

Producción de Anticuerpo Monoclonal (AcMo) con especificidad anti B, para ser utilizado como reactivo de hemoclasificación.

Graciela León, Carlos Cruz y Lola Rojas

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

Palabras clave: Anticuerpos monoclonales, especificidad anti B, hibridomas.

Resumen. El objetivo de este trabajo fue producir un AcMo murino con especificidad anti B, el cual pudiera ser utilizado como reactivo de hemoclasificación. Ratones balb/c fueron inmunizados con sustancia antigénica de saliva de donante secretor, con el fin de obtener linfocitos esplénicos o esplenocitos productores de anticuerpos con especificidad anti B. Estos fueron fusionados con células de mieloma de ratón P3-X63.Ag8.653 utilizando PEG. Después de sembradas, las células híbridas o hibridomas resultantes que tuvieron la capacidad de secretar el anticuerpo requerido, fueron sometidas a clonación por dilución límite para asegurar su monoclonalidad. Posteriormente los anticuerpos fueron sometidos a evaluaciones inmunohematológicas e inmunológicas. Se obtuvo la clona BMS-4 secretora de anticuerpos IgM kappa, con especificidad anti B, los cuales demostraron tener una alta potencia, excelente avidéz, gran sensibilidad y estabilidad en el tiempo. Dado el comportamiento demostrado por los anticuerpos en las evaluaciones realizadas, pensamos que esta clona puede ser utilizada para producir reactivo para la hemoclasificación.

Production of monoclonal antibodies with anti B specificity used as a blood typing reagent

Invest Clin 2004; 45(2): 145 - 157

Key words: Monoclonal antibodies, specificity anti B, hybridomas.

Abstract. The purpose of this research was to produce murine monoclonal antibodies with anti B specificity to be used as reagents in red cells typing. Balb/c mice were immunized with substance B from saliva of a donor secreting B antigen, in order to obtain spleen cells or splenocytes producing antibodies with anti B specificity. These cells were fused with mouse myeloma cells P3-X63.Ag8.653 by using the PEG technique. After seeded, the hybridomas secreting the putative antibodies were cloned through the limiting dilution technique to obtain monoclonality. Afterwards, the antibodies were evaluated using immunological and immunochemical methods. BMS-4 clone secreting antibodies IgM-kappa with anti B specificity were obtained, which displayed high potency, excellent avidity, great sensibility and long time stability. We think that this clone can be used to produce a red cell typing reagent.

Recibido: 29-04-2003. Aceptado: 22-01-2004.

INTRODUCCIÓN

Desde que Karl Landsteiner describió los antígenos eritrocitarios que conforman el sistema ABO (1) a principios del siglo XX, es práctica obligatoria de los bancos de sangre, hacer la tipificación sanguínea de este sistema en donantes y receptores de sangre. De no transfundirse sangre isogrupo o al menos ABO compatible, se correrían grandes riesgos de provocar reacciones hemolíticas intravasculares que conllevarían a una alta morbi-mortalidad. De tal manera que el sistema ABO es de gran importancia clínica, en particular en la Medicina Transfusional y en el campo de los trasplantes de órganos.

Después del advenimiento de la tecnología para producir anticuerpos monoclonales (2) descrita por Köhler y Milstein en 1975 (3), los antiseros policlonales para la hemoclasificación han sido progresivamente sustituidos por los monoclonales. Desde entonces, esta tecnología ha sido utilizada

para producir anticuerpos (acs) contra múltiples antígenos (ags) y para usos diversos (4-10). En el campo de la Medicina Transfusional, a partir de finales de los años setenta y principio de los ochenta, tanto en Inglaterra como en Canadá, se produjeron acs de tipo IgM contra el sistema ABO, con características adecuadas para ser utilizadas en la hemoclasificación eritrocitaria (11-13). Posteriormente estos reactivos fueron producidos en escala industrial con la consecuente disminución en los costos y con distribución casi universal (14-16).

La metodología para producir dichos anticuerpos es laboriosa, ocupa mucho tiempo y es susceptible de afectarse por factores extrínsecos como la contaminación o por factores intrínsecos a la biología celular, al grado de inmunización obtenido en los ratones, al tipo de inmunógeno empleado, etc, los cuales pueden retardar la obtención del producto deseado.

Se han utilizado una amplia variedad de inmunógenos (eritrocitos grupo especifi-

cos, membranas celulares de amígdala humana, líneas celulares de cáncer de colon humano, fluido de quiste de ovario, saliva de individuos secretores, oligosacáridos sintéticos, etc), para producir AcMo específicos contra el sistema ABO (17-18).

Una vez logrados los hibridomas, se requieren rigurosas evaluaciones para garantizar que los anticuerpos secretados por las clonas, sean los idóneos para trabajar en banco de sangre, ya que por ser monoclonales, reaccionan contra un epítotope simple del antígeno utilizado en su generación (19-20). Este hecho podría ser un factor negativo al evaluar la avidéz utilizando eritrocitos de menor expresión antigénica (subgrupos débiles, eritrocitos fetales). De allí que muchas veces tenga que recurrirse a la mezcla oligoclonal de anticuerpos de composición y propiedades bien conocidas.

