
Obtención de heterohibridoma productor de anticuerpos monoclonales de tipo IgM contra el antígeno D del sistema Rh.

Graciela León-González y Carlos Cruz.

Banco Municipal de Sangre del Distrito Capital, Esquina de Pirineos San José, Caracas, Venezuela. Correo electrónico: gonzaleo@cantv.net

Palabras clave: Heterohibridoma, anticuerpos monoclonales, especificidad anti-D.

Resumen. El objetivo de este trabajo fue obtener un heterohibridoma capaz de producir anticuerpo monoclonal con especificidad anti-D (Sistema Rh) de tipo IgM, que pueda ser utilizado como reactivo en la hemoclasificación. Las células mononucleares (CMN) se extrajeron de una muestra de sangre de mujer altamente sensibilizada, al 5to día del post parto de RN Rh positivo. Fueron sometidas a proceso de transformación con sobrenadante de cultivo (SNC) de células B95.8 rico en viriones de Epstein Barr (VEB). Una vez transformadas y en crecimiento exponencial se fusionaron con células de la línea K6H6/B5, utilizando como agente fusógeno el PEG 4.000 en una proporción 1:1. Luego de la fusión se sembraron en placas de cultivo para posteriormente evaluar en los SNC de cada pozo, la formación de híbridos y la secreción de anticuerpos específicos. La eficiencia de fusión fue de $1,8 \times 10^{-6}$, lográndose obtener una clona productora de anti-D IgM a la que denominamos BMS-9, la cual se pudo mantener en cultivo continuo por 3 meses produciendo anticuerpos a una concentración de $4 \mu\text{g}/\text{mL}$ en sobrenadante de cultivo (SNC). También se logró obtener anticuerpos en Sistema Capilar Artificial (SCA) alcanzando una concentración de $24 \mu\text{g}/\text{mL}$. La potencia se determinó utilizando células Ror: En SNC a centrifugación inmediata (CI): 1×32 , score 52; a 15' de incubación a TA: 1×1024 score 105; y a 37°C: 1×1024 score 105. Con el producto del SCA, a CI: 1×32 score 54; a 15' de incubación a TA: 1×8192 score 136; y a 37°C: 1×8192 score 136. Se detectó reactividad con eritrocitos D^{IIIa}, D^{IV}, D^{Va}, D^{VI} tipo IV, D^{VII}, DFR, DNU, STEM+, DAR y DAU. No hubo reactividad con eritrocitos D^{IIIc}, D^{Va}, D^V tipo II, D^{VI} tipo I, II y III, Ro^{HAR}, DOL y D débil tipo II. En estudio de campo, no se detectaron reacciones falsas negativas ni falsas positivas. Se obtuvo un heterohibridoma estable, productor de anti-D de tipo IgM, con cualidades suficientes para ser utilizado en la tipificación sanguínea. Dadas las excelentes cualidades del anticuerpo, estamos realizando evaluaciones con diferentes medios de dilución y con adición de anticuerpos tipo IgG, con el fin de fabricar un reactivo para uso en la hemoclasificación.

Obtention of a heterohybridoma for production of type IgM monoclonal antibodies against the D antigen of the Rh system.

Invest Clín 2007; 48(1): 57 - 67

Key words: Heterohybridoma, monoclonal antibodies, anti-D specificity.

Abstract. The objective was to obtain a heterohybridoma capable of producing a monoclonal antibody with IgM type anti-D specificity (Rh system), that could be used as a reactive for hemoclasification. Mononuclear cells (MNC) were extracted from a blood sample of a highly sensitized woman, five days after giving birth to an Rh positive child. These were then transformed with the culture supernatant (CSN) of B05.8 cells, rich in Epstein Barr virus (EBV). Once transformed and in exponential growth, they were fused with K6H6/B5 line cells using PEG 4.000 as a fusing agent in a 1:1 proportion. After fusion, they were seeded in culture plates in order to evaluate the formation of hybrids and the secretion of specific antibodies in the CSN of each well. The efficiency of the fusion was 1.8×10^{-6} , making it possible to obtain an anti-D IgM producing clone, which we named BMS-9. This clone could be maintained in constant culture for three months, producing antibodies in a concentration of $4 \mu\text{g}/\text{mL}$ in de CSN. It was also possible to obtain antibodies with an Artificial Capilar System (ACS) reaching a concentration of $24 \mu\text{g}/\text{mL}$. Potency was determined using Ror cells. In CSN at immediate centrifugation (IC): 1×32 , score 52; 15' from incubation at room temperature (RT): $1 \times 1,024$ score 105. With that ACS product at IC: 1×32 score 54; 15' from incubation at RT: 1×8.192 score 136; and a 37°C : $1 \times 8,192$ score 136. Reactivity was detected with red cells D^{IIIa}, D^{IV}, D^{Va}, D^{VI} type IV, D^{VII}, DFR, DNU, STEM+, DAR y DAU. There was no reactivity with red cells D^{IIIc}, D^{Va}, D^V type II, D^{VI} types I, II y III, Ro^{HAR}, DOL and weak D type II. During field study, no false negative or false positive reactions were detected. A stable heterohybridoma was obtained, producer of IgM type anti-D, with enough qualities to be used in blood typing. Given the excellent qualities of the antibody, we are evaluating dilution media and the addition of type IgG antibodies in order to manufacture a reactive for use in hemoclassification.

Recibido: 16-01-2006. Aceptado: 06-07-2006.

INTRODUCCIÓN

Desde hace casi 20 años los reactivos utilizados en la tipificación sanguínea son de tipo monoclonal (1). Para el reconocimiento de antígenos eritrocitarios conformados por carbohidratos, como los del sistema ABO, los anticuerpos monoclonales se obtienen a través de hibridomas logrados

de la fusión de células linfoides B de ratón sensibilizado y líneas celulares especiales de mieloma de ratón (P3-X63.Ag8.653) (2-4). Sin embargo, la producción de anticuerpos contra los antígenos del sistema Rh no puede ser obtenida por esta vía, porque el ratón no es capaz de discriminar los epítopes específicos de dicho sistema (5). De allí que inicialmente se fue incursionando en la "in-

mortalización” de linfocitos B de individuos sensibilizados mediante la transformación por el virus de Epstein Barr (VEB), con el fin de obtener clonas linfoides secretoras de anticuerpos en forma continua por cierto tiempo (6-7). Esta experiencia no fue exitosa para algunos investigadores (8-9). Por tal motivo se hicieron ensayos para lograr la obtención de clonas estables a través de la formación de heterohíbridos mediante la fusión de linfocitos B de humanos previamente sensibilizados “inmortalizados” o “transformados” con VEB (10-12), con líneas celulares de mieloma de ratón o con heteromiomas ratón-humano.

Mediante esta metodología se han logrado obtener no sólo anticuerpos con especificidad anti-D, sino también contra los otros antígenos del sistema Rh (13-15).

El objetivo de este trabajo fue obtener un heterohibridoma capaz de producir anticuerpo monoclonal con especificidad anti-D (Sistema Rh) de tipo IgM, que pueda ser utilizado como reactivo en la hemoclasificación.

MATERIALES Y METODOS

Fuente de linfocitos B sensibilizados

Se obtuvieron de una muestra de 20 mL de sangre periférica de una mujer D- negativo previamente sensibilizada, con título de anti-D en $1 \times 2,048$, extraída al 5to día del post parto de un RN D-positivo. Dicha muestra permaneció a temperatura ambiente (TA) por 12 horas aproximadamente para luego ser diluida v/v en PBS pH 7,2. La sangre diluida se colocó sobre una solución comercial de Ficoll Isopred d: 1,077 (Robbins Scientific Corporation), contenida en tubos plásticos estériles de 15 mL (Greiner Cat N° 188261) en una proporción 2:1. Los tubos se centrifugaron a 500 g durante 15 minutos, con el fin de obtener en la interfase ficoll - plasma diluido, el anillo de células mononucleares (CMN). Dicho anillo se ex-

trajo cuidadosamente utilizando para ello una pipeta Pasteur estéril. Las CMN se lavaron 3 veces con medio de cultivo RPMI 1640 1X (Sigma Cat N° R-5382) centrifugando a 400 g durante 7 minutos. Por último las células se contaron en cámara de Neubauer obteniéndose la cantidad de 20×10^6 células.

Transformación de las CMN con VEB

Como agente transformador se utilizó el sobrenadante de cultivo de las células B95.8 (línea celular linfoblastoide que proviene de los monos marmoset, las cuales están infectadas con el VEB por lo que producen y secretan viriones) (16). Este sobrenadante se mezcló con las CMN a razón de 1 mL por cada 1×10^6 células y se incubó a 37°C por 2 horas. Posteriormente se le añadió medio RPMI 1640 con 10% de SFB y 2 mM de L-glutamina (Sigma, G-7513) mas fitohemaaglutinina (PHA) a $4\mu\text{g}/\text{mL}$, en un volumen igual al triple del sobrenadante de células B95.8 añadido previamente. El volumen total de 80 mL se sembró en un frasco plástico de 162 cm² (Costar Cat N° 3151), se incubó en incubadora de CO₂ al 5% y luego de 15 días, se procedió a la fusión.

Fusión

Como pareja de fusión se utilizaron células de heteromioma de la línea K6H6/B5 (ATCC CRL 183), las cuales son mantenidos bajo congelación. Esta línea fue lograda mediante la fusión de células de mieloma de ratón balb/c denominada N5-1-Ag4 y células de linfoma nodular humano. Después de descongeladas, se suspendieron en medio de cultivo RPMI 1640, con SFB al 10% y gentamicina $50\mu\text{g}/\text{mL}$. Se contaron en cámara de Neubauer y se les chequeó su viabilidad (la cual debía ser mayor al 90%) con azul tripano al 0,4% a partes iguales. Se mantuvieron en cultivo hasta alcanzar la fase exponencial de crecimiento, requisito para la fusión.

Luego se procedió a unir la línea celular K6H6/B5 con las células linfoides B transformadas en una proporción 1:1. Se centrifugaron a 400 g por 5 minutos en tubo plástico estéril de 50mL (Greiner, Cat N° 227270). Se descartó el sobrenadante con cuidado, asegurando que el *pellet* quedara lo más seco posible y se mezcló vigorosamente en mezclador eléctrico para asegurar una buena suspensión celular. Posteriormente, se añadió 1 mL de polientilenglicol (PEG) de PM 4.000 (Merck, Cat N° 1.097727) al 45% gota a gota durante un minuto, mezclándose continuamente. La mezcla se incubó en baño de María a 37°C en movimiento suave y constante por 90 segundos. Luego se añadieron 2 mL de PBS durante 1 minuto, seguido de 2 mL en 2 minutos y 5 mL en 2 minutos más. Se completó el volumen hasta 20 mL con PBS añadiéndolo lentamente y mezclando continuamente. El tubo se mantuvo en reposo a TA por 15 minutos. Se centrifugó a 400 g por 5 minutos y se removió el sobrenadante. Se añadió medio de crecimiento compuesto por medio de cultivo RPMI 1640 con 10% de SFB, 2mM de L-glutamina (Sigma, G-7513), 1mM de piruvato de sodio (Sigma S-8636), 10^{-4} M de hipoxantina, $1,6 \times 10^{-5}$ de timidina, 4×10^{-5} de aminopterina (Sigma H-0262) y 10mM de ouabaína (Sigma O-5754). Se sembraron 2×10^6 células/mL, a razón de 100 μ L/pozo en placas (Greiner Cat N° 655180) de 96 pozos fondo plano.

Después de 7 días en incubación, se reemplazó el medio, eliminando la aminopterina y la ouabaína, luego se añadió sobrenadante de cultivo de la línea J744-2 (línea tumoral macrofágica de ratón, productora de sustancias que favorecen el crecimiento celular) al 10% y gentamicina a 50 μ g/mL. A los 14 días post fusión los pozos fueron evaluados.

La eficiencia de fusión se calculó mediante el logaritmo neperiano del número total de pozos sembrados entre el número

de pozos sin crecimiento de híbridos, multiplicado por 1/número de células sembradas en cada pozo ($EF = \ln (Wt/Wn) \times 1/N$) (17).

Evaluación de los sobrenadantes de cultivo (SNC)

Se tomaron alícuotas de 50 μ L de SNC de cada pozo y se colocaron en placas de 96 pozos para hacerlos reaccionar con eritrocitos D-positivo papainizados. Se le añadió a cada pozo 25 μ L de la suspensión de eritrocitos al 1%, se mezclaron y se incubaron a TA por 30 minutos. Luego se leyó cada placa inclinándola en un ángulo de 45° y observando el fondo de los pozos. Se consideró reacción positiva cuando se evidenció, en el fondo del pozo, dispersión de las células o presencia de un botón firme, indicando presencia de anticuerpos de tipo IgM o IgG aglutinantes directos. Se consideró reacción negativa cuando se observó corrimiento del botón en el fondo del pozo. A los pozos negativos, previo lavado con solución salina 0,9%, se les añadió 50 μ L de antiglobulina humana (AGH) y se reevaluó la reactividad con el fin de detectar presencia de anti-D de tipo IgG no aglutinantes directos.

Las células contenidas en los pozos con señal positiva se expandieron y se clonaron cuatro veces por procedimiento de dilución límite (a razón de 1, 0,5 y 0,25 células por pozo), para asegurar la monoclonalidad.

Caracterización y cuantificación del anticuerpo

La caracterización de la clase de inmunoglobulina fue realizada mediante la implementación de un inmunoensayo enzimático (ELISA) de captura. El tipo de cadena liviana se determinó mediante el método de doble difusión en gel de agarosa (Ouchterlony) (18-19).

Para la cuantificación de los anticuerpos se utilizó un estuche diagnóstico co-

mercial Tina-quant® de laboratorios Roche, (método turbidimétrico). Se siguieron las instrucciones del fabricante.

Producción de anticuerpos a mayor escala

Se utilizó el Sistema Capilar Artificial Cellmax^R (Cellco, Spectrum Company) siguiendo las instrucciones del fabricante.

Evaluación Inmunoematológica

Se realizó la evaluación tanto en SNC como en el producto de las cosechas obtenidas con el Sistema Capilar Artificial (SCA) (20).

- Especificidad: se evaluó utilizando un panel de células comercial (Resolve RA 445 Ortho®) que incluía células R₀r, R₁R₁, R₂R₂, r[']r, r^{''}r, rr, así como con células A₁ y B D-negativo. Se incluyeron células de fenotipos raros: Variantes D-débiles y D-parciales.
- Potencia: se determinó realizando titulaciones al medio con solución de albúmina bovina al 2-3%, utilizando eritrocitos R₀r en suspensión al 3-5%. La potencia fue considerada como la recíproca de la mayor dilución del SNC o del producto del SCA, en la que la reacción resultó positiva 1+. Las lecturas de las reacciones se realizaron a centrifugación inmediata (CI), y después de incubar a TA por 15' y a 37°C por 20'. A las reacciones se les dio un valor de score: 4+ = 12; 3+ = 10; 2+ = 8; 1+ = 5 (21).
- Aidez: Se evaluó en lámina utilizando el SNC no diluido. Se utilizaron células R₁r al 50%. Se mezclaron 50 µL de la suspensión celular y 50 µL del SNC y se leyó sobre lámpara de luz incandescente en movimiento constante. Las aglutinaciones se registraron como mayores o menores a 1 mm desde el momento en que comenzó la aglutinación hasta el final del tiempo de eva-

luación correspondiente a la estabilización de los aglutinados.

- Aglutinación espontánea: Se utilizaron eritrocitos O rr, fuertemente sensibilizados con reactivo anti e, los cuales autoaglutinaban en medio de alta proteína.
- Evaluación de efecto prozona: Se utilizaron tres células R₁r diferentes y cada una se incubó a TA por 15', 30' y 60' respectivamente. A cada tubo se le añadió una gota del reactivo y una gota de la suspensión de eritrocitos, se mezcló e incubó, se centrifugó y se leyó por aglutinación. Si el grado de aglutinación permanece igual o se incrementa en los diferentes tiempos de incubación, no existe fenómeno de prozona. Si decrece con la incubación si hay prozona. Debe obtenerse al menos 2+ de aglutinación en todos los tiempos.
- Evaluación de campo: Se realizaron evaluaciones en donantes de sangre al azar, D-positivo y D-negativo en forma paralela con el reactivo comercial en uso por el banco de sangre (Bioschile®).

RESULTADOS

De las 20 placas sembradas, se obtuvo crecimiento de células híbridas en 602 pozos. Inicialmente se detectaron 06 pozos con señal positiva: uno reaccionó directamente y los otros cinco por AGH. Se expandieron los pozos de los cuales sólo permaneció la señal positiva en el que resultó con aglutinación directa y en uno que aglutinó por AGH. La eficiencia de fusión fue de $1,8 \times 10^{-6}$ (17).

Luego de clonar y reclonar al pozo inicialmente positivo por aglutinación directa mediante el procedimiento de dilución límite, se obtuvo una clona única productora de anti-D.

El isotipo del anticuerpo resultó ser IgM-kappa. Al cuantificar el anticuerpo, se obtuvieron concentraciones de 4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ en SNC y de 24 $\mu\text{g}/\text{mL}$ del SCA. A esta clona se le denominó BMS-9.

La clona se mantuvo en cultivo continuo produciendo anticuerpos por 3 meses y en el SCA por 45 días, lográndose obtener 12 cosechas de 10 mL cada una.

Evaluación Inmunoematológica

La especificidad se determinó evaluando el SNC con un panel de células comercial, con fenotipos normales positivos y negativos (Tabla I).

Se apreció clara reactividad con las células D-positivo y ausencia de reactividad con las D-negativo. También se obtuvieron resultados negativos al hacer reaccionar el SNC con células A₁ y B D-negativo.

En la Tabla II se señala la potencia del anticuerpo. Los títulos detectados en el SNC y en el SCA se incrementaron al incubar a TA y mantuvieron su reactividad después de incubar a 37°C. En los anticuerpos producidos a través del SCA, se apreció un incremento del título después de incubar a TA, con respecto a los obtenidos en SNC, lo

cual permitirá su dilución en caso de producir reactivos.

En la Tabla III se puede apreciar el comportamiento de los anticuerpos secretados por la clona BMS-9, demostrando reactividad con algunas variantes parciales y débiles del antígeno D y ausencia de reactividad con células con muy poca expresión antigénica como lo son las variantes D^{VI} tipo I, II y III y la variante R₀^{HAR}.

Al evaluar la avidez del anticuerpo producido en SNC se obtuvo aglutinación de menos de 1mm a los 18" de observación y de más de 1 mm a los 25". Se comparó con la avidez demostrada por un reactivo comercial (Bioschile^R): aglutinación de menos de 1mm en 4" y en más de 1 mm en 10". Cabe señalar que los anticuerpos del SNC están diluidos en medio de cultivo y no contienen potenciadores que usualmente acompañan a los reactivos comerciales.

Al hacer reaccionar el SNC con células D-negativo fuertemente sensibilizadas contra el antígeno "c", el resultado como era de esperar fue negativo ya que el medio de suspensión de los anticuerpos es muy bajo en proteínas. No se detectó presencia de fenómeno de prozona.

TABLA I
REACTIVIDAD DEL SNC DE LA CLONA BMS-9 CON PANEL COMERCIAL

R ₁ ^w R ₁	R ₁ R ₁	R ₂ R ₂	R ₀ r	r'r	r'r	rr	rr	rr	rr	R ₁ R ₁
2+	3+	3+	2+	0	0	0	0	0	0	3+
3+	4+	4+	3+	0	0	0	0	0	0	4+
3+	4+	4+	3+	0	0	0	0	0	0	4+

TABLA II
POTENCIA MEDIDA EN SNC Y EN SCA DE LA CLONA BMS-9 EN SOLUCIÓN DE ALBÚMINA BOVINA AL 3%

	Centrifugación inmediata	TA por 15'	37°C por 20'
SNC-Título	1 × 32	1 × 1024	1 × 1024
SNC-Score	52	105	105
SCA-Título	1 × 32	1 × 8192	1 × 8192
SCA-Score	54	136	136

TABLA III
EVALUACIÓN DEL SNC DE LA CLONA BMS-9 CON VARIANTES D-DÉBILES Y D-PARCIALES

D ^{IIIa}	D ^{IIIc}	D ^{IV}	D ^{IV} tipo IV	D ^{IVa}	D ^{Va}	D ^V tipo II	D ^{VI} tipo I	D ^{VI} tipo II	D ^{VI} tipo III
+	0	+	+	0	+	0	0	0	0
S:8	S:0	S:9	S:4	S:0	S:7	S:0	S:0	S:0	S:0

D ^{VII}	DFR	DNU	R ₀ ^{HAR}	STEM+	DAR	DOL	DIM	DAU	D débil tipo 2
+	+	+	0	+	+	0	0	+	0
S:6	S:5	S:4	S:0	S:8	S:4	S:0	S:0	S:9	S:0

Se realizaron 209 determinaciones en donantes de sangre D-positivo y 20 en donantes D-negativo en paralelo con el reactivo comercial Bioschile^R (Tabla IV).

De las 209 muestras D-positivo, el 99,5% demostró reactividad fuerte 3+ y 4+ con ambos reactivos. Se evidenció una sola diferencia en cuanto a la fuerza de la reacción (de 4+ vs 2+), lo cual está permitido para validar un anticuerpo para uso en la hemoclasificación (20). Las 20 muestras D-negativo resultaron igualmente negativas.

DISCUSIÓN

En este trabajo se describe un método práctico para obtener heterohíbridos productores de anticuerpos contra antígenos del sistema Rh, fusionando células linfoides de una mujer previamente sensibilizada después del parto y células de heteromiéloma. Previamente en el laboratorio se habían realizado varios experimentos utilizando células de miéloma de ratón P3-X63.Ag8.653 así como otra línea de heteromiéloma (SMH-D33, ATCC CRL 1668) pero los resultados fueron pobres, obteniéndose heterohíbridos muy inestables que dejaron de producir anticuerpos al poco tiempo de formados, por presentarse el fenómeno de segregación cromosómica (22). También se

habían utilizado diferentes mecanismos de fusión: química con PEG de PM 1.300-1.400 (5-7) y por medio eléctrico o electrofusión (17). Con este último método se obtuvo mejor eficiencia de fusión ($1-3 \times 10^{-6}$) que con la química ($1-5 \times 10^{-7}$), pero el resultado final fue el mismo, clonas inestables o de baja capacidad secretora aunque se logró obtener una productora de anti-D IgG de bajo título (datos no mostrados). Igualmente se hicieron experiencias utilizando linfocitos congelados y linfocitos frescos, obteniéndose mejor eficiencia de fusión con los últimos. En el presente informe, utilizando PEG 4.000, la eficiencia de fusión fue de $1,8 \times 10^{-6}$ y de una sola fusión se logró obtener dos clonas, una IgG (cuya evaluación no fue objeto de presente trabajo) y otra IgM.

La capacidad de producir anticuerpos monoclonales a través de heterohibridomas depende de muchos factores, como por ejemplo del estado de la respuesta inmunológica del donante, el cual va variar según haya ocurrido o no una estimulación reciente. Se ha podido demostrar (y es nuestra experiencia) que la posibilidad de obtener híbridos productores es mayor, mientras mas precoz sea la toma de la muestra después del re-estímulo (menos de 7 días posterior al reestímulo) (23). En el presente estudio

TABLA IV
REACTIVIDAD DE LOS ANTICUERPOS DE LA CLONA BMS-9 PRODUCIDOS EN SCA VS REACTIVO COMERCIAL

Aes de la clona BMS-9	Reactivo Comercial	Total de pruebas
4+	4+	184 (88,0%)
3+	3+	08 (3,8%)
3+	4+	13 (6,2%)
4+	3+	03 (1,4%)
2+	4+	01 (0,5%)
0	0	20 (100%)

Se ha trabajado en la obtención de heterohíbridos productores de anti-D, de manera que puedan ser utilizados en la producción de reactivos de hemoclasificación. Después de utilizar diferentes protocolos de fusión (10-12), obtuvimos un heterohíbrido estable productor de anti-D de tipo IgM al fusionar linfocitos B humanos con células de heteromioma de la línea K6H6/B5. Luego de caracterizar el anticuerpo en sobrenadante de cultivo, se hicieron las evaluaciones correspondientes para determinar su potencialidad como reactivo en la hemoclasificación.

se utilizaron linfocitos B de una mujer sensibilizada con alto título (1×2048) obtenidos a los 5 días del post parto de RN D-positivo, los cuales fueron rápidamente “inmortalizados” con el VEB y sometidos posteriormente a la PHA con el fin de eliminar o inactivar a las células citotóxicas específicas para el virus.

La ausencia de una eficiente pareja de fusión, aunado a artefactos técnicos introducidos por el VEB que reducen la eficiencia de fusión, han hecho que la obtención de heterohibridomas sea un proceso, largo, laborioso, costoso y de resultados impredecibles (24). Se sabe que el VEB solo puede inmortalizar poblaciones de linfocitos B en reposo; por ello los hibridomas son el reflejo de linfocitos B activados pero no totalmente diferenciados en células plasmáticas. Estas últimas células son ricas en ARNm pero lamentablemente incapaces de fusionarse (25). La utilización de la línea K6H6/B5 como pareja de fusión fue también un factor determinante en la consecución de nuestro objetivo ya que utilizando las líneas P3-X63.Ag8.653 y SMH-D33 los resultados fueron desalentadores por la inestabilidad de las clonas.

Debido a lo difícil que resulta obtener heterohíbridos estables productores de anticuerpos, en los últimos años ha habido un intenso desarrollo de las técnicas recombinantes, que ofrecen mayor rendimiento en calidad de anticuerpo, en tiempo de producción y en costos (26-28).

Tanto los títulos alcanzados por anticuerpos generados por la clona BSM-9 como la concentración de los anticuerpos, están dentro de lo reportado en la literatura (6-8, 14).

El hecho de haber logrado una clona estable productora de anticuerpos anti-D de tipo IgM con las características señaladas, ha sido una experiencia exitosa no solo por lo difícil de obtener una clona estable sino por el comportamiento de los anticuerpos que esta genera, demostrando su potencialidad para uso como reactivo en la hemoclasificación. Esta potencialidad está avalada por los resultados en el estudio de campo en el que no se evidenciaron reacciones falsas negativas. Se logró evaluar 209 muestras de donantes de sangre D-positivo y 20 muestras de donantes D-negativo, sin detección de discrepancias en cuanto a la positividad o negatividad de las reacciones, al

compararlos con los resultados obtenidos con el reactivo comercial.

La capacidad de un anticuerpo IgM para detectar antígenos D-débiles, depende de la avidéz del anticuerpo. Por tal motivo, al producir un reactivo para la hemoclasificación, se recomienda realizar mezclas oligoclonales de IgM monoclonal de alta avidéz con IgG mono o policlonal. Los anticuerpos IgG permitirán la detección de dicho antígeno utilizando el reactivo de AGH, en caso de que no pudiera ser detectado por el IgM (29). La capacidad de un monoclonal para detectar D-parciales depende de la especificidad fina del anticuerpo. El antígeno D está constituido por un mosaico de epítopes, algunos de los cuales no existen en individuos D-parciales. En los cuatro *workshops* internacionales para el estudio de los anticuerpos monoclonales, estas características han sido estudiadas exhaustivamente (30-32). En estas evaluaciones se pudo evidenciar que no existe ningún monoclonal anti-D que reconozca todas las variantes.

En el banco de sangre, para el tipeaje de donantes se requiere que el reactivo empleado reconozca todas las variantes, con el fin de limitar la posibilidad de sensibilización en individuos D-negativo a través de la transfusión, aunque sea controversial la capacidad inmunizante de estas variantes (33-34). De allí que la estrategia mas frecuentemente utilizada es la de combinar un anti-D IgM de alta avidéz que reaccione con variantes D^{IV} y D^V pero que no reaccione con las variantes D^{VI}, junto a un policlonal o monoclonal de tipo IgG que pueda detectar a estas variantes y otros D-débiles. Sin embargo, para la tipificación de pacientes, con el IgM de alta avidéz podría ser suficiente ya que la no detección de ciertas variantes D-parciales, como la D^{VI} (que es mas frecuente en caucásicos), podría catalogar a dicho paciente como D-negativo y ser transfundido con sangre D-negativo, lo cual lo

protegería de una sensibilización futura contra los epítopes que no posee.

De cualquier manera, las características finales del reactivo en producción deberán estar bien especificadas en el instructivo que lo acompañe.

Dada la buena calidad del anticuerpo obtenido en el presente estudio, se ha pensando en su producción a mayor escala, a fin de utilizarlos como reactivo en el banco de sangre para la hemoclasificación en pacientes, por lo que siguiendo las recomendaciones internacionales se está evaluando el comportamiento de los anticuerpos: 1) Utilizando diferentes medios de dilución, a manera de obtener la mejor reactividad en el trabajo de rutina y 2) Haciendo mezclas oligoclonales tanto con anticuerpos IgG monoclonales obtenidos en nuestro laboratorio, como con anti-D policlonales para utilización en donantes.

Además, estos anticuerpos pueden ser potencialmente utilizables para otros desarrollos tecnológicos con el fin de producir recombinantes de utilidad múltiple (26-28), o para conjugarlos y utilizarlos en ensayos para la detección de hemorragia materno fetal (en proyecto por nuestro laboratorio).

AGRADECIMIENTO

Nuestro especial agradecimiento al Dr. Ramón Montaña, investigador del laboratorio de Biología Celular del IVIC por su apoyo al proporcionarnos las líneas celulares empleadas en el trabajo y al Dr Gregory Halverson investigador del Departamento de Inmunoquímica del New York Blood Center por su asesoría y ayuda en la evaluación de los anticuerpos con células de fenotipos D-débiles y D-parciales.

REFERENCIAS

1. Köhler G, Milstein C. Continuous culture of fused cells suspensions *in vitro*. Nature 1975; 256:495-497.

2. **Messeter L.** Monoclonal Antibodies Against ABO Antigens. *Biotest Bulletin* 1989; 4:9-14.
3. **Voak D, Sacks D, Alderson T, Takei F, Lennox E, Jarvis J, Milstein C, Darnbrought J.** Monoclonal anti-A from Hybrid Myeloma. Evaluation as a Blood Grouping Reagent. *Vox Sang* 1980; 39: 134-140.
4. **Messeter L, Brodin J, Chester M, Low B, Lundblan A.** Mouse Monoclonal antibodies with anti A, anti B and anti AB Specificities, some Superior to human Polyclonal ABO Reagents. *Vox Sang* 1984; 46:185-194.
5. **Mc Cann M, James K, Kumpel B.** Production and use of human monoclonal anti D antibodies. *J Immunol Methods* 1988; 115: 3-15.
6. **Crawford D, Barlow M, Harrison J, Winger L, Huehns E.** Production of human monoclonal antibody to rhesus D antigen. *Lancet* i; 1983:386-388.
7. **Kumpel BM, Poole GD, Bradley BA.** Human monoclonal anti D antibodies. I. Their production, serology, quantitation and potential use as blood grouping reagents. *Br J Haematol* 1989; 71:125-129.
8. **Koskimies S.** Human lymphoblastoid cell line producing specific antibody against Rh-antigen D. *Scand J Immunol* 1980; 11:73-77.
9. **Melamed MD, Gordon J, Ley SJ, Edgar D, Hughes-Jones NC.** Senescence of human lymphoblastoid clone producing anti rhesus (D). *Eur J Immunol* 1985; 15:742-746.
10. **Bron D, Feinberg MB, Teng NNH, Kaplan HS.** Production of human monoclonal IgG antibodies against Rhesus (D) antigen. *Proc Natl Acad Sci USA* 1984, 81:3214-3217.
11. **Thompson KM, Melamed MD, Eagle K, Gorick BD, Gibson T, Holburn AM, Hughes-Jones NC.** Production of human monoclonal IgG and IgM antibodies with anti D (rhesus) specificity using heterohybridomas. *Immunology* 1986; 58:157-160.
12. **Foung SKH, Blunt JA, Wu PS, Ahearn P, Winn LC, Engkeman EG, Grumet FC.** Human monoclonal antibodies to Rho (D). *Vox Sang* 1987; 53:44-47.
13. **Thompson K, Barden G, Sutherland J, Beldon I, Melamed M.** Human monoclonal antibodies to C, c, E, e and G antigens of Rh system. *Immunology* 1990; 71:323-327.
14. **Rapaille A, Francois-Gerard Ch, Donnay D, Sondag-Thull D.** Production of Stable Human-Mouse Hybridomas Secreting Monoclonal Antibodies against Rh D and c Antigens. *Vox Sang* 1993; 64:161-166.
15. **Pasha RPK, Roohi A, Shokri F.** Establishment of human heterohybridoma and lymphoblastoid cell lines specific for the Rh D and C antigens. *Transfusion Medicine* 2003; 13:83-92.
16. **Miller G, Lipman M.** Release of infectious Epstein Barr virus by transformed marmoset leukocytes. *Proc Nat Acad Sci* 1973; 70:190-194.
17. **Harlow E, Lane D.** *Antibodies: A laboratory manual.* Cold Spring Harbor Laboratory, 1988.
18. **Voller A, Bidwell D, Bartlett A.** *Enzyme Immunoassays.* In: *Diagnostic Medicine WHO* 1989; 53:55-65.
19. *Recomendaciones de la Agencia de Administración de drogas y alimentos-FDA de los EEUU para la evaluación de reactivos de hemoclasificación, DOCKET N° 845-0181, marzo 1992.*
20. **Brecher ME.** *Technical Manual, 14th edition.* American Association of Blood Banks, Bethesda, Maryland. Pp698-899.
21. **Ohnishi K, Chiba J, Goto Y, Yokunaga T.** Improvement in the basic technology of electrofusion for generation of antibody producing hybridomas. *J Immunol Methods* 1987; 100:181-189.
22. **Lowe A, Gree S, Voak D, Gibson T, Lennox E.** A human-human monoclonal anti D by direct fusion with lymphoblastoid line. *Vox Sang* 1986; 51:212-216.
23. **James K, Bell GT.** Human monoclonal antibody production current status and future prospect. *J Immunol Methods* 1987; 100:5-40.
24. **Siegel D.** New approaches for monoclonal antibody production. In: Garratty G ed. *Applications of Molecular Biology to Blood*

- Transfusion Medicine. Bethesda, MD: American Association of Blood Bank, 1997.
25. **Winter G, Milstein C.** Man-made antibodies. *Nature* 1991; 349:293-299.
 26. **Watkins N, Ouwehand W.** Introduction to antibody engineering and phage display. *Vox sang* 2000; 78:72-79.
 27. **Siegel D.** Diagnostic and therapeutic applications of phage display technology. In Stowell Ch and Dzik W. *Emerging Technologies in Transfusion Medicine*. American Association of Blood Bank, Bethesda, Maryland 2003.
 28. **Ouwehand W, Watkins N, Garner F and Smethurst P.** Monoclonal antibody therapies in transfusion medicine. *Vox Sang* 2004; 87 (Suppl 2) S151-S154.
 29. **Scott M, Voak D.** Monoclonal Antibodies to Rh D development and uses. *Vox sang* 2000; 78 (suppl 2):79-82.
 30. **Tippett P.** Coordinator's report on group 3: monoclonal Rh antibodies: serological and biological studies. *Rev Francaise de Transfusion et Immunohematologie* 1988; 31:249-258.
 31. **Tippett P, Moore S.** Monoclonal antibodies against Rh and Rh related antigens. *J Immunogenet* 1990; 17:309-319.
 32. **Scott ML.** Rh serologie-Coordinator's report. *Transfusion Clinique et Biologique* 1996; 6:333-338.
 33. **Jones J, Voak D, Scott M, Sonneborn H.** Policies for the selection of monoclonal RhD typing reagents. *Biotest Bulletin* 1997; 5:485-494.
 34. **Jones J, Scott M, Voak D.** Monoclonal anti D specificity and Rh D structure: criteria for selection of monoclonal anti D reagents for routine typing of patients and donors. *Transf Med* 1995; 5:171-184.