

DOI: <https://doi.org/10.46502/issn.2710-995X/2023.10.02>

Cómo citar:

García Cruz, C.C., Llauradó Maury, G., Morris Quevedo, H.J., Miranda Ariza, A., Galindo Arias, E., & Rodríguez Pérez, S. (2023). Obtención y adaptación de un hibridoma productor de anticuerpos anti-C3 a medio libre de suero. *Orange Journal*, 5(10), 15-27. <https://doi.org/10.46502/issn.2710-995X/2023.10.02>

Obtención y adaptación de un hibridoma productor de anticuerpos anti-C3 a medio libre de suero

Obtaining and adapting an anti-C3 hybridoma to serum and protein-free medium

Recibido: 16 de septiembre de 2023

Aceptado: 15 de noviembre de 2023

Escrito por:

Claudia Camila García Cruz¹ <https://orcid.org/0009-0008-8186-2783>**Gabriel Llauradó Maury²** <https://orcid.org/0000-0001-5961-9375>**Humberto J. Morris Quevedo³** <https://orcid.org/0000-0002-3916-8594>**Alejandro Miranda Ariza⁴** <https://orcid.org/0009-0001-5784-5990>**Elizabet Galindo Arias⁵** <https://orcid.org/0009-0009-9451-5315>**Suyén Rodríguez Pérez⁶** <https://orcid.org/0000-0002-8019-1315>

Resumen

El suero de Coombs o reactivo antiglobulínico humano poliespecífico permite visualizar la presencia de anticuerpos anti-eritrocitarios incompletos o componentes del factor C3 del sistema del complemento humano adheridos a sus membranas. Es de gran importancia clínica para estudiar patologías como la enfermedad hemolítica del recién nacido, enfermedades hemolíticas autoinmunes, entre otras. Actualmente existe la necesidad de cubrir la demanda hospitalaria a través de la producción nacional. El hibridoma secretor de anticuerpos monoclonales anti-C3 generado para la producción del reactivo de Coombs debe pasar por un proceso de adaptación a medio libre de suero y proteínas debido a las desventajas que puede traer el medio que se usa tradicionalmente para su cultivo. El presente tema de investigación propone demostrar que los medios libres de suero y proteínas seleccionados son adecuados para el cultivo del hibridoma. Se realizó un estudio experimental en el Laboratorio de anticuerpos y biomodelos experimentales, de Santiago de Cuba desde abril a noviembre de 2022. Se obtuvieron linfocitos B anti-C3 a partir de la sensibilización de ratones BALB/c. Se generó un hibridoma secretor de anticuerpos anti-C3 y se evaluó su adaptación en las formulaciones preparadas a partir de los medios MB02, MB03 y MB04,

¹ Lic. en Biología. Centro de Biofísica Médica. Reserva científica. Departamento Biofísica. Universidad de Oriente, Santiago de Cuba, Cuba.

² DrC. Ciencias Médicas. Centro de Estudios de Biotecnología Industrial. Profesor Titular. Biotecnología. Universidad de Oriente, Santiago de Cuba, Cuba.

³ DrC. Ciencias Biológicas. Centro de Estudios de Biotecnología Industrial. Director de Ciencia, Innovación y Posgrado del Centro. Profesor Titular. Ciencias Biológicas, Biotecnología. Universidad de Oriente, Santiago de Cuba, Cuba.

⁴ MSc. Biotecnología Industrial. CIM-Labex. Jefe de Departamento de Innovación y Desarrollo. Biotecnología Industrial, Santiago de Cuba, Cuba.

⁵ Lic. en Biología. CIM-Labex. Especialista III en Investigación, Innovación y Desarrollo. Biotecnología Industrial. Departamento Innovación y Desarrollo, Santiago de Cuba, Cuba.

⁶ Dr. Ciencias Naturales. CIM-Labex. Directora del centro. Biotecnología, Santiago de Cuba, Cuba.





todas de producción nacional por lo que proporcionan ventajas económicas. El anticuerpo monoclonal obtenido podrá ser utilizado para el desarrollo de un reactivo antiglobulínico humano poliespecífico que permitirá satisfacer la demanda hospitalaria nacional, garantizando la calidad de la atención en la salud pública y la sustitución de importaciones.

Palabras clave: Factor C3 del Sistema de Complemento, hibridoma anti-C3, medio libre de suero y proteínas, suero antiglobulínico humano.

