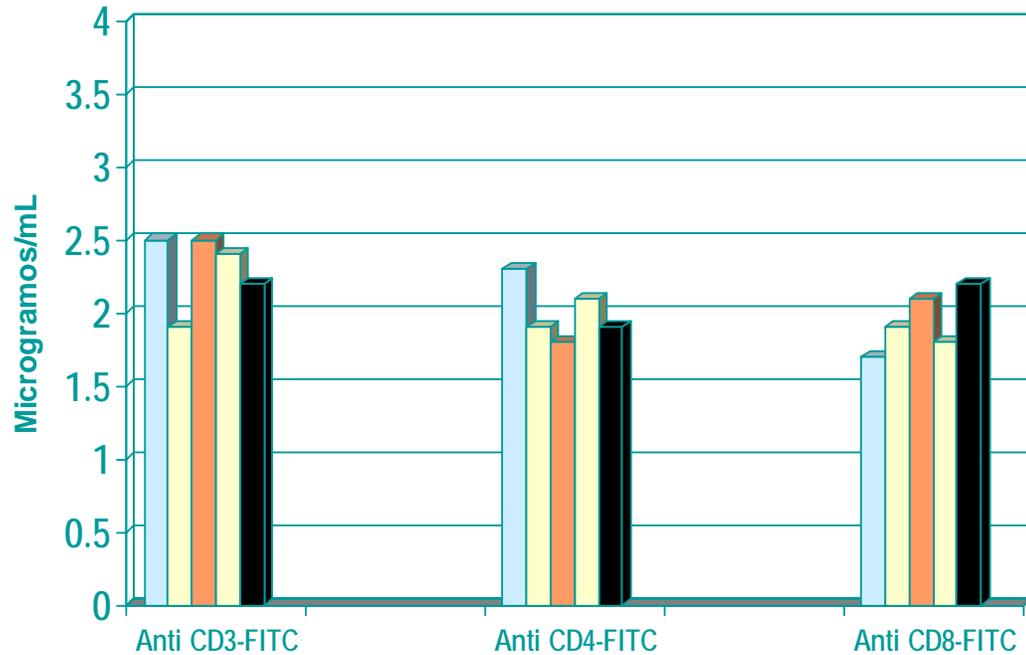
E: Conjugado Anti CD3-FITC – Comercial SIGMA

Fig. 4. Comportamiento de la relación F/P en los cinco lotes de consistencia de cada Anticuerpo monoclonal conjugado.



Leyenda: El número de lote en cada reactivo coincide con el mismo orden en que se encuentran representadas las columnas de izquierda a derecha, para cada conjugado.

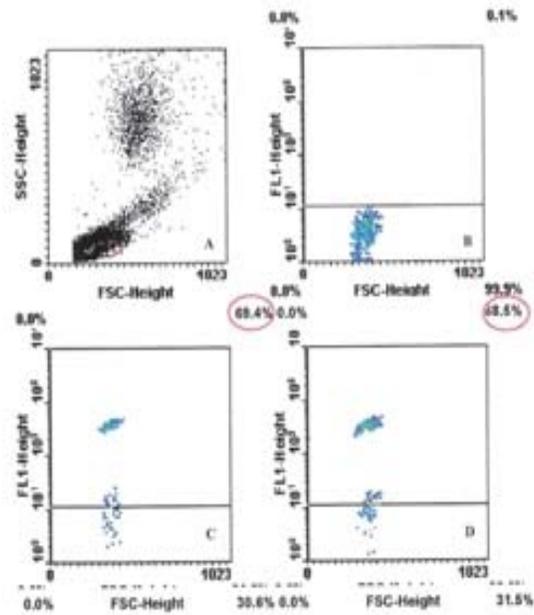
Fig. 5. Comportamiento de la actividad biológica en los cinco lotes de consistencia de cada Anticuerpo Monoclonal conjugado.



Leyenda: El número de lote en cada reactivo coincide con el mismo orden en que se encuentran representadas las columnas de izquierda a derecha, de cada conjugado.

Fig. 6 Resultado del ensayo comparativo por Citometria de Flujo del Anti CD3-FITC.