El objetivo fundamental de este trabajo fue obtener un AcMo murino con especificidad anti B, que reuniera las condiciones suficientes para ser utilizado como reactivo de hemoclasificación.

MATERIALES Y MÉTODOS

Esquema de inmunización

Un grupo de seis ratones balb/c de 8 semanas de nacidos, recibió inoculaciones simultáneas por vía intraperitoneal (IP) y subcutánea (SC) de 1 mg de sustancia antigénica B de saliva de donante secretor, parcialmente purificada (21,22) en 0,5 mL de adyuvante completo de Freund (Sigma Chemical Co). A las cuatro semanas, fueron reestimulados con 20 µg de dicha sustancia en solución salina (ss) por vía intravenosa (IV). A los tres días se sacrificaron para obtener esplenocitos (23).

Fusión y producción de hibridomas

Se realizó utilizando el método de Galfre y col (24) con algunas modificaciones. Se unieron 4×10^7 esplenocitos no lavados

con 8×10^6 células de mieloma de ratón P3-X63.Ag8.653 en crecimiento exponencial en medio DME/F12 (Sigma^R) previamente lavadas en medio sin suero fetal bovino (SFB), a una proporción de 50:1 y utilizando el polietilenglicol (PEG) como agente fusógeno (PEG 1.500 - Merck^R).

Luego de unir las dos líneas celulares en tubo de poliestireno estéril de 50 mL, se centrifugó a 400 g por 7 minutos a temperatura ambiente (TA). Se eliminó el sobrenadante y se adicionó el PEG al 50% en PBS a pH de 7,2 a TA con incubación inicial de 90 segundos y en agitación constante y suave. Se fue agregando PBS cada minuto, de la siguiente manera: 100 µL c/20", luego c/15", c/10" y c/5" hasta cumplirse cuatro minutos. Finalmente se completó la dilución con PBS hasta alcanzar los 10 mL. Se centrifugó y se eliminó el sobrenadante. El botón celular fue resuspendido suavemente en pequeño volumen de medio HAT (hipoxantina 10^{-4} M, aminopterina 4×10^{-5} , timidina $1,6 \times 10^{-5}$ M - SIGMA) suplementado con SFB al 10%, l-glutamina 2 mM, piruvato de sodio 1 mM, penicilina 100 U/mL, estreptomocina 0,1 mg/mL, anfotericina B 0,25 µg/mL, IL-6 (sobrenadante de la línea celular J744-2) al 10% (22), e insulina 20 UI/mL. Luego se completó hasta alcanzar una concentración final de 2×10^6 células/mL y se sembró en placas de 96 pozos (Greiner^R) a razón de 100 µL/pozo, previamente acondicionados con células nodrizas a razón de 100 µL de una suspensión a 2×10^5 cel/mL. Se incubó a 37°C en atmósfera húmeda y CO₂ al 5%. A partir del día 8 se comenzó a realizar el pesquiasaje en los sobrenadantes de los pozos con crecimiento celular y a partir del día 12, se eliminó la aminopterina de la preparación.

Tamizaje de anticuerpos

A partir del 8vo día post-fusión, se comenzaron a realizar las pesquias de acs en

los sobrenadantes de cultivo (SNC) de cada uno de los pozos en los que se evidenciaba crecimiento celular. Cada SNC fue evaluado con células A₁, B y O a una concentración de 3-5 % en ss. Dicha pesquisa se hizo en placa de fondo en U, agregando para cada evaluación 100 µL de SNC y 50 µL de la suspensión de eritrocitos. Se incubaron a TA por 1 hora y se leyó por aglutinación macroscópica. Los que dieron señal positiva anti B fueron evaluados con eritrocitos A₁B y A₂B. Se escogieron según su especificidad, potencia y avidez.

La especificidad se evaluó haciendo reaccionar los SNC con suspensiones celulares de diferentes fenotipos: A₁, A₂, A₁B, A₂B, B y O. Este ensayo se hizo en tubos de vidrio 12 × 75 mm agregando una gota del SNC y una gota de la suspensión celular. Después de incubar a TA por 1' y 5' se centrifugaron y leyeron en cruces (de 0 a 4+): el botón de células fue suavemente desprendido del fondo y examinado macroscópicamente en lámpara de Clay Adams^R. Las reacciones intermedias se reportaron con 1/2 + adicional. Se consideró reacción en campo mixto cuando la lectura fue mayor de 1+ pero con el fondo turbio.

A cada lectura en cruces, se le dio un valor numérico así: 4+ :8; 3+ :6; 2+ :4; 1+ :2, 1/2+ :1, cuya sumatoria al final de la titulación reflejó el valor del tanteo o "score". El tubo control con el diluyente debía dar negativo.

La potencia se determinó haciendo titulaciones al medio, igualmente con eritrocitos al 5% en ss.

La avidez se determinó según el tiempo en segundos requerido para dar una aglutinación visible en lámina de opalina, agregando 50 µL del SNC a evaluar y 50 µL de la suspensión de eritrocitos al 50%, mezclándose suavemente.

En cada caso se realizaron controles utilizando reactivo comercial Dominio^R.