Abstract

Coombs serum or polyspecific human antiglobulin reagent allows visualizing the presence of incomplete anti-erythrocyte studies or components of factor C3 of the human complement system adhered to their membranes. It is of great clinical importance to study pathologies such as the disease hemolytic of the newborn, autoimmune hemolytic diseases, among others. Currently, there is a need to cover the hospital demand through national production. The secretory hybridoma of anti-C3 monoclonal studies generated for the production of the Coombs reagent must go through a process of adaptation to serum and protein-free media due to the disadvantages that the traditionally used medium can bring for its cultivation. The current research topic proposes to demonstrate that the selected serum and protein-free media are suitable for hybridoma cultivation. An experimental study was carried out at the Laboratory of Antibodies and Experimental Biomodels in Santiago de Cuba from April to November 2022. Anti-C3 B lymphocytes from the sensitivity of BALB/c mice were obtained. A secreting hybridoma of anti-C3 tests was generated and its adaptation was evacuated in formulations prepared from the MB02, MB03 and MB04 media. Two medium formulations were obtained which, since they are nationally produced, lead to economic advantages. The obtained monoclonal antibodies can be used for the development of a polyspecific human antiglobulin reagent that will satisfy the national hospital demand, guaranteeing the quality of public health care and the substitution of imports.

Keywords: Factor C3 of the Complement System, human antiglobulin serum, anti-C3 hybridoma, serum and protein-free media.

Introducción

El reactivo tipo suero de Coombs (suero antiglobulínico humano) está diseñado para visualizar mediante la reacción de aglutinación de eritrocitos, la presencia de anticuerpos antieritrocitarios incompletos en el suero de un donante (Prueba de Coombs Indirecta), o para detectar mediante la prueba de Coombs directa la presencia de eritrocitos sensibilizados con anticuerpos o con componentes del complemento adheridos en sus membranas (Rodríguez-Leyva et al., 2010). Este reactivo juega un papel importante en las pruebas de compatibilidad donante receptor en las transfusiones sanguíneas, en el trasplante de órganos y se utiliza para detectar conflictos materno-fetales en el programa atención materno-infantil (PAMI) en Cuba (Theis & Hashmi, 2020).

En general se pueden encontrar tres tipos de reactivos antiglobulínicos en el mercado: el suero monoespecífico anti-C3, el suero monoespecífico anti-IgG y el suero poliespecífico anti-IgG/anti-C3, siendo este último el más demandado por el sistema internacional de salud (International Reference Reagents, 2013). El componente anti-IgG del suero poliespecífico es usualmente policlonal, mientras el componente anti-C3, si bien se siguen comercializando variantes de origen policlonal, es el de origen monoclonal el que ha ganado preponderancia en el mercado y constituye la referencia internacional actual (Rapid Labs, 2020), (GUOTIENT, 2022).

Los reactivos antiglobulínicos humanos son ampliamente utilizados en los bancos de sangre y en los laboratorios clínicos (Theis & Hashmi, 2020). Actualmente su demanda se cubre mediante la importación de estos reactivos formulados al granel de un proveedor único en Europa (Spinreact, 2017). Esta situación constituye una vulnerabilidad para la práctica inmunohematológica y transfusional en Cuba.





ORANGE JOURNAL

El hibridoma secretor de anticuerpos monoclonales (AcM) anti-C3, generado para la producción del reactivo de Coombs, se cultiva en el medio que tradicionalmente es usado para el cultivo de células y que contiene suero fetal bovino en su formulación. La utilización de este medio, a pesar de tener ciertas ventajas en cuanto al crecimiento celular, trae consigo ciertas desventajas al verse afectado por enfermedades, cuestiones económicas, políticas y éticas (Simancas-Escorcía, & Diaz-Caballero, 2019). Por estas razones el hibridoma obtenido debe pasar por un proceso de adaptación a otro medio de cultivo. El Centro de Inmunología Molecular dispone de medios libres de suero fetal bovino y proteínas (MLS): MB02, MB03 y MB04. El medio MB03, es el que tradicionalmente se usa para el cultivo de hibridomas y células de mieloma (Palacio-Oliva & Pérez-Yanes, 2019). La fusión de este medio con uno de los otros, pudiera proporcionar un medio de cultivo efectivo para la adaptación del hibridoma generado.

Las evidencias científicas en Cuba basadas en la obtención y adaptación de hibridomas secretores de anticuerpos anti-C3 en medio de cultivo libre de suero y proteínas son limitadas y atentan contra la calidad del reactivo de Coombs, lo cual constituye un problema científico. El presente trabajo pretende demostrar que los MLS seleccionados son adecuados para el cultivo de un hibridoma de ratón secretor de AcM contra el factor C3 del sistema del complemento humano de producción nacional. Para ello es necesario obtener linfocitos B contra el factor C3 del sistema del complemento humano a partir de la sensibilización de ratones BALB/c. Luego, generar un hibridoma secretor de anticuerpos anti-C3 a partir de la fusión de células B con células de mieloma. Para finalmente, evaluar la adaptación del hibridoma secretor de anticuerpos anti-C3 en los medios seleccionados a partir de un estudio de cinética.

