

Producción de anticuerpos monoclonales con especificidad por los grupos sanguíneos A y B. Evaluación de su uso como reactivos hemoclasificadores.

Olga L. Wittig, José A. Alonso, Egidio L. Romano y Ramón F. Montaña.

Centro de Medicina Experimental, Laboratorio de Patología Celular y Molecular. Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas (IVIC). Km. 11, Carretera Panamericana. Caracas 1020-A, Venezuela. Apartado 21827. Correo electrónico: rmontano@ivic.ve

Palabras clave: Hibridoma, anticuerpos monoclonales, grupo sanguíneo A, grupo sanguíneo B, hemoclasificador.

Resumen. El desarrollo de reactivos hemoclasificadores mediante la aplicación de la tecnología para la producción de anticuerpos monoclonales (AcMo) ha sido exitoso y ello ha permitido reducir los costos asociados a su producción. En Venezuela el consumo de estos reactivos depende principalmente de la importación, con el consecuente gasto de divisas. Con el propósito de ayudar a solventar esta situación el presente trabajo se planteó como objetivos: 1) Generar hibridomas productores de AcMo con especificidad anti-A y anti-B, 2) Caracterizar y producir a mediana escala los AcMo obtenidos, 3) Realizar estudios de campo, con el fin de lograr su certificación como reactivos hemoclasificadores. El producto de este trabajo fue la obtención de 22 hibridomas, 11 productores de AcMo anti-A y 11 productores de anti-B. Cuatro AcMo fueron caracterizados y estudiados: Au18Kt₃F, MG3 (ambos IgM anti-A), SS4.5 (IgG anti-B) y BB2-3 (IgM anti-B). Para la producción de estos AcMo a mayor escala se emplearon los bio-reactores comerciales “miniPerm” y “Tecnomouse”, lográndose una concentración elevada de los mismos. Los valores de parámetros funcionales como avidéz, potencia y especificidad de los AcMo producidos resultaron aceptables al compararse con hemoclasificadores comerciales, lo que hace viable su utilización como reactivos hemoclasificadores.

A and B blood group-specific monoclonal antibodies. Production and evaluation as ABO-blood typing reagents.

Invest Clín 2006: 47(3): 253 - 264

Key words: Hybridoma, monoclonal antibody, blood group A, blood group B, blood typing.

Abstract. The Monoclonal Antibody (MoAb) technology has been successfully applied to develop reagents for human blood group classification. There is no production of this kind of reagents in Venezuela, and the local demand (blood banks and clinical laboratories) is mainly supplied with imported material. Considering this we decided to apply MoAb techniques to generate murine hybridomas secreting anti-A or anti-B specific MoAb. MoAb obtained were characterized and produced in enough quantity to perform validation studies as blood typing reagents. Out of 22 hybridomas that were initially selected, 11 were anti-A secretors and 11 were anti-B secretors. Four MoAb were further characterized: Au18Kt₃F, MG3 (both IgM anti-A), SS4.5 (IgG1 anti-B) and BB2-3 (IgM anti-B). Conditions were also established for growing the hybridomas Au18Kt₃F and BB2-3 in the bioreactors "miniPerm" and "Tecomouse", allowing for scale-up production of these MoAb. Avidity and specificity were estimated for each one, and the results were comparable to those obtained from commercially available reagents, making feasible its use as blood typing reagents.

Recibido: 11-07-2005. Aceptado: 23-02-2006.

INTRODUCCIÓN

Karl Landsteiner fue el primero en señalar la capacidad que tiene el suero sanguíneo de algunas personas para aglutinar los glóbulos rojos (GR) de otras, dando lugar este hallazgo al descubrimiento del sistema sanguíneo ABO (1). El sistema ABO es el sistema de grupos sanguíneos humanos más importante desde el punto de vista clínico. Ello es debido a la presencia regular de anticuerpos (Acs) anti-A, anti-B, ó una mezcla de estos, en los individuos cuyos tejidos carecen de los correspondientes antígenos (Ags) A, B, ó A/B, constituyéndose así en una barrera de histocompatibilidad que restringe la realización de transfusiones sanguíneas y el trasplante de órganos (2).

Atendiendo a la importancia clínica de las reacciones Ag/Ac del sistema ABO, desde su descubrimiento se han establecido pruebas serológicas de clasificación de sangre en sus diferentes grupos, para evitar reacciones hemolíticas post-transfusionales y también se ha reconocido la importancia de su realización para el éxito de trasplantes alogénicos.

Hasta el principio de los años ochenta se utilizaron sueros policlonales humanos como fuente de reactivos hemoclasificadores del grupo ABO. La producción de sueros policlonales humanos está asociada a tareas laboriosas y prolongadas, y además a un conjunto de problemas vinculados al manejo y administración de material biológico en humanos (riesgo de transmisión de infecciones como hepatitis B ó C, VIH, etc.). A

comienzos de la década de los ochenta se generalizó la producción de anticuerpos monoclonales (AcMo) con aplicaciones médicas, diagnósticas y en la investigación científica. La producción de AcMo tiene su origen el año 1975 cuando se produjo el primer AcMo de especificidad predefinida al fusionar linfocitos, obtenidos del bazo de ratones inmunizados, con células de mieloma de origen múrido, adaptadas a crecer de manera continua en cultivo de células (3).