Clonamiento

Los pozos seleccionados se dejaron crecer, se contaron las células y se diluyeron en medio por el método de dilución límite, de manera que quedarán 0,5, 1 y 2 células en cada pozo al sembrarlas (100 µL por pozo). Las placas estuvieron previamente preparadas con células nodrizas (1 × 10⁴ Cel/pozo). Este procedimiento se repitió hasta 4-5 veces para asegurar la monoclonalidad (es decir, que clonando a 0,5 - 1 cel/pozo, al menos en el 40 % de los pozos existan híbridos creciendo y que en el 80% de ellos haya producción del anticuerpo).

Los híbridos obtenidos fueron congelados en nitrógeno líquido (NL) e inoculados en cavidad peritoneal de ratones balb/c para inducir la formación de ascitis (25).

Evaluación inmunohematológica (26, 27)

Controles. Se utilizó como control, al reactivo comercial Dominio^R el cual fue sometido a las mismas condiciones que el producto evaluado.

Potencia. La titulación (en tubo) se comenzó partiendo del LA sin diluir, con el cual se prepararon diluciones al medio en buffer (solución de EDTA 20 mM, ClNa 2%, azida de sodio 0,1% y albúmina al 3% a pH 7,2). Este buffer fue el medio de dilución que empleamos en la elaboración del producto final. Se utilizaron células B y A₁B. Las lecturas se hicieron a centrifugación inmediata, a 1 y a 5 minutos post incubación a TA.

Especificidad. Se comprobó la especificidad haciéndolos reaccionar inicialmente con una suspensión de células B y tres de A₁B. Se completó la evaluación utilizando en total ocho muestras diferentes de fenotipo B y A₁B, así como con células A y O (negativas para el antígeno B).

Con estas reacciones se debió demostrar también la ausencia o presencia de hemólisis y/o fenómeno de rouleaux. La reac-

tividad con una célula positiva para el antígeno específico, debió ser por lo menos de 2+. La prueba se consideró satisfactoria cuando no más de 1 de 8 donantes, resultó con una reacción inferior a 2+.

Para demostrar la ausencia de anticuerpos contaminantes, (diferentes a los acs anti ABO) se utilizó Resolve Panel A (Ortho^R). El LA se puso en contacto con las diferentes células del panel y las evaluaciones se hicieron a centrifugación inmediata, a los 15' de incubación a TA, adicionándoles albúmina bovina al 22%, a 37°C de incubación por 20' y por antiglobulina humana.

También se realizaron ensayos de inhibición de la aglutinación: el LA se diluyó en ss de manera que el título no fuera mayor de 1:128. El LA diluido se puso en contacto con igual volumen de saliva secretora de sustancia antigénica B (donante B secretor) y con ss v/v como control. Ambas mezclas se incubaron a TA por 15 minutos, se hicieron reaccionar con eritrocitos B y se leyeron por aglutinación.

Avidez. Se realizó con LA no diluida, diluida 1:2 y 1:20 con el diluyente mencionado anteriormente, utilizando como control el reactivo comercial. Se utilizó el método antes descrito y se registró el tiempo en el que se detectó aglutinación menor y mayor o igual a 1mm.

Determinación de aglutinación espontánea. Se utilizaron eritrocitos "O" Rh negativo con fenotipo dcee, los cuales fueron sensibilizados con anti c, mostrando positividad fuerte (3/4+) con la prueba de antiglobulina humana directa, con el autocontrol negativo.

Al realizar la tipificación ABO en evaluación, con estas células la reacción debía resultar negativo.

Evaluación del producto final

Estabilidad. El LA original, se diluyó con el buffer antes mencionado, y fue evaluado en el tiempo: a) En viales conservados

a 4°C, se evaluó mensualmente la potencia y la avidéz según lo señalado anteriormente. b) En viales conservados a 37°C (temperatura que acelera la degradación de los anticuerpos). se evaluó la potencia.

Como control se utilizó reactivo comercial, sometido a las mismas condiciones.

Sensibilidad: Se implementó un trabajo de campo con el fin de evaluar el funcionamiento de los anticuerpos ante una amplia gama de muestras en diferentes bancos de sangre del área metropolitana de Caracas, incluyendo dos maternidades en las que se evaluó únicamente con células de cordón.

Determinación del isotipo de los anticuerpos

Se realizó mediante dos técnicas: doble difusión o método de Ouchterlony y por ELISA indirecto.

Método de Ouchterlony (23). Se utilizó el LA diluido 1:20 para disponerlo en el orificio central (5ul) y se utilizaron antisueños específicos (anti μ , anti 2a, anti 2b, anti 3, anti γ , SIGMA^R) en cada orificio de la periferia de la roseta. Se incubó durante 14-18 horas en atmósfera húmeda y posteriormente se evaluó la formación de halos de precipitación.

Técnica de ELISA indirecto en SNC (28). Para ello se utilizó como antígeno específico, el proveniente de saliva de donantes secretores parcialmente purificado (21).