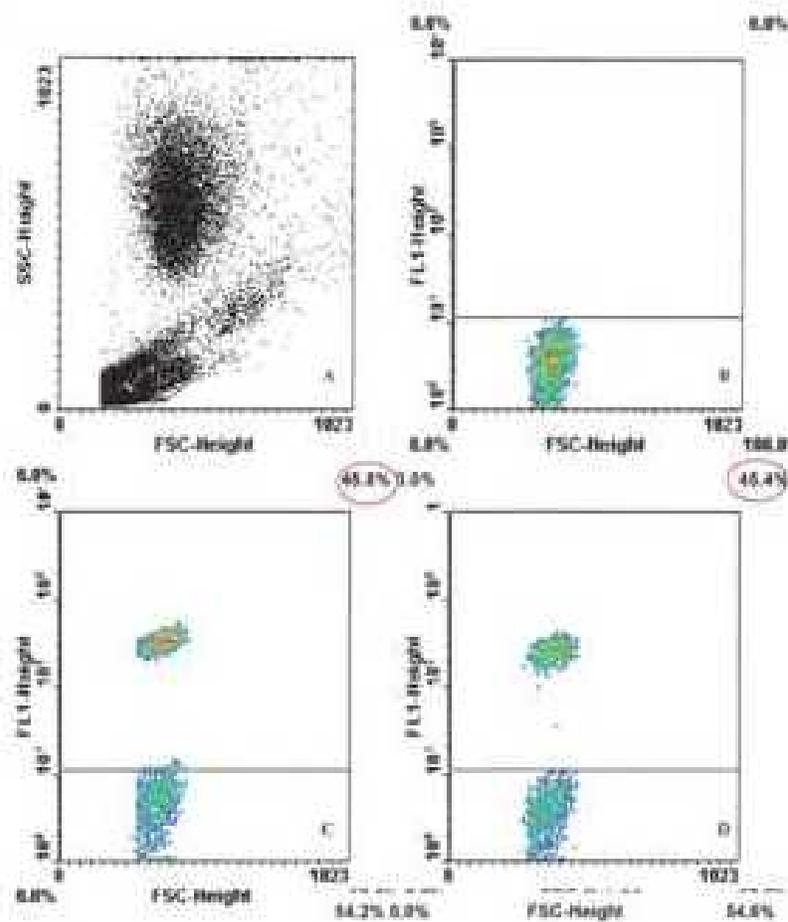
Fig. 6 Resultado del ensayo comparativo por Citometria de Flujo del Anti CD3-FITC.



A: Mapa de puntos de las células de la sangre. (R1) corresponde a la zona que se selecciona para estudiar los marcadores de los linfocitos.
B: Control negativo
C: Lote 060202 anti CD3 conjugado
D: Dako Referencia

Fig. 7 Resultado del ensayo comparativo por Citometria de Flujo del Anti CD4-FITC.

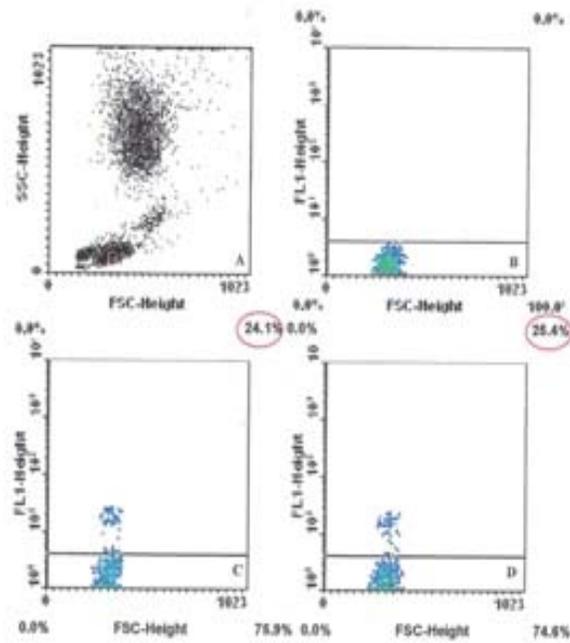
Fig. 7 Resultado del ensayo comparativo por Citometria de Flujo del Anti CD4-FITC



A: Mapa de puntos de las células de la sangre. (R1) corresponde a la zona que se selecciona para estudiar los marcadores de los linfocitos.
B: Control negativo
C: Lote 070202 anti CD4 conjugado
D: Dako Referencia

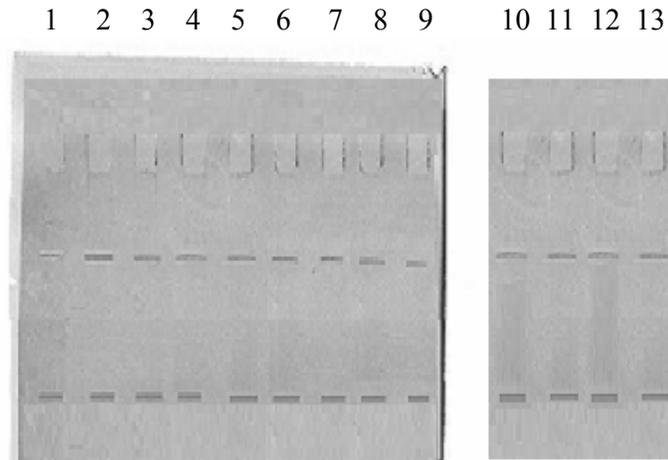
Fig. 8 Resultado del ensayo comparativo por Citometria de Flujo del Anti CD8-FITC.

Fig. 8 Resultado del ensayo comparativo por Citometria de Flujo del Anti CD8-FITC.



A: Mapa de puntos de las células de la sangre, (R1) corresponde a la zona que se selecciona para estudiar los marcadores de los linfocitos.
B: Control negativo
C: Lote 080201 anti CD8 conjugado
D: Dako Referencia

Fig. 9. Electroforesis en gel de poliacrilamida. Estudio de Estabilidad en el *tiempo 0*.
Se mantienen las dos bandas.

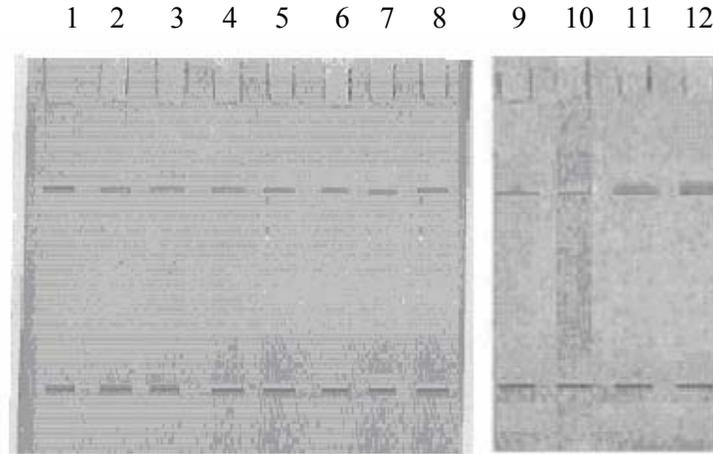


Leyenda:

- | | |
|--------------------------------|---------------------------------|
| 1. Patrón DAKO anti CD4-FITC | 7. anti CD4-FITC lote 07020200 |
| 2. anti CD3-FITC lote 06020100 | 8. anti CD8-FITC lote 08020200 |
| 3. anti CD4-FITC lote 07020100 | 9. antiCD8-FITC lote 08020300 |
| 4. anti CD8-FITC lote 08020100 | 10. Patrón DAKO anti CD4-FITC |
| 5. Patrón DAKO anti CD4-FITC | 11. anti CD4-FITC lote 07030100 |
| 6. anti CD3-FITC lote 06020200 | 12. anti CD3-FITC lote 06030100 |
| | 13. Patrón DAKO anti CD4-FITC |

Fig.10. Electroforesis en gel de poliacrilamida. Estudio de Estabilidad a los 6 meses.

Se mantienen las dos bandas

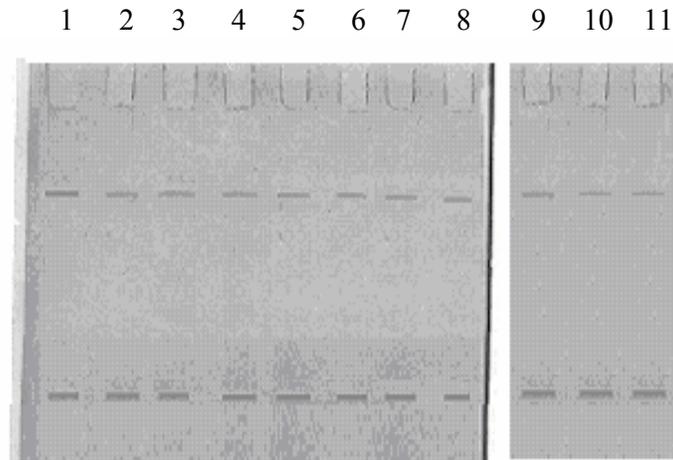


Leyenda:

- | | |
|--------------------------------|---------------------------------|
| 1. anti CD3-FITC lote 06020100 | 8. antiCD8-FITC lote 08020300 |
| 2. anti CD4-FITC lote 07020100 | 9. anti CD4-FITC lote 07030100 |
| 3. anti CD8-FITC lote 08020100 | 10. anti CD3-FITC lote 06030100 |
| 4. Patrón DAKO anti CD4-FITC | 11. Patrón DAKO anti CD4-FITC |
| 5. anti CD4-FITC lote 07020200 | 12. Patrón DAKO anti CD3-FITC |
| 6. anti CD3-FITC lote 06020200 | |
| 7. anti CD8-FITC lote 08020200 | |

Fig. 11. Electroforesis en gel de poliacrilamida. Estudio de Estabilidad a los *12 meses*.

Se mantienen las dos bandas



Leyenda:

- | | |
|--------------------------------|---------------------------------|
| 1. anti CD3-FITC lote 06020100 | 7. anti CD8-FITC lote 08020200 |
| 2. anti CD4-FITC lote 07020100 | 8. antiCD8-FITC lote 08020300 |
| 3. anti CD8-FITC lote 08020100 | 9. anti CD4-FITC lote 07030100 |
| 4. Patrón DAKO anti CD4-FITC | 10. anti CD3-FITC lote 06030100 |
| 5. anti CD4-FITC lote 07020200 | 11. Patrón DAKO anti CD4-FITC |
| 6. anti CD3-FITC lote 06020200 | |