La aplicación de esta tecnología para el desarrollo de reactivos hemoclasificados ha resultado exitosa y desde los años ochenta, tanto en Inglaterra como en Canadá, se han producido AcMo anti-A y anti-B de tipo IgM con las características adecuadas para ser empleados como reactivos de hemoclasificación (4, 5). Su posterior producción a escala industrial ha hecho que hoy día sean de uso universal (6).

En Venezuela el consumo de estos reactivos depende principalmente de la importación, con consecuencias negativas como el aumento permanente de los costos y el gasto de divisas en los que incurren los bancos de sangre y laboratorios clínicos nacionales. Con el propósito de ayudar a solventar esta situación, el presente trabajo se planteó la producción de AcMo múridos con especificidad anti-A y anti-B, la caracterización bioquímica y funcional de los mismos y su producción a mediana escala mediante el uso de bio-reactores. Ello permitiría disponer de cantidades suficientes de material para realizar estudios de campo (bancos de sangre y laboratorios clínicos), todo ello encaminado a lograr su certificación como reactivos hemoclasificadores.

MATERIAL Y MÉTODOS

Animales

Ratonas de la cepa Balb/c (9-10 semanas de edad) fueron obtenidas del bioterio central del Instituto Venezolano de Investi-

gaciones Científicas (IVIC) y alimentadas *ad libitum* con Ratarina (Purina. La Encrucijada, Venezuela).

Muestras de sangre venosa humana

Para la inmunización de los animales de experimentación se emplearon eritrocitos obtenidos a partir de muestras de sangre humana A o B. Durante la caracterización de los AcMo producidos se utilizaron muestras de sangre A, A₁, A₂, A₂B, B, AB y O. Estas muestras fueron donadas por el Laboratorio del Servicio Médico del IVIC y el Banco Municipal de Sangre de la ciudad de Caracas.

Líneas celulares P3x63Ag8.653

(CRL-1580. ATCC, Rockville, MD. USA)

Línea de células de mieloma múrido, no secretora de cadenas liviana o pesada de inmunoglobulina (Ig). Estas células fueron utilizadas como pareja de fusión.

P388D1 (TIB-63. ATCC, Rockville, MD. USA)

Línea celular de macrófagos múridos. El medio de cultivo en el que crecieron estas células se empleó como fuente de citoquinas y factores de crecimiento (7-10).

Inmunización

Tres modelos de inmunización previamente descritos en la literatura (4, 11-16) fueron utilizados como referencia en el presente trabajo. Los inmunógenos utilizados fueron GR A, GR B, Trisacárido B conjugado a albúmina sérica bovina (B-BSA; Chembiomed, Edmonton, Canadá) y glicoproteínas A y B obtenidas de la saliva de individuos secretores. Estas glicoproteínas con especificidad ABO se obtuvieron en la forma de proteínas totales utilizando la técnica aplicada por Barrie y col. en 1983 (11).

En el protocolo 1 se realizaron 4 inmunizaciones por vía intraperitoneal (ip) a intervalos de siete días. El inmunógeno utili-

zado fue una suspensión de GR A o GR B en buffer fosfato salino (PBS) estéril que contenía 2×10^7 eritrocitos ($500 \mu\text{L}/\text{animal}$). Transcurridos dos días a partir de la cuarta inmunización se procedió a inocular nuevamente el inmunógeno por vía ip y dos días más tarde se procedió a la obtención del bazo de los animales inmunes y a realizar la fusión.

En el protocolo 2 también se realizaron cuatro inmunizaciones a intervalos de siete días. En este protocolo se utilizó la vía ip para las dos primeras administraciones del inmunógeno (una suspensión de GR "B" al 10% v/v en PBS a razón de $500 \mu\text{L}/\text{animal}$), cada una acompañada de la administración por vía subcutánea (sc) de $200 \mu\text{L}/\text{animal}$ de una emulsión que contenía $100 \mu\text{g}$ de B-BSA y $100 \mu\text{L}$ de Adyuvante Completo de Freund (ACF, de Sigma Chemical Co). El día 21 se administró vía ip $100 \mu\text{g}/\text{animal}$ de B-BSA preparado en la forma de una emulsión en Adyuvante Incompleto de Freund (AIF, de Sigma Chemical Co). El día 28 se inoculó vía ip $200 \mu\text{L}/\text{animal}$ de una solución que contenía $100 \mu\text{g}$ de B-BSA en PBS y tres días más tarde se procedió a la obtención del bazo de los animales inmunes y a realizar la fusión.