Estandarización preliminar: Con el fin de establecer la concentración óptima de ag de saliva a utilizar y la dilución óptima de SNC a evaluar, se realizó un primer ELISA, de la siguiente manera: Se utilizaron microplacas MaxiSorp Nunc^R de poliestireno con fondo en U, las cuales se sensibilizaron con 100 μ L de ag de saliva solubilizado en buffer carbonato-fosfato a pH 9,6 con incubación durante 16-18 horas a 4°C. Las concentraciones elegidas fueron de

200, 50 y 12,5 ng/100 µL. Para el bloqueo de la placa se empleó 200 µL de gelatina (Biorad[®]) al 0,5% en PBS a pH 7,2, durante 1 hora a 37°C. Como anticuerpo primario se utilizó el SNC sin diluir y diluido 1:5 en PBS-Tween al 0,1%. Se incubó por 1 hora a 37°C en cámara húmeda. Como conjugado se empleó un anticuerpo polivalente de conejo (anti G, M, A de ratón, SIGMA[®], A0412) conjugado con peroxidasa de rábano picante diluido 1:500 en PBS-Tween 0,1%. A cada pozo se colocó 100 µL del conjugado y se incubó por 1 hora a 37°C en cámara húmeda. Como sustrato se utilizó una solución de peróxido de hidrógeno al 0,5% y 2,2' azino-di (ácido 3-etilbentiazolino 6 sulfónico)-(ABTS) 36mM en buffer citrato de sodio pH 4,4 que se incubó a TA en oscuridad. Las lecturas de las absorbancias se obtuvieron en un lector de ELISA a 405 nm a los 15', 30' y 45'. Se corrieron junto a los controles correspondientes.

Determinación del isotipo: se usaron estándares de isotipo (Pierce[®] N° 37501) y SNC diluido 1:5 (según resultado de la estandarización anterior). Luego que las placas fueron sensibilizadas y bloqueadas se agregó el SNC, se incubó por 1 hora a 37°C en cámara húmeda y se lavó. A cada pozo se le agregó el antisuero de conejo (IgG) específico para cada clase y subclase de inmunoglobulinas de ratón y se incubó por 1 hora a 37°C. Se utilizó conjugado de cabra, anti IgG de conejo diluido 1:2000 a 100 µL/pozo y se incubó por 1 hora a 37°C. Luego de añadir el sustrato (ABTS), se leyó a 405 nm a los 30'. Como control positivo se utilizó conjugado de ratón polivalente unido a peroxidasa a una dilución 1:5.000.

Cuantificación de IgM Mo por inmunodifusión radial cuantitativa (Manzini) (23)

Se mezcló agar noble o azarosa con IgG de conejo anti IgM de ratón (producido en nuestro laboratorio) a una dilución final

de 1:20. Para los controles o patrones de referencia se utilizó la IgM purificada (SIGMA M-3795) sin diluir y las muestras a evaluar se dispusieron sin diluir, diluidas 1:2 y 1.4. Se incubó en una cámara húmeda por 24-48 horas a TA. Las lecturas se realizaron midiendo dos diámetros perpendiculares entre sí de cada uno de los anillos de precipitación, con un visor con escala graduada incorporada. Se calculó el valor promedio de las lecturas de los dos diámetros. Se obtuvo la línea de tendencia para el cálculo de la concentración proteica (curva patrón): a cada concentración conocida de IgM, se le midió ambos diámetros y su promedio fue graficado en el eje de la ordenada. También se le calculó el Log10 y se graficó en la abscisa. De la ecuación generada, conociendo el valor promedio de los diámetros del halo de inmunodifusión de la muestra en estudio, se calculó el valor de la x, es decir, se obtuvo el Log10 de la concentración de dicha proteína, cuyo anti Log correspondió a su concentración en µg/10 µL. Se hizo la conversión a mg/mL y se multiplicó por el factor de dilución. Se calculó el promedio.

RESULTADOS

Después de utilizar el esquema de inmunización señalado y posterior a la fusión, se sembraron nueve placas de 96 pozos. A los 21 días en incubación, se obtuvieron 297 pozos con híbridos creciendo (34% del total). De ellos, cuatro pozos (B2, B6, C2 y F12) dieron señal positiva (variable entre 2+ y 4+) con las células B, A₁B y A₂B y señal negativa con eritrocitos A y O. Solo el sobrenadante del pozo B6 reconoció a los eritrocitos A₁B con una señal fuertemente positiva, por lo que se expandió y clonó cuatro veces y se denominó clona BMS-4.

En la Tabla I se señala la potencia del LA sin diluir generado por esta clona, demostrando alto título, buen *score* y estabilidad durante la incubación.

TABLA I
POTENCIA DEL LA ANTI B (BMS-4)

Incubación	Eritrocitos B		Eritrocitos A ₁ B	
	Título	Score	Título	Store
CI	2 ¹³		2 ¹²	
1´	2 ¹⁴	82	2 ¹²	80
5´	2 ¹⁴	88	2 ¹²	81

LA: líquido ascítico.