Desde el punto de vista económico el estudio propone la obtención de un hibridoma productor de AcM anti-C3 para la producción del reactivo de Coombs nacional y de dos medios de cultivo libre de suero fetal bovino y proteínas que sustituirán importaciones. En lo social, la investigación proporcionará un formulado con calidad que podrá ser utilizado en los servicios hospitalarios y de banco de sangre para el diagnóstico y detección temprana de enfermedades hematológicas, detección de conflictos materno-fetales y pruebas de compatibilidad donante-receptor.

Marco teórico

Para la generación del anticuerpo monoclonal según la tecnología clásica (de George Köhler y Cesar Milstein) es necesaria la producción de una línea celular estable secretora de estos anticuerpos. Esta línea celular se conoce como hibridoma y consiste en células inmortales que tienen la capacidad virtualmente ilimitada de producir anticuerpos monoclonales. Para su producción son necesarios dos tipos de células. La primera célula involucrada es un linfocito B de un animal previamente inmunizado con el antígeno de interés, que aporta la memoria inmune y la capacidad de producir anticuerpos contra el antígeno específico. La segunda es una célula de mieloma que aporta su capacidad de división ilimitada (inmortalidad), no secretora de anticuerpos para que los únicos obtenidos sean los de las células plasmáticas del animal inmunizado y deficiente en la enzima hipoxantina-guanina-fosforribosil transferasa (HGPRT), útil en el proceso de selección posterior de los hibridomas (Machado et al., 2006), (Ruiz et al., 2007).

Los principales medios de cultivo para el crecimiento de diferentes líneas celulares se componen de proteínas y nutrientes. Los más usados son sueros provenientes de los bovinos, en especial de los fetos o ejemplares adultos, estos sueros poseen una mezcla de glucosa, proteínas, vitaminas, oligoelementos, hormonas y factores de crecimiento. Estos factores son fundamentales para el mantenimiento, crecimiento y desarrollo de las líneas celulares, por lo que es considerado como uno de los suplementos tradicionales en los medios de cultivo (Rivera-Rivera, 2019). La inclusión del suero animal en estos medios más definidos aceleró el crecimiento de las células, con aumento de la población total. No obstante, el uso de suero animal en el medio de cultivo no sólo favorecía la proliferación y la supervivencia de las células en cultivo, si no que la composición indefinida del mismo constituía una seria desventaja al tener un efecto no deseado sobre las células en estudio. Además, dado que la concentración de los componentes del suero animal puede variar entre lotes, la respuesta celular no siempre es la misma (Rivera-Rivera, 2019), (Simancas-Escorcía, & Diaz-Caballero, 2019). Por otro lado, esta práctica implica un costo económico elevado; mientras que la corta caducidad del suero limita la cantidad almacenada. También es necesario tener en cuenta que la abundancia de nutrientes en el suero no sólo permite el crecimiento celular, sino que





favorece el crecimiento de bacterias, hongos, parásitos y virus, lo que en ocasiones puede llevar a la contaminación y pérdida del cultivo (Rivera-Rivera, 2019), (Simancas-Escorcía, & Díaz-Caballero, 2019). Otros inconvenientes en el uso de suero en el medio de cultivo lo constituyen el riesgo de transmisión de enfermedades y que la obtención del suero animal tiene implicaciones éticas, ya que su obtención requiere del uso o sacrificio de animales y es en muchas ocasiones rechazada por grupos protectores de los derechos de los animales. Debido a todo lo anterior la disposición del suero animal puede verse afectado por enfermedades, economía, razones políticas y éticas (Simancas-Escorcía, & Díaz-Caballero, 2019).

Metodología

Se realizó un estudio experimental en el Laboratorio de Anticuerpos y Biomodelos Experimentales (LABEX-CIM), de Santiago de Cuba desde el mes de abril a noviembre del año 2022 para la obtención de un hibridoma secretor de un anticuerpo monoclonal anti-C3 del sistema de complemento humano y su posterior adaptación a medio libre de suero y proteínas.