En el protocolo 3 el inmunógeno empleado (glicoproteína A o A+B) se administró tres veces a intervalos de 15 días y, a continuación de la tercera inmunización, 3 veces más en forma diaria. El primer día se administró por vía sc una emulsión en ACF que contenía $50 \mu\text{g}$ de sustancia A ó A+B ($200 \mu\text{L}/\text{animal}$). La segunda inmunización (día 15) fue similar a la primera pero la emulsión se preparó en AIF y se utilizó la vía ip. Para la tercera inmunización (día 29) se emplearon $50 \mu\text{g}$ de sustancia A ó A+B disueltos en $200 \mu\text{L}$ de PBS, por vía ip. Los días 30, 31 y 32 se administró por vía ip una solución que contenía $400 \mu\text{g}$ de sustancia A ó A+B disueltos en PBS ($200 \mu\text{L}/\text{animal}$). El día 33 se procedió a la

obtención del bazo de los animales inmunes y a realizar la fusión.

El estatus inmune de los animales sometidos a los distintos protocolos de inmunización se valoró titulando el suero en ensayos de micro-hemaglutinación, como se describe adelante en la sección "Escrutinio y clonación".

Fusión

Con el material obtenido de los distintos protocolos de inmunización se realizaron seis fusiones. Células esplénicas obtenidas de ratones inmunizados y en cuyo suero se demostró la presencia de Acs anti-A ó anti-B mediante ensayos de micro-hemaglutinación, se mezclaron con células P3x63Ag8.653 en una relación 4:1 (célula esplénica: P3x63Ag8.653). Al sedimento celular producto de esta mezcla se añadió 1 mL de una solución de polietilenglicol [45% PEG 1300-1600 (P-7777. Sigma. Mo, USA), 5% DMSO (D-2650. Sigma. Mo, USA), en buffer fosfato salino (PBS), pH= 7.8-8.0, 37°C]. Posteriormente se agregó gota a gota medio de cultivo DME-F12 (D-6905. Sigma. Mo, USA) precalentado a 37°C y libre de suero fetal bovino (SFB), hasta alcanzar un volumen de 40 mL. Se centrifugó a $400\times g$ por 5 minutos y se resuspendió suavemente en medio de cultivo DME-F12 enriquecido con SFB (F-4010. Sigma. Mo, USA) al 10 %, 2 mM L-glutamina (G-7513. Sigma. Mo, USA), una mezcla de $100 \mu\text{M}$ hipoxantina, $0,4 \mu\text{M}$ aminopterina y $16 \mu\text{M}$ timidina (H-0262. Sigma. Mo, USA), y una mezcla de $100 \mu\text{g}/\text{mL}$ estreptomina, 100 unidades/mL penicilina y $0,25 \mu\text{g}/\text{mL}$ anfotericina B (A-4668. Sigma. Mo, USA). El producto de fusión finalmente se repartió a razón de 1×10^6 células/mL en placas de micro-cultivo de 96 pozos fondo plano (Nunc. Roskilde, Denmark), en las cuales previamente se sembraron células nodrizas (macrófagos múridos residentes de la cavidad peritoneal de ratones Balb/c; $2,5 \times$

10⁴/pozo) cultivándose por 10 días en la incubadora de células.

Escrutinio y clonación

Transcurridos 10 días, los micro-cultivos se examinaron al microscopio en busca de colonias celulares y se tomaron muestras del sobrenadante (SN) de cultivo para investigar la presencia de Acs anti-A ó anti-B por medio de ensayos de aglutinación directa en tubos y/o placas. Para ello se empleó una suspensión al 2% v/v de GR humanos tipo A ó B en solución salina de NaCl 8,5 g/L (SS), según el caso en estudio. La titulación de los AcMo anti-A y anti-B se realizó en tubos ó en placa de micro-hemaaglutinación. Brevemente, se realizaron diluciones seriadas (1:2) de los SN en estudio añadiendo a cada dilución 30 μ L de una suspensión de GR A ó B al 2% v/v en SS. Se incubó durante 2 horas (ensayo en placa) o 45 minutos (ensayo en tubo) a temperatura ambiente y posteriormente se procedió a revelar la presencia de aglutinación. Se consideró como título la máxima dilución a la cual se observó una hemaaglutinación visible macroscópicamente.

Con la finalidad de garantizar la clonalidad y estabilidad de los hibridomas obtenidos se procedió a su clonación por el método de dilución al límite. Las células híbridas viables fueron contadas y resuspendidas en medio de cultivo DME-F12 enriquecido al 10 % con SFB, 2 mM L-glutamina, una mezcla de 100 μ M hipoxantina y 16 μ M timidina (H-0137. Sigma. Mo, USA), y una mezcla de 100 μ g/mL estreptomycin, 100 unidades/mL penicilina y 0,25 μ g/mL anfotericina B. Esta suspensión fue repartida a razón de 0,3-8 células/pozo en alícuotas de 100 μ L/pozo, en placas de microcultivo de 96 pozos fondo plano (Nunc Roskilde, Denmark) con células nodrizas ya presentes. A continuación se procedió a cultivar estas células durante 7-10 días en la estufa de ambiente húmedo a 37°C y 5% de CO₂.

Transcurridos 7-10 días, el SN de cada cultivo fue examinado mediante hemaaglutinación, los cultivos que contuvieron colonias productoras de los Acs de interés fueron expandidos y las células fueron preservadas en nitrógeno líquido para su posterior utilización.