TABLA II
POTENCIA DEL LA ANTI B (BMS-4) DILUIDO 1:20

Incubación	Potencia LA diluido				Potencia reactivo control			
	Eritrocitos B		Eritrocitos A ₁ B		Eritrocitos B		Eritrocitos A ₁ B	
	Título	Score	Título	Store	Título	Score	Título	Score
CI	2 ⁹		2 ⁸		2 ⁷		2 ⁷	
1´	2 ⁹	59	2 ⁸	53	2 ⁷	47	2 ⁷	49
5´	2 ¹⁰	60	2 ⁸	53	2 ⁷	48	2 ⁷	49

Se escogió la dilución 1:20 para evaluar las posibilidades de utilizarlo como reactivo. Se pudo apreciar una potencia casi similar a la observada con el reactivo comercial (diferencias no mayores de dos tubos a favor del reactivo en evaluación) por lo que se consideró idónea la dilución seleccionada (Tabla II).

Se evaluó la especificidad, haciéndolo reaccionar con ocho muestras de suspensiones de eritrocitos B y ocho A₁B provenientes de donantes diferentes y con todas, las aglutinaciones fueron de 4+. Se obtuvieron resultados negativos con eritrocitos A y O. En ningún caso se observó hemólisis ni fenómeno de reuleax. No se detectó presencia de acs contaminantes al ponerlo a reaccionar con células del panel.

Para evaluar la avidéz, hicimos las determinaciones con eritrocitos B y A₁B (Tabla III). Tanto el LA puro como las diferentes diluciones demostraron excelente avidéz con ambos fenotipos celulares. A los 2" se detectó aglutinación fina en todos los casos

y a los 8" ya habían aglutinados grandes con fondo claro. No se apreció diferencia con la avidéz demostrada por el reactivo comercial.

Para apreciar la reactividad del anticuerpo con sustancia antigénica soluble B y reafirmar la especificidad, se realizó un ensayo de inhibición de la aglutinación con saliva de donante B secretor, con el cual se demostró su especificidad anti B al inhibirse la aglutinación del ac en estudio.

Al evaluar la reactividad de los acs contra eritrocitos autosensibilizados, con el fin de descartar los resultados falsos positivos, se hizo reaccionar el LA diluido con 36 suspensiones celulares O Rh negativo sensibilizadas. En todos los casos los resultados fueron negativos.

En vista de las características observadas en los acs provenientes de la clona BMS-4, pasamos a la fase de su evaluación en el tiempo, utilizando diluciones 1:20 conservadas a 4°C (Tabla IV) y a 37°C. Se demostró una reducción inicial de los títu-

TABLA III
 AVIDEZ DEL LA ANTI B (BMS-4) A DIFERENTES DILUCIONES

LA anti B (BMS-4)	Eritrocitos B		Eritrocitos A ₁ B	
	Aglutinación/ 1/2 T de observación	Aglutinación/ T total de observación	Aglutinación/ 1/2 T de observación	Aglutinación/ T total de observación
Anti B puro	< 1mm/2"	> 1mm/8"	< 1mm/2"	> 1mm/8"
Anti B 1:2	< 1mm/2"	> 1mm/8"	< 1mm/2"	> 1mm/8"
Anti B 1:20	< 1mm/2"	> 1mm/8"	< 1mm/2"	> 1mm/8"
Anti B control	< 1mm/2"	> 1mm/8"	< 1mm/2"	> 1mm/8"

T: tiempo.

TABLA IV
 ESTABILIDAD DEL LOS ANTICUERPOS ANTI B (BMS-4) DILUIDOS 1:20 A 4°C

T evaluación (meses)	Eritrocitos (fenotipo)	Título		Score		Aidez	
		BMS-4	Control	BMS-4	Control	BMS-4	Control
0	B	2 ⁹	2 ⁹	61	59	2"-8"	2"-8"
	A ₁ B	2 ⁸	2 ⁸	46	53	2"-8"	2"-8"
3	B	2 ⁸	2 ⁹	49	51	2"-8"	2"-8"
	A ₁ B	2 ⁷	2 ⁸	42	48	2"-8"	2"-8"
6	B	2 ⁷	2 ⁷	49	45	2"-8"	2"-8"
	A ₁ B	2 ⁷	2 ⁷	40	39	3"-11"	2"-8"
12	B	2 ⁷	2 ⁷	49	44	2"-8"	2"-8"
	A ₁ B	2 ⁶	2 ⁷	39	39	3"-11"	3"-9"
18	B	2 ⁷	2 ⁷	49	44	2"-8"	2"-8"
	A ₁ B	2 ⁶	2 ⁷	38	38	3"-11"	3"-9"
24	B	2 ⁷	2 ⁷	45	43	2"-8"	2"-8"
	A ₁ B	2 ⁶	2 ⁶	38	38	3"-11"	3"-9"
30	B	2 ⁷	2 ⁷	49	44	2"-8"	2"-8"
	A ₁ B	2 ⁶	2 ⁷	39	39	3"-11"	3"-9"
36	B	2 ⁷	2 ⁷	49	44	2"-8"	2"-8"
	A ₁ B	2 ⁶	2 ⁷	39	39	3"-11"	3"-9"

los con ambos fenotipos celulares y una lenta y leve disminución de la avidez con los eritrocitos A₁B un poco más pronunciada con el anti B BMS-4, aunque el comportamiento general fue casi similar al control. Para apreciarlo gráficamente podemos ver las Fig 1 y Fig 2.

El estudio de estabilidad a 37°C se realizó utilizando solamente eritrocitos B (Tabla V). Se apreció un descenso progresivo de la potencia de los acs en el curso de ocho meses. Ambos reactivos demostraron un comportamiento bastante similar al comienzo pero finalmente hubo mayor acele-

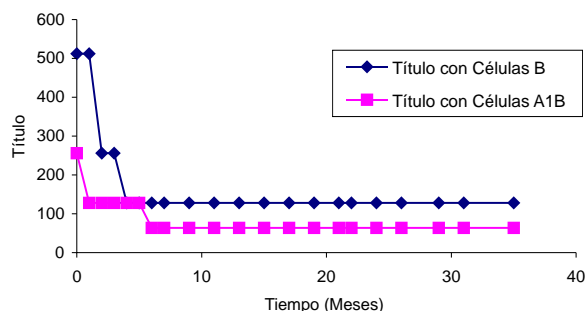


Fig. 1. Estabilidad de los anticuerpos anti B (BMS-4) conservado a 4°C.

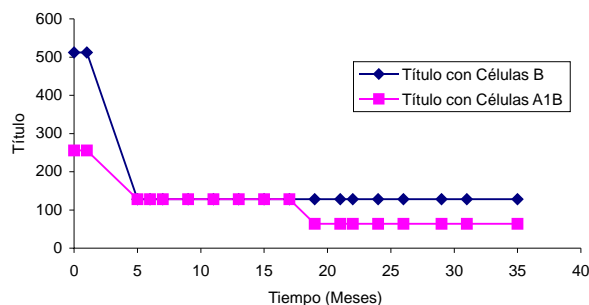


Fig. 2. Estabilidad del reactivo comercial anti B conservado a 4°C.

ramiento en la degradación de los acs en la clona BMS-4. De cualquier manera, esta reducción está dentro de los rangos permitidos, es decir, reducción de no más de una dilución al mes.

Se evaluaron muestras al azar de donantes, pacientes y eritrocitos de cordón y se apreció su excelente reconocimiento antigénico (Tabla VI). También se evaluaron 36 pacientes con problemas hematológicos e inmunohematológicos y con ninguno hubo diferencias con respecto al control.

Se realizaron evaluaciones con fenotipos más débiles de B (New York Blood Center), evidenciándose reactividad fuerte (*score* de 11 en escala de 0-12) con células Bh, B(A), AB mosaico y A₁B débil. Además reaccionó moderadamente (*score* 6) con células B₃ (similar a lo obtenido con reactivos comerciales).

Con el fin de conocer el isotipo de los acs obtenidos se realizaron evaluaciones por la técnica de Ouchterlony y por ELISA (Tabla VII). Podemos observar que se trata de una IgM kappa, lo cual corresponde con su comportamiento serológico.

Se procedió a cuantificar las Igs específicas en LA con el fin de evaluar su utili-

TABLA V
ESTABILIDAD DE LOS ANTICUERPOS ANTI B (BMS-4) DILUIDOS 1:20 A 37°C

T de evaluación (meses)	Título		Score	
	BMS-4	Control	BMS-4	Control
0	29	29	60	59
1	28	28	51	50
2	28	27	50	48
3	27	27	49	47
4	27	27	44	37
5	27	27	39	37
6	26	26	28	24
7	25	26	24	22
8	24	25	13	20

TABLA VI
COMPORTAMIENTO DE LOS ANTICUERPOS ANTI B (BMS-4) UTILIZANDO MUESTRAS
DE DONANTES, PACIENTES Y CÉLULAS DE CORDÓN+

Tipo de muestra	Fenotipo	Aglutinación				
		4+	3+	2+	1+	0
Donantes al azar	A (347)					347
	B (76)	76				
	AB (20)	20				
	O (566)					566
Pacientes al azar	A (128)					128
	B (39)	39				
	AB (04)	04				
	O (217)					217
Eritrocitos de cordón	A (101)					101
	B (43)	43				
	AB (04)	04				
	O (195)					195

TABLA VII
DETERMINACIÓN DEL ISOTIPO POR ELISA

Isotipos	Absorbancias (405 nm)
IgG1	0,109
IgG2a	0,096
IgG2b	0,108
IgG3	0,135
IgA	0,107
IgM	0,489
Kappa	0,453
Lambda	0,128
Control Ac primario	0,082
PBS	0,095
Sustrato	0,087
Conjugado	0,289
Control positivo	1,055

dad futura en la estandarización de los lotes. Para ello realizamos una curva patrón utilizando diluciones de IgM comercial de ratón (Tabla VIII y Fig 3). La cuantificación resultó en 1,34 mg/mL (Tabla IX).

DISCUSIÓN

La producción de anti B monoclonal ha sido señalada en la literatura como difícil, considerando el hecho de que los ratones balb/c tienen un grupo *B-like* sobre su membrana eritrocitaria (13). Por otra parte no todos los esquemas de inmunización, ni los inmunógenos utilizados, inducen a la obtención de un buen anticuerpo. En este estudio, demostramos que utilizando un esquema en el que se inmunizó simultáneamente por vía IP y SC con antígeno B de saliva, con un estímulo final por vía IV, fue posible obtener un anticuerpo con excelentes cualidades.

TABLA VIII
CURVA PATRÓN PARA LA DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN PROTEICA (IGM)
POR EL MÉTODO DE MANZINI

[IgM de ratón] (comercial)	Log 10 [IgM]	Dm [Ag] (mm) 48 horas	Dm [Ag] (mm) 72 horas
10 µg/10 µL	1,000	6,000	6,250
5 µg/10 µL	0,698	4,500	5,000
2,5 µg/10 µL	0,397	4,500	4,600

TABLA IX
DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE IGM EN LA

	48h	72h	\bar{X}	Anti Log 10	[proteínas] µg	[proteínas] mg/mL
LA puro	5,7	6,8	1,2524	17,881	17,881	1,788
LA ½ dil	5,0	5,3	0,7044	5,062	10,124	1,012
LA ¼ dil	4,2	4,7	0,4855	3,058	12,234	1,223
\bar{X}	-	-	-	-	-	1,341
DS	-	-	-	-	-	0,401

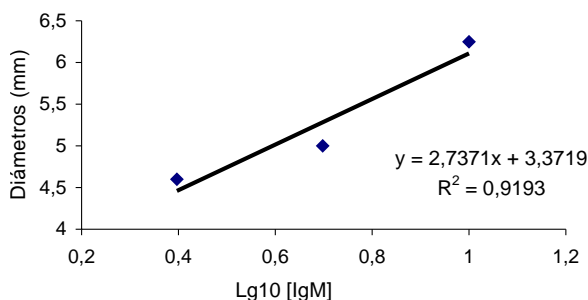


Fig. 3. Determinación de concentración de IgM por el método de Manzini. Curva patrón.

Al inducir producción de LA anti B, se lograron titulaciones de 10^{14} con eritrocitos B y de 10^{12} con eritrocitos A₁B, con alto score. Esto permitió una dilución del LA en 1:20 y de esta manera realizar las evaluaciones programadas para determinar su comportamiento inmunohematológico. A esta dilución los títulos, la avidéz, la estabilidad en el tiempo a 4°C y a 37°C, así como la sensibilidad para la tipificación de eritrocitos de cordón, de individuos con patologías

hematológicas e inmunohematológicas y con eritrocitos de muy débil expresión antigénica, fueron similares a los del reactivo comercial. Es importante mencionar que el estudio de inhibición de la aglutinación, reveló total inhibición por la sustancia antigénica B de saliva, lo que reafirma aún más su clara especificidad anti B, al reaccionar con la región inmunodominante del antígeno que confiere la especificidad de grupo. Desafortunadamente no disponemos de oligosacáridos sintéticos para establecer la especificidad fina (29). Sin embargo, dado el comportamiento demostrado, podemos inferir que los anticuerpos secretados por esta clona pueden ser utilizados sin mezclarlos, para la producción de reactivos de hemoclasificación.

Posteriormente decidimos utilizar un sistema capilar artificial (30,31) para la producción a escala intermedia. Pudimos obtener acs en un título similar al del LA, con un score superior (125 vs 82), pero con una concentración medida por inmunodifusión radial menor (0,70 mg/mL vs 1,34 mg/mL)

(datos no mostrados). Esto reveló que la cuantificación proteica no necesariamente es equivalente a la titulación del anticuerpo y para nuestros propósitos nos guiaremos más por el comportamiento inmunohematológico del anticuerpo que por la cuantificación en sí, aunque a cada lote que se produzca se le cuantificarán las Inmunoglobulinas.

Con este logro, continuaremos trabajando en el área para conseguir híbridos productores de acs contra el ag A del sistema ABO y contra ags de otros sistemas, los cuales puedan en un futuro utilizarse como fuente de reactivos para el trabajo en banco de sangre.

AGRADECIMIENTOS

A los Dres Egidio Romano y Ramón Montañó del Laboratorio de Patología Celular del Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas, por su asesoría y facilitación de líneas celulares utilizadas en los experimentos de fusión. A la Dra Marion Reid del New York Blood Center, por su ayuda al evaluar el anticuerpo con fenotipos menos frecuentes. Al Prof. Pedro Aso del Departamento de Biología de la Universidad Simón Bolívar, por su asesoría y ayuda logística para las determinaciones inmunológicas.

REFERENCIAS

1. Citado por Race R y Sanger R en: Blood groups in man. 6ta Ed. Oxford: Blackwell Scientific Publications, 1975.
2. Linares J. Inmunohematología y Transfusión. Principios y Procedimientos. 1ra Ed. Caracas 1986.
3. Köhler G, Milstein C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. Nature 1975; 256: 495-497.
4. Horejsi V. Surface antigens of human leukocytes. Adv Immunol 1991; 49:75-147.
5. De Rossi G, Zarcone D, Mauro F, Cerruti G, Tenca C, Puccetti A, Mandelli F, Grossi C. Adhesion molecule expression on B cell chronic lymphocytic leukemia cells; malignant cell phenotypes define distinct disease subsets. Blood 1993; 81: 2679-2687.
6. Yoshimura M, Nishimura R. Assessment of urinary beta-core fragment of human chorionic gonadotropin as a new tumor marker of lung cancer. Cancer 1994; 73: 2745-2752.
7. Skolnick A. First immunotoxin therapy for many common solid tumors enters phase clinical trial. JAMA 1993; 270(19):2280.
8. Miller R, Maloney D, Warnke R, Leny R. Treatment of B cell lymphoma with monoclonal anti idiotypic antibody. N Engl J Med 1982; 306:517-522.
9. Osteoborg A, Fassas A, Anagnostopoulos A, Dyer M, Catovsky D, Mellstedt H. Humanized CD 58 monoclonal antibody Campath IH as first line treatment in chronic lymphocytic leukaemia. Br J Haematol 1996; 93:151-153.
10. Maloney D, Liles T, Czerwinski D, Waldichuk C, Rosenberg J, Grillo-López A, Levy R. Phase I clinical trial using escalating single dose infusion of chimeric anti CD20 monoclonal antibody (IDEC-C2B8) in patients with recurrent B cell lymphoma. Blood 1994; 84:2457-2466.
11. Rouger P, Anstee D. First International Work Shop on Monoclonal Antibodies Against Human Red Blood cells and Related Antigens. Final Report. Vox Sang 1988; 55:57.
12. Messeter L. Monoclonal Antibodies Against ABO Antigens. Biotest Bulletin. 1989, 4:9-14.
13. Messeter L, Brodin J, Chester M, Low B, Lundblad 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.
14. Voak D, Lennox E, Sacks S, Milstein C, Darnboughn J. Monoclonal anti A anti B as cost-effective reagents. Med Lab Sci 1982; 39:109-122.
15. Sacks S, Lennox E. Monoclonal anti B as a new blood typing reagent. Vox Sang 1981; 40: 99-104.

16. Becker M, Juica F, Jamett A, Tzichinovsky S, Barros S, Aguayo J, de Ioannes A. Development of anti B blood group monoclonal antibodies suitable as a blood typing reagent. *Hybridoma* 1994; 13 (4):303-310.
17. Clausen H, Hakomori S. ABH and related histo-blood group antigens. Immunochemical differences in carrier isotypes and their distribution. *Vox Sang* 1989; 56:1-20.
18. Watkins W. Blood Group Substances. *Science* 1996; 152:172-181.
19. Lubenko A, Redman M. Weak B antigens and heterogeneity of monoclonal anti B reagents. *Vox Sang* 1989; 57: 275.
20. Gane P, Vellayoudom J, Mollicone R, Breimer M, Samuelsson B, Rouger P, Gérard G, Le Pendu J, Oriol R. Heterogeneity of anti A and anti B monoclonal reagents. *Vox Sang* 1987; 53:117-125.
21. Barrie E, Fraser R, Munro A, Williamson A, Hamilton E, Mitchell R. Monoclonal anti B produced by the immunization of mice with soluble salivary glycoproteins. *J Immunogenetics* 1983; 10:41-44.
22. Bazin R, Lemieux R. Increased proportion of B cell hybridomas secreting monoclonal antibodies of desired specificity in cultures containing macrophage-derived hybridoma growth factor (IL-6) *J Immunol Meth* 1989; 116:245-249.
23. Harlow E, Lane D. *Antibodies: A laboratory manual*. Cold Spring Harbor laboratory, 1988.
24. Galfre G, Howe S, Milstein C, Butcher G, Howard J. Antibodies to major histocompatibility antigens produced by hybrid cell lines. *Nature* 1977; 266: 550-552.
25. Broderur B, Tsang P. High yield monoclonal antibody production in ascitis. *J Immunol Meth* 1986; 239-241.
26. Recommended methods for blood grouping reagents evaluation March 1992 (Docket N° 845-0181). Center for Biologics Evaluation and Research (HFB-940) Food Drug Administration.
27. McGowan A, Tod A, Chirnside A, Green C, McColl K, Moore S, Yap P, McClelland D, McCann M, Micklem L, James K. Stability of murine monoclonal anti A, anti B and anti A,B ABO grouping reagents and a multicentre evaluation of their performance in routine use. *Vox Sang* 1989; 56: 122-130.
28. Voller A, Bidwell D, Bartlett A. Enzyme Immunoassays. In: *Diagnostic Medicine*. WHO 1989; 53: 55-65.
29. Gane P, Mollicone R, Rouger R, Oriol R. Inhibition of haemagglutination with synsorb and salivas of anti A monoclonal antibodies. *Rev Fr Transfus Immunohematol* 1987; 30:435-442.
30. Nayak R, Herman I. Measurement of glucose consumption by hybridoma cells growing in hollow fiber cartridge bioreactors: use of blood glucose self-monitoring devices. *J Immunol Meth* 1997; 205:109-114.
31. Jackson L, Trudel L, Fox J, Lipman N. Evaluation of hollow fiber bioreactor as an alternative to murine ascitis production for small scale monoclonal antibody production. *J Immunol Meth* 1996; 189: 217-231.