A. Preparación del inmunógeno

Para la preparación del inmunógeno se realizó el recubrimiento de eritrocitos de ratón con C3hu a partir de suero humano normal de sangre del grupo O⁺, estimulando la ruta alternativa de activación del complemento. El método de recubrimiento se ejecutó aplicando algunas modificaciones al procedimiento normalizado de operación de LABEX A5 PNO.011 “Actividad anti-Complemento del Suero de Coombs” del proceso de Inspección y ensayo de LABEX.

Se colectó sangre de ratones BALB/c en Citrato de Sodio al 3.8% para prevenir la coagulación sanguínea y se centrifugó para coleccionar los eritrocitos. Estos fueron lavados tres veces en solución salina fisiológica (SSF) a 1500 rpm en una centrífuga Selecta (Medifriger). A estos eritrocitos lavados se le añadió 0.5mL de suero humano absorbido, 0.1mL de cloruro de magnesio y 19.8 mL del buffer (PBS), se agitó suavemente y se mantuvo aproximadamente a 0°C durante 30 min. Para degradar los fragmentos adheridos C3b a C3d, la suspensión celular fue centrifugada, se desechó el sobrenadante y los eritrocitos recubiertos se incubaron con Tripsina porcina al 0.1% a 37°C durante 30 min. Posteriormente las células fueron lavadas tres veces con SSF. El resultado se comprobó midiendo potencia de aglutinación anti-C3d de un suero antiglobulínico humano poliespecífico anti-IgG-C3 por la prueba de antiglobulina.

Se tomaron 100 µL del reactivo comercial y se enfrentó con 50µL de la suspensión de eritrocitos recubiertos con C3d al 5% en SSF suplementada con Seroalbúmina Bovina al 2% en tubos de ensayo. Los tubos se incubaron a temperatura del local durante cinco min, se centrifugaron a 1000 rpm por un min y se leyó la intensidad de aglutinación en una escala de 0 a 5+. Como control negativo se emplearon eritrocitos humanos no recubiertos.

Una vez comprobado el recubrimiento se preparó la suspensión inmunogénica (1×10^8 eritrocitos de ratón recubiertos en 0,5 mL de tampón fosfato salino) para cada biomodelo. Para su preparación se realizó el conteo de los eritrocitos recubiertos en cámara de Neubauer. Se aplicaron inyecciones intraperitoneales del inmunógeno a 12 ratones BALB/c hembras de 6 a 8 semanas de edad, en dos esquemas de inmunización.

Esquema 1: Cinco inmunizaciones separadas por intervalos de siete días (días 0, 7, 14, 21 y 28). Este esquema se aplicó a los biomodelos 1-6.

Esquema 2: Cuatro inmunizaciones separadas por intervalos de 10 días (días 0, 10, 20 y 30). Este esquema se aplicó a los biomodelos 7-12.

B. Obtención de las células parentales

El día 34, un volumen de 250mL de sangre fue colectado por la zona submandibular de cada ratón, y se determinó la actividad aglutinante anti-C3d en suero sanguíneo. Se seleccionó el ratón con mayor intensidad de aglutinación para la extracción de esplenocitos. El criterio de selección fue de intensidad de





ORANGE JOURNAL

aglutinación mínima de 1+. Los esplenocitos fueron extraídos por perfusión del bazo del ratón sensibilizado seleccionado con medio de cultivo sin suero.

Las células de mieloma de ratón que fueron utilizadas pertenecen a la línea celular X63-Ag8.653 procedentes de un cultivo en crecimiento exponencial en medio de cultivo DMEM/F12 (Gibco, USA) suplementado con 3.50g/L de Hepes (Sigma, USA), 2.44g/L de Bicarbonato de Sodio (Sigma, USA), y 80mL/L de Suero Fetal Bovino (Gibco, USA).

Los esplenocitos del ratón sensibilizado y las células de mieloma fueron fusionadas en una proporción 3:1. La suspensión celular se centrifugó y las células fueron suspendidas en 200mL de medio HAT. La suspensión se homogeneizó y se sembró en placas de cultivo de 96 pozos de fondo plano (GBO, Alemania), las que se incubaron a 37°C, 5% CO₂. Al octavo día de incubación se remplazaron 100µL de cada pozo con 150 µL de medio HAT y se mantuvo la incubación.

Después de varios días en incubación se identificaron los pozos que presentaron un cambio de coloración en el medio de cultivo y que pudo apreciarse a simple vista el crecimiento y expansión de las colonias celulares. Se tomaron muestras y se realizó la técnica de aglutinación en tubos frente a eritrocitos humanos revestidos con C3d. Los pozos con mayor intensidad de aglutinación anti-C3b y anti-C3d fueron sometidos a clonaciones por diluciones limitantes sucesivas a una célula por pozo aproximadamente. Los clones correspondientes a las muestras con mayor título se expandieron para congelar y evaluar las propiedades de los AcM.