Estudios de caracterización de los AcMo producidos

La aivez de los AcMo anti-A y anti-B producidos se valoró de acuerdo a los requerimientos exigidos por la FDA (US Food and Drug Administration) para reactivos que se usan en la determinación de grupos sanguíneos del sistema ABO (14). Para ello se colocó sobre una lámina portaobjetos una gota de sangre de grupo conocido (40% v/v GR en plasma autólogo), sobre esta se añadió una gota de AcMo a probar y se mezcló procediendo a medir con un cronómetro el tiempo transcurrido hasta la aparición de una aglutinación visible. Además se registró el tiempo que transcurrió hasta la aparición de una aglutinación de 3+. Por último, se registró el tamaño del grumo de GR aglutinados según la escala Marsh (17). Para caracterizar aún más la reactividad de los AcMo anti-A (Au18Kt₃F y MG3) y anti-B (SS4.5 y BB2-3), se usaron muestras de sangre A, A₁, A₂, A₂B, B, AB y O. Sobre una lámina portaobjetos se colocó una gota de sangre (40% v/v GR en plasma autólogo) que había sido clasificada previamente con reactivos comerciales y se vertió sobre ella una gota del AcMo a probar, se mezcló y se observó la presencia o no de aglutinación.

Con la finalidad de producir mayores cantidades de AcMo anti-A y anti-B, se emplearon los bio-reactores "miniPERM" de Heraeus Instruments (Osterode am Harz, Alemania) y "Tecomouse" de IBS INTEGRA BIOSCIENCE (Fernwald, Alemania). Estos aparatos permiten cultivos a alta densidad celular y de larga duración, y por ende la obtención de una alta concentración de

AcMo, ya que se garantiza un suministro controlado de nutrientes y gases (O_2/CO_2) al cultivo y se evita su agotamiento y la acumulación de productos de desecho metabólico (18, 19). Las condiciones y el mantenimiento de los cultivos fueron establecidos en el laboratorio. El cultivo en el bio-reactor miniPerm se inició a una concentración celular de $1-2 \times 10^6$ células/mL en un volumen de 35 mL de medio de cultivo DMEM (D-5648, Sigma. Mo, USA) enriquecido con 10% de SFB, 5% de SN de cultivo de células P388D1, 1% de L-glutamina y 1 % de mezcla de antibióticos-antimicótico. En estos cultivos se mantuvo la concentración de glucosa a 4,5 g/L, evitando valores por debajo de 2 g/L y aumentos en la concentración de lactato mayores a 1,8 g/L. El pH se mantuvo en 7,2 y la velocidad de rotación en 3 rpm. A partir del cuarto día y de manera inter-diaria o diaria se evaluó el número y viabilidad de las células, el pH, las concentraciones de glucosa y de lactato, y el título de anticuerpo.

El cultivo en el bio-reactor Tecnomouse se inició a una concentración celular igual o mayor a 20×10^6 células/mL, empleando el mismo medio de cultivo descrito para el miniPerm. El bioreactor fue programado a una velocidad de flujo de medio de cultivo de 150 mL/h y flujo de gas suficien-

te para la oxigenación de 1 cassette de cultivo. La inoculación de medio de cultivo fresco y la cosecha se realizó cada 7 días por varios meses. En el material cosechado se midió la concentración de lactato y glucosa y el título de anticuerpo. La clase y subclase de Ig a la cual pertenecen los AcMo obtenidos y caracterizados (anti-A: Au18Kt₃F y MG3 y anti-B: SS4.5 y BB2-3) se determinó mediante un ensayo inmunoenzimático tipo ELISA (Mouse Immunoglobulin Isotyping ELISA Kit, N° 550487. BD Pharmingen).

RESULTADOS

La Tabla I contiene un resumen de los hibridomas secretores de anticuerpos anti-A y anti-B producidos mediante la aplicación de los protocolos de inmunización descritos. La especificidad de los AcMo fue evaluada usando 120 muestras de sangre de diferente grupo sanguíneo. Se probaron simultáneamente AcMo anti-A y anti-B de origen comercial (IMMUNOCOR, INC. Norcross, GA 30071 USA) y los AcMo Au18Kt₃F, MG3, BB2-3 y SS4.5. Los resultados obtenidos con Au18Kt₃F, MG3, BB2-3 y SS4.5 fueron consistentes con lo que se obtuvo empleando los reactivos comerciales (Tabla II). Las muestras de sangre mencio-

TABLA I
HIBRIDOMAS PRODUCIDOS UTILIZANDO DISTINTOS PROTOCOLOS DE INMUNIZACIÓN

| Inmunógeno | Hibridoma |
|--|---|
| Glóbulos Rojos "A" (Protocolo 1) | AcMo anti-A (Au18Kt ₃ F + 6 clones anti-A) |
| Substancias A y B (Protocolo 3) | AcMo anti-A (MG3 + 3 clones anti-A) AcMo anti-B (BB2) |
| Glóbulos Rojos B (Protocolo 1) | No AcMo anti-B |
| Glóbulos Rojos B y Trisacárido B/BSA (Protocolo 2) | Varios hibridomas anti-B, los cuales se hicieron negativos luego de realizada la clonación. |
| Substancia B (Protocolo 3) | AcMo anti-B (SS4.5 + 9 clones anti-B) |

nadas anteriormente también fueron utilizadas para la determinación de la avidéz, siguiendo la técnica descrita en material y métodos. En la Tabla III se resumen estos resultados.

En cultivo estacionario el título máximo de anticuerpos registrado para los hibridomas generados y determinado de acuerdo al ensayo descrito en material y métodos fue 1:1024 para Au18Kt₃F (AcMo anti-A) y 1:2048 para MG3 (AcMo anti-A); en tanto que los dos AcMo anti-B caracterizados, SS4.5 y BB2.2 arrojaron un título máximo de 1:512. Con la excepción de SS4.5 que re-

sultó una IgG1, los demás AcMo caracterizados son IgM. Todos los AcMo analizados presentaron cadena liviana kappa (Tabla IV).

Los clones productores de Au18Kt₃F, MG3, SS4.3 y BB2-3 fueron sembrados en el bio-reactor miniPERM mostrando un crecimiento variable según el clon. En las Figuras 1 y 2 se muestran los resultados obtenidos con el uso del miniPerm para los clones Au18Kt₃F y BB2-3. Si se comparan las curvas de densidad celular vs. título de anticuerpos correspondiente, es evidente que la densidad celular mostrada por el clon Au18Kt₃F es mucho mayor que la alcanzada

TABLA II
ESPECIFICIDAD DE LOS AcMo Au18Kt₃F, MG3, SS4.5 Y BB2-3

| Grupo sanguíneo | AcMo anti-A (Au18Kt ₃ F) | AcMo anti-A (MG3) | AcMo anti-A comercial | AcMo anti-B (SS4.5) | AcMo anti-B (BB2-3) | AcMo anti-B comercial |
|----------------------|-------------------------------------|-------------------|-----------------------|---------------------|---------------------|-----------------------|
| A (46)* | + | + | + | - | - | - |
| A ₁ (3) | + | + | + | - | - | - |
| A ₂ (2) | + | + | + | - | - | - |
| A ₂ B (2) | + | + | + | N.D.** | N.D. | + |
| B (17) | - | - | - | + | + | + |
| AB (4) | + | + | + | + | + | + |
| O (46) | - | - | - | - | - | - |

* = número de muestras utilizadas. ** = No determinado.

TABLA III
AVIDEZ DE LOS AcMo Au18Kt₃F, MG3, SS4.5 Y BB2-3

| AcMo | T1 | T2 | TA |
|---------------------------------------|-------|----------|----|
| AcMo anti-A (Au18Kt ₃ F) | 2 seg | > 60 seg | 2+ |
| AcMo anti-A (MG3) | 4 seg | 45 seg | 3+ |
| AcMo anti-B (SS 4.5) | 2 seg | 72 seg | 3+ |
| AcMo anti-B (BB2-3) | 3 seg | > 60 seg | 1+ |
| AcMo anti-A comercial | 2 seg | 20 seg | 4+ |
| AcMo anti-B comercial | 2 seg | 18 seg | 4+ |

La avidéz fue determinada siguiendo las orientaciones de la FDA (14).

T1: tiempo en el cual se detecta la primera señal de aglutinación después de mezclar el AcMo con su respectivo Ag. T2: tiempo correspondiente a una aglutinación de 3+. TA: tamaño de la aglutinación transcurridos 2 minutos desde el inicio de la reacción. Los datos corresponden a SN de cultivo estacionario.

TABLA IV
CLASE Y SUBCLASE DE INMUNOGLOBULINA (Ig) A LA CUAL PERTENECEN LOS AcMo Au18Kt₃F, MG3, SS4.5 Y BB2-3

| Anti-Ig de ratón | Control + ^(a) | Control - ^(b) | Au18Kt ₃ F | MG3 | SS4.5 | BB2-3 |
|------------------------|--------------------------|--------------------------|-----------------------|-----|-------|-------|
| Anti-IgG ₁ | + | - | - | - | + | - |
| Anti-IgG _{2a} | + | - | - | - | - | - |
| Anti-IgG _{2b} | + | - | - | - | - | - |
| Anti-IgG ₃ | + | - | - | - | - | - |
| Anti-IgM | + | - | + | + | - | + |
| Anti-IgA | + | - | - | - | - | - |
| Anti- Ig | + | - | + | + | + | + |
| Anti- Ig | + | - | - | - | - | - |

(a) Control positivo (+): mezcla de 9 inmunoglobulinas (Ig) de ratón con cadenas pesadas y livianas (IgG₁, IgG₁, IgG_{2a}, IgG_{2a}, IgG_{2b}, IgG_{2b}, IgG₃, IgM, IgA, IgA).

(b) Control negativo (-): medio utilizado para cultivar los híbridomas.

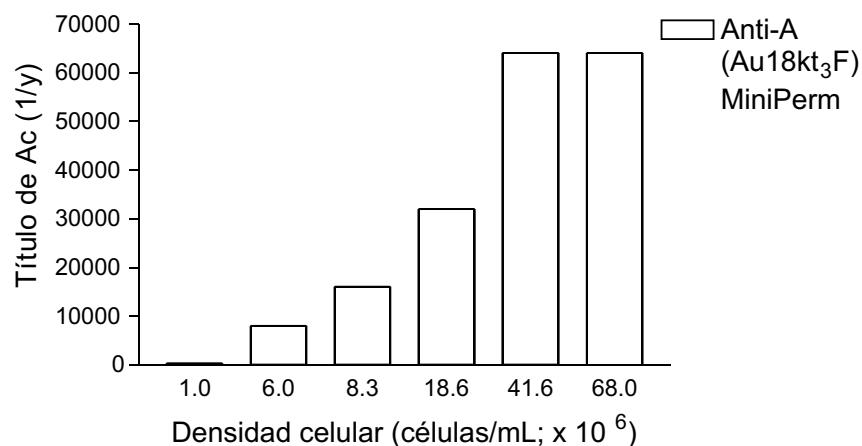


Fig. 1. Producción de AcMo anti-A (Au18Kt₃F) en el bio-reactor MiniPerm. La densidad celular y el título de Ac fueron estimados en una muestra de cultivo que fue cosechada los días indicados en material y métodos. La densidad celular fue calculada mediante conteo celular con hemacitómetro. El título de anticuerpos se obtuvo por ensayo de microaglutinación realizando diluciones seriadas (1:2) del SN en estudio en PBS -0,1% BSA y usando una suspensión al 2% v/v de GR "A". Se consideró como título la máxima dilución a la cual la aglutinación resultó evidente.

por BB2-3 (un factor de 8,5 veces más). Sin embargo, para cada clon los valores referidos a título de anticuerpos mantienen una proporcionalidad entre la densidad celular y el título de anticuerpo producido. Estos resultados indican que, bajo las mismas condiciones, el clon productor de anti-A tiene una mayor capacidad de crecimiento que el clon productor de anti-B.

El clon Au18Kt₃F productor de anti-A también fue cultivado en el bio-reactor Tecnomouse. En esta unidad de producción los valores referidos a densidad y viabilidad celular no reflejaron, en ningún momento, la situación que ocurría dentro de la cámara de cultivo donde, a juzgar por el aumento en los títulos de Ac, disminución de la concentración de glucosa y aumento de la con-

centración de lactato en el medio de cultivo, ocurría una proliferación celular considerable. Por esta razón, el parámetro seleccionado como indicador del proceso de cultivo fue el título de Ac. (Fig. 3). Para el momento en que se detuvo el cultivo en este bio-reactor se pudo apreciar un cúmulo importante de células ocupando cerca de un 75% del espacio en el cassette de cultivo y

mostrando una apariencia semejante a un "tejido celular".

DISCUSIÓN

Este trabajo permitió la generación de 11 hibridomas secretores de AcMo con especificidad anti-A y 11 hibridomas secretores de AcMo con especificidad anti-B. En los

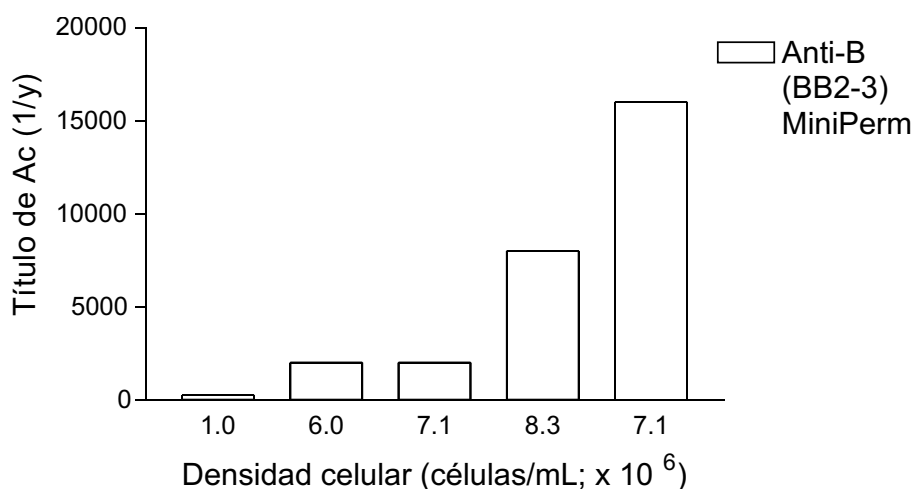


Fig. 2. Producción de AcMo anti-B (BB2-3) en el bio-reactor MiniPerm. La densidad celular y el título de Ac fueron estimados como se explicó en la leyenda de la Figura 1, pero empleando una suspensión al 2% v/v de GR "B". Se consideró como título la máxima dilución a la cual la aglutinación resultó evidente.

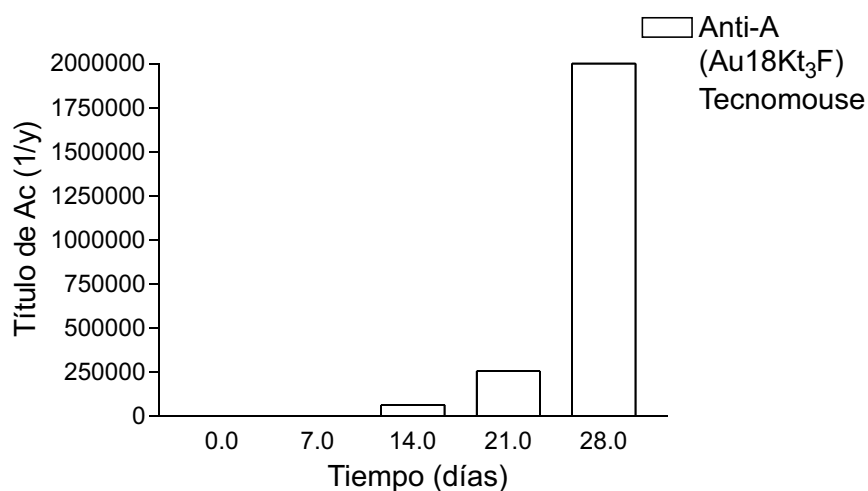


Fig. 3. Producción de AcMo anti-A (Au18Kt₃F) en el bio-reactor Tecnomouse. El título de Ac fue estimado como se señaló en la leyenda de la Figura 1 y en las muestras de cultivo cosechadas los días indicados. Se consideró como título la máxima dilución a la cual se observó una aglutinación clara.

protocolos de inmunización aplicados se utilizó exitosamente como inmunógeno GR "A", trisacárido B-BSA y sustancias A y A+B de saliva. Los GR "B" no resultaron buenos inmunógenos al ser inoculados en los ratones Balb/c, lo cual probablemente guarda relación con el hecho de que los GR de estos animales poseen sobre su superficie un antígeno semejante al que determina el grupo B en humanos (13, 16, 20).

La selección de los hibridomas se llevó a cabo atendiendo a varios factores: 1) Su origen: fueron escogidos aquellos hibridomas con señal de Ac positiva, provenientes de microcultivos en los que solo pudo apreciarse microscópicamente una colonia, favoreciendo de esta manera la clonalidad; 2) La avidez: dentro de la población de hibridomas productores de AcMo fueron seleccionados aquellos cuyo sobrenadante de cultivo mostró una avidez mayor; 3) Viabilidad y tasa de crecimiento celular: fueron seleccionados los hibridomas con mejor viabilidad y crecimiento celular.

Un buen reactivo de hemoclasificación debe ser específico para el antígeno que se desea detectar, debe ser lo suficientemente potente para dar una buena reacción macroscópica con variantes débiles de grupos sanguíneos, debe ser estable bajo las condiciones de uso cotidiano (cambios de temperatura, por ejemplo) y además su producción debe tener un costo razonable. Fue por ello necesario estudiar los 4 AcMo seleccionados, Au18Kt₃F, MG3, SS4.5 y BB2-3, con base a los criterios señalados anteriormente. Al ser probados con los principales grupos sanguíneos y los subgrupos (del grupo A) de mayor importancia, los AcMo generados reaccionaron con la especificidad esperada en cada uno de los casos. En cuanto a potencia se refiere, los AcMo obtenidos en la forma de SN de cultivo estacionario provocaron una clara aglutinación de los GR pertenecientes a los grupos sanguíneos correspondientes y no reaccionaron con GR

de otros grupos sanguíneos. Cuando estos hibridomas fueron cultivados en bioreactores y sus SN fueron probados, la intensidad de la aglutinación fue mucho mayor, manteniéndose la especificidad. En la actualidad, estamos estudiando la estabilidad de estos hibridomas y los anticuerpos que ellos producen a más largo plazo, así como la adecuada formulación de los AcMo como posibles reactivos clínicos. A objeto de completar su validación, será además conveniente realizar un estudio de campo de mayor escala y allí evaluar la reactividad de estos AcMo con GR fetales, GR obtenidos de pacientes con hematopatías malignas, así como también con GR pertenecientes a subgrupos raros tales como Ax, Am, Ael y Aend.

Se ha hecho referencia ya a las ventajas que tienen los AcMo múridos en comparación con los sueros polivalentes como reactivos de hemoclasificación. Son abundantes las publicaciones que abordan este tema (15, 20) y siendo la mayoría de esas ventajas ciertas, se hacen más evidentes con el uso de los bio-reactores. Una vez alcanzado el crecimiento celular y la consecuente producción de Ac en estos dispositivos, se pone de manifiesto una marcada diferencia entre las cantidades de Ac producidas en ellos en comparación con las obtenidas en cultivo estacionario. Por ejemplo, el título máximo registrado en productos de cultivo estacionario del hibridoma Au18Kt₃F es 1:1024, mientras que el material obtenido del cultivo en miniPERM alcanzó un título de 1:64.000 y de 1:2.000.000 en el caso del Tecnomouse. Otra ventaja a destacar en el caso de los bio-reactores, en especial del Tecnomouse, es que su uso está asociado a un menor consumo de medio de cultivo y de los reactivos con que éste es enriquecido, en especial de SFB cuyo costo es elevado. Por otra parte, es importante mencionar que la generación de tumores ascíticos en ratones

ingénicos, otra metodología que ha sido empleada para la producción a escala de AcMo múridos en el pasado reciente, progresivamente se ha reemplazado por el uso de bio-reactores ya que, además de evitar el proceso traumático al que son sometidos estos animales, garantizan la ausencia de proteínas propias del ratón facilitando los procedimientos de purificación de las AcMo generados.

En conclusión, cuatro AcMo múridos anti-A y anti-B fueron producidos y evaluados en cuanto a parámetros que los hacen funcionales como reactivos hemoclasificadores, es decir, avidez, potencia y especificidad. Los resultados obtenidos indican que estos AcMo son comparables en sus propiedades con hemoclasificadores comerciales y con los que se han reportado en algunas publicaciones especializadas (21).

REFERENCIAS

1. **Landsteiner K.** Agglutinationserscheinungen normalen menschlichen Blutes. *Klin Wochenschr* 1901; 14:1132-1134.
2. **Mollison P L, Engelfriet C P, Contreras M.** *Blood Transfusion in Clinical Medicine*. 10th Ed. Malden (Ma): Blackwell Science, Inc. 1997, p. 358-386.
3. **Kohler G, Milstein C.** Continuous culture of fused cells secreting antibodies of pre-defined specificity. *Nature* 1975; 256: 495-497.
4. **Messeter L, Brodin T, Chester M A, Löw B, Lundblad A.** Mouse monoclonal antibodies with anti-A, anti-B and anti-A,B specificities; some superior to human polyclonal ABO reagents. *Vox Sang* 1984; 46:185-194.
5. **Voak D, Sacks S, Alderson T, Takei F, Lennox E, Jarvis J, Milstein C, Darnborough J.** Monoclonal anti-A from a hybrid-myeloma: evaluation as a blood grouping reagent. *Vox Sang* 1980; 39:134-140.
6. **Rouger P, Anstee D.** First international workshop on monoclonal antibodies against human red blood cell and related antigens: final report. *Vox Sang* 1988; 55: 57-68.
7. **Bazin R, Lemieux R.** Increased proportion of B cells hybridomas secreting monoclonal antibodies of desired specificity in cultures containing macrophage-derived hybridoma growth factor (IL-6). *J Immunol Meth* 1989; 116:245-249.
8. **Bazin R, Lemieux R.** Role of the macrophage-derived hybridoma growth factor in the in vitro and in vivo proliferation of newly formed B-cell hybridomas. *J Immunol* 1987; 139: 780-787.
9. **Corbel C, Melchers F.** The synergism of accessory cells and of soluble alpha factors derived from them in the activation of B cells to proliferation. *Immunol Rev* 1984; 78: 51-74.
10. **Sugasawara R J, Cahoon B E, Karu A E.** The influence of murine macrophage-conditioned medium on cloning efficiency, antibody synthesis and growth rate of hybridomas. *J Immunol Meth* 1985; 79: 263-275.
11. **Barrie E K, Fraser R H, Munro A C, Williamson A R, Hamilton E A, Mitchell R.** Monoclonal anti-B produced by the immunization of mice with soluble salivary glycoproteins. *J Immunogenet* 1983; 10: 41-44.
12. **Bazin R, Lemieux R.** Effect of the elapsed time after the final antigen boost on the specificity of monoclonal antibodies produced by B cell hybridomas. *J Immunol Meth* 1988; 112:53-56.
13. **Becker M I, Juica F, Jamett A, Tzichinovsky S, Barros S, Aguayo J, De Ioannes A.** Development of anti-human B blood group monoclonal antibodies suitable as a blood typing reagent. *Hybridoma* 1994; 13:303-310.
14. **McDonald D, Thompson J.** A new monoclonal anti-A antibody BIRMA-1. *Vox Sang* 1991; 61:53-58.
15. **Rivero R, Suárez L, Bencomo A, González R, Palma L, Salazar A.** Generación de un híbrido de ratón secretor de anticuerpos monoclonales contra el antígeno del grupo sanguíneo A del sistema ABO humano. *Biotechnología Aplicada* 1995; 12: 23-29.

16. **Sacks S H, Lennox E S** Monoclonal anti-B as a new blood typing reagent. *Vox Sang* 1981; 40:99-104.
17. **Marsh W C.** Scoring of hemagglutination reactions. *Transfusion* 1972; 12: 352-353.
18. **Falkenberg F W, Weichert H, Krane M, Bartels I, Palme M, Nagels H O, Fiebig, H.** *In vitro* production of monoclonal antibodies in high concentration in a new and easy handle modular minifermenter. *J Immunol Meth* 1995; 179:13-29.
19. **Falkenberg F W.** Production of monoclonal antibodies in the miniPerm bioreactor: comparison with other hybridomas culture methods. *Res Immunol* 1998; 149:560-570.
20. **Montaño R, Romano E.** Anticuerpos monoclonales y su aplicación en hematología. *Interciencia* 1995; 20:194-203.
21. **Leon G, Cruz C, Rojas L.** Production of monoclonal antibody with anti-B specificity, to be used as reagent for blood classification. *Invest Clin* 2004; 45(2):145-57.