C. Propiedades inmunohematológicas de los anticuerpos anti-C3

Se realizaron pruebas de especificidad (solo deben presentar aglutinación con eritrocitos cubiertos con C3b y C3d) y potencia de aglutinación (eritrocitos recubiertos con C3b en títulos no menor que 1:4 y con C3d con un título no menor que 1:1 y reacción de 2+ de aglutinación, lo cual fue comparado con un lote de suero de referencia).

D. Adaptación del hibridoma a medio libre de suero y proteínas

Se descongelaron las células de hibridoma obtenidas (HLH01) y se sembraron en frascos en medio DMEM-F12. Se mantuvieron bajo las condiciones de cultivo siguientes: encubadas a 37°C, con un 5% de CO₂, en la atmósfera única. Se comenzó la adaptación secuencial sustituyendo el medio con suero por los medios libres de suero y proteínas. Se trabajó con las células cada 48 h. Una vez lograda la adaptación se expandió el cultivo a *spinner* (tipo de recipiente que se utiliza para cultivar células en suspensión, cuenta con un dispositivo agitador que se utiliza para mover el contenido que generalmente es una mezcla de células, medio y productos del metabolismo celular) y se continuó tratando hasta que las células cumplieron los criterios de adaptación necesarios: viabilidad mínima del 90%, concentración de 1x10⁶ cel/mL y potencia de aglutinación mínima de cuatro para C3b y de 8 para C3d. Cuando se cumplieron estos criterios se realizó un estudio de cinética para evaluar si las formulaciones de medio son aptas para el cultivo del hibridoma HLH01.

Se utilizó el medio DMEM-F12 como control para evaluar la adaptación en las formulaciones de medio MB03/MB02 (MB02 y MB03) y MB03/ MB04 (MB03 y MB04) en *spinner* a una velocidad de 60 rpm y una concentración de 0,3 cel/mL en un volumen de 500 mL. Se tomaron muestras cada 24 h del cultivo y se midió potencia de aglutinación para C3b y C3d a través de la técnica de hemaglutinación directa con eritrocitos humanos revestidos con C3b y C3d respectivamente. Se midió, además, concentración y viabilidad por conteo en cámara de Neubauer diluyendo previamente la muestra en el colorante vital azul tripano. Estas mediciones se realizaron hasta que la viabilidad llegó al 50%.

E. Análisis estadístico

Los datos fueron analizados utilizando los softwares GraphPad Prism 7 (Windows, V. 7.04, 2017), StatGraphics Centurion (Windows, V15.1.0, 2009) y Microsoft Excel (Windows 2016). Los resultados se



analizaron estadísticamente y se expresaron como la media aritmética \pm desviación estándar. Se aplicó una prueba ANOVA de clasificación simple seguida, en caso de ser necesario, de la prueba de Tukey. Se aceptaron como significativas las diferencias a $p \leq 0,05$.

Resultados y discusión

A. Linfocitos B sensibilizados contra el factor C3

Durante el recubrimiento de los eritrocitos para la preparación del inmunógeno la potencia anti-C3b observada fue de 8, mientras la potencia anti-C3d estuvo en el rango de 16 a 32. En la figura 1 se muestran los resultados obtenidos en el proceso de recubrimiento de eritrocitos a partir de las desviaciones estándar.

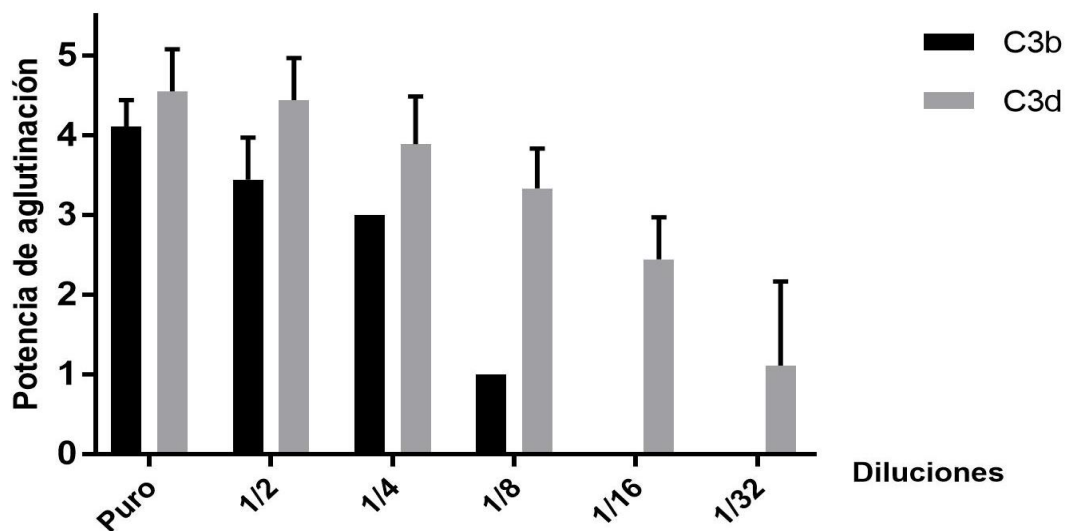


Figura 1. Potencia de aglutinación contra las diluciones, en los fragmentos C3b y C3d respectivamente.

El fragmento C3d del Sistema de Complemento humano es una proteína de aproximadamente que presenta complejidad estructural dada su naturaleza proteica, además es fácilmente degradable. En cuanto a la cantidad de inmunógeno se reportan inmunizaciones con 4×10^7 eritrocitos revestidos, en otros casos de 2×10^6 a 5×10^7 (Yokoyama et al., 2013), (Cruz & León, 2007), una cantidad menor que la utilizada en este experimento, pero igualmente se presentan resultados satisfactorios.

B. Obtención de las células parentales

La intensidad de aglutinación del ratón donante de los esplenocitos (biomodelo 3) para fusión celular fue de 1+. No obstante, en etapas posteriores de trabajo se logró extraer del bazo 18×10^7 células con un 98% de viabilidad, lo que representa un buen resultado. Cruz & León (2007), extrajeron 5×10^7 esplenocitos.

En la fase de fusión celular, luego de la siembra en las placas de 96 pozos se observaron células X63-Ag8.653 fusionadas entre sí, células X63-Ag8.653 y esplenocitos no fusionados, así como células X63-Ag8.653 fusionadas con esplenocitos (Figura 2). Se consideró este último grupo como una fusión exitosa para lograr los hibridomas deseados.

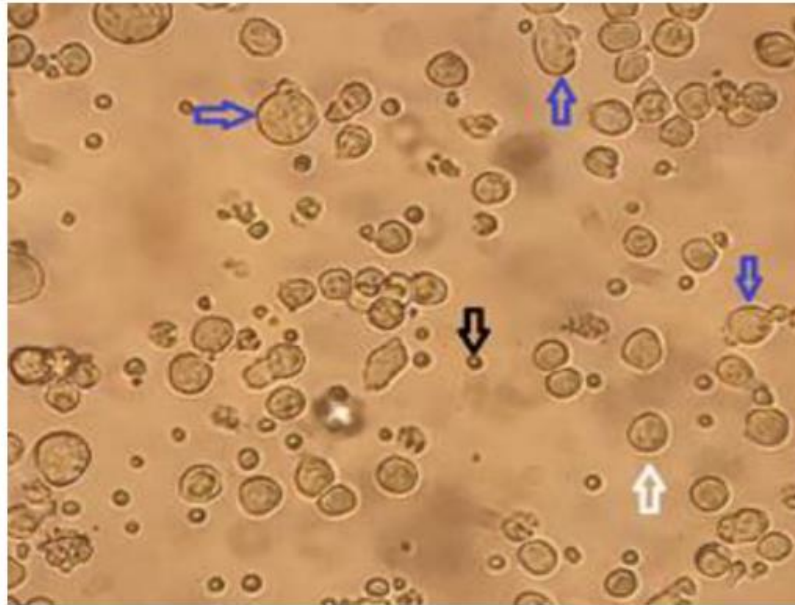


Figura 2. Fotografía tomada al microscopio óptico con un enfoque a 400X de las células recién sometidas a la técnica de fusión celular con Polietilenglicol. Flecha blanca: célula X63-Ag8.653 no fusionada. Flecha negra: esplenocito no fusionado. Flechas azules: Células X63-Ag8.653 y esplenocitos fusionados.

Como resultados de la fusión celular se contó al microscopio un total de 5978 colonias en 959 pozos de los 960 sembrados. La eficiencia de fusión (porcentaje de pozos con crecimiento de colonias con respecto al total de pozos sembrados), fue de un 99,9%. Los resultados obtenidos en la presente investigación presentan mayores porcentajes que los obtenidos por Yokoyama et al., (2013), Chronopoulou et al., (2014) y Amin-Blanco et al., (2015). Este resultado se atribuye fundamentalmente al esquema de inmunización aplicado y la calidad y concentración del antígeno que se empleó, lo que permitió una densidad celular de siembra en las placas superior al valor recomendado cuando se establece una concentración de siembra.

Se detectaron un total de 59 pozos con actividad anti-C3d con intensidad de aglutinación variada, los cuales quedaron distribuidos heterogéneamente entre las placas en un rango desde cero hasta 12 por placa. Amin-Blanco et al., (2015) obtuvo un total de 33 pozos con anticuerpos específicos en su investigación. La eficiencia de fusión específica (el porcentaje de pozos con actividad anti-C3d con respecto al total de pozos con colonias en crecimiento) es de 6,15%, resultado que supera al esperado por Yokoyama et al., (2013).

En cuanto a los clones, de manera general la potencia de aglutinación se comportó de forma similar durante los días evaluados, superando los requisitos establecidos, encontrándose en el rango de 1/128-1/512 dependiendo del día. Este resultado coincide con lo reportado por Pérez-Bernal et al., (2021). Los tres que lograron mantenerse después de tres clonaciones presentaron una potencia de aglutinación elevada que supera los requisitos establecidos para la producción del suero de Coombs. Por esta razón se escogieron para la siguiente etapa.

C. Propiedades inmunohematológicas de los anticuerpos anti-C3

Los resultados fueron satisfactorios obteniéndose que para todos los clones no hubo aglutinación anti-C4d, anti-IgG (excepto con la referencia poliespecífica) y con eritrocitos no sensibilizados (Tabla I).

Tabla I.
Título de aglutinación de los AcM

Muestra	O+	C3b	C3d	C4d	IgG
Ref. poliespecífica	0	1/8	1/128	0	1/256
Ref. monoespecífica	0	1/32	1/64	0	0
4D9	0	1/64	1/512	0	0
7D11	0	1/16	1/512	0	0
7E6	0	1/32	1/512	0	0

Si bien los títulos de aglutinación de eritrocitos revestidos con C3d fueron similares en los tres casos, con el anticuerpo del clon 4D9 en sobrenadante de cultivo, se midió una mayor potencia de aglutinación frente a eritrocitos recubiertos con C3b. No obstante, la diferencia observada no descarta el potencial de los clones 7D11 y 7E6 para el desarrollo de reactivos antiglobulínicos anti-complemento. Por esta razón fueron expandidos en cultivo celular y finalmente congelados en nitrógeno líquido.

D. Adaptación del hibridoma a medio libre de suero y proteínas

Durante todo el proceso de adaptación las células en ambos medios se mostraron con confluencia alta, a pesar de que poco a poco fuera disminuyendo el porcentaje de medio DEMEM/F12. No obstante, al tener el medio completamente libre de suero fetal bobino la confluencia que se observó fue media alta. Simancas (2019) afirma que las células cultivadas en medio libre de suero y proteínas crecen a menor velocidad y tienden a formar líneas celulares más lentamente debido a la carencia de los factores proliferativos presentes en el suero animal. Sin embargo, se observó al microscopio un número elevado de células vivas y en el estudio de cinética se comprobó que el crecimiento celular no se vio afectado. La morfología de las células no presentó cambios al microscopio óptico. Se observaban redondeadas y brillantes y sin cambios en el tamaño promedio de las células, tanto antes como después de la adaptación.

Se comprobó que no hubo variación la capacidad productora de las células durante todo el proceso. Si bien la potencia de aglutinación se modificó, durante todo el periodo de adaptación no se obtuvieron valores por debajo de los requisitos necesarios para la producción del Suero de Coombs comercial. Después del paso de varios días en los que las células tuvieron más tiempo de adaptación al medio, se observó un incremento en la potencia de aglutinación, tanto para C3b como para C3d. Esto se debe a lo afirmado por Simancas (2019) sobre la necesidad de las células de tener el tiempo suficiente para madurar y producir una gran cantidad de anticuerpos monoclonales que puedan provocar una potencia de aglutinación más intensa.

En la figura 3 se muestran los resultados relacionados con la viabilidad de las células en los dos medios de cultivo empleados, además del medio de control (DMEM/F12).

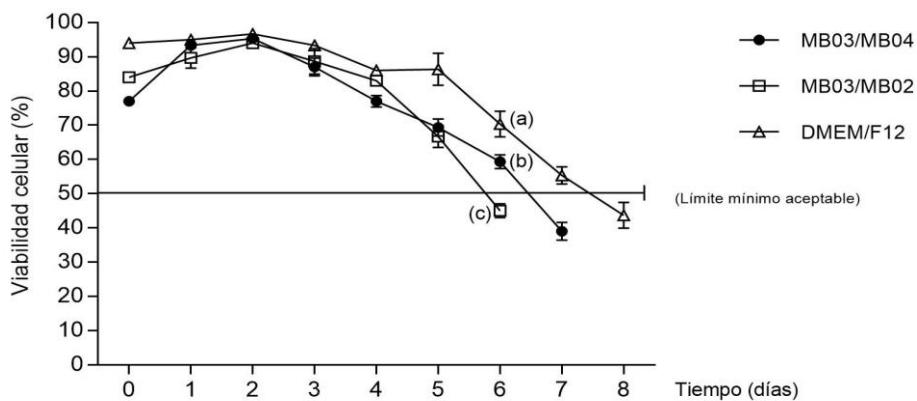


Figura 3. Viabilidad celular de los hibridomas anti-C3 en los medios de cultivo MB03/MB04, MB03/MB02 y el medio de control DEMEM/F12. Letras distintas (a,b,c), indican diferencias significativas según un ANOVA de clasificación simple acoplado a la prueba de rangos múltiple de Tukey ($p < 0.05$).



ORANGE JOURNAL

Durante el desarrollo del estudio se logró llevar la viabilidad a un valor mayor del 90%, incluso los medios MB03/MB04 y DMEM/F12 alcanzaron valores mayores e iguales que 95%. Otros autores han reportado valores de viabilidad similares para los cultivos en medios libres de suero y proteínas como Aragón (2013).

En el caso del medio MB03/MB02 solo se realizó el estudio hasta el día 6, donde se observó una caída brusca de la viabilidad por debajo del 50% (límite mínimo aceptable en el que se considera que el medio es apto), alcanzando un valor de 45% como promedio. El medio MB03/MB04 logró mantenerse un día más donde alcanzó un valor promedio de 39%. En cambio, el medio control se mantuvo durante ocho días en el estudio donde se obtuvo un promedio de 44% de viabilidad aproximadamente, en este último día.

De manera general se aprecia inicialmente un aumento de la viabilidad en los medios utilizados para el estudio, conjuntamente con el control. Este aumento se observa en los dos primeros días y luego comienza a disminuir en los próximos días debido a la pérdida de nutrientes en el medio y el envejecimiento de este. Khurshid et al., (2014) reportó la viabilidad máxima el día cuatro, en el presente estudio el pico de viabilidad se observó el segundo día, lo que demuestra la buena salud del cultivo que les permitió a las células proliferar más rápidamente que en otros.

En el presente estudio se puede observar una curva más pronunciada con una fase de crecimiento, un punto máximo de viabilidad (en los primeros días) y un descenso gradual en todos los medios. Este resultado demuestra que las características del medio le permitieron a las células desarrollarse correctamente, siguiendo una curva típica de viabilidad celular.

La muerte celular está dada fundamentalmente por la falta de glutamina, que al consumirse genera una acumulación de sustancias de desecho. Las reacciones de desaminación y transaminación que se llevan a cabo producto del metabolismo celular provocan la aparición de cuerpos cetónicos y amonio que vuelven tóxico el medio y envejecen el cultivo celular (van der Valk et al., 2010). Al comparar los medios MB03/MB02 y MB03/MB04 con el control no se aprecian diferencias significativas en los primeros días.

Se realizó un análisis de varianza para evaluar la viabilidad celular de los diferentes medios de cultivo en los días cinco y seis, al ser estos los que mayores diferencias mostraban. El día cinco no se encontraron diferencias significativas entre los medios con un valor de $p=0.09$; sin embargo, el sexto día sí se obtuvieron diferencias significativas ($p=0.0001$). Para determinar cuál era el medio que arrojaba estos resultados se acopló el ANOVA con una prueba de Tukey, demostrando que existían diferencias significativas entre los tres.

Esta diferencia observada entre los medios muestra la cantidad de días que estos son aptos para el cultivo celular, ya que al haber una caída brusca de la viabilidad en uno de ellos ya no se puede utilizar para cultivar las células. Esto está relacionado con la disponibilidad de nutrientes en el medio y el envejecimiento de los cultivos. Como se muestra en los resultados, el medio MB03/MB02 es el que menor tiempo se mantuvo en el estudio, seguido por el medio MB03/MB04. Esto podría deberse a que la concentración de citrato férrico en el medio MB03/MB02 es más elevada que en el medio MB03/MB04. Por lo tanto, aporta más amonio como desecho al medio, elemento que es definitorio en el envejecimiento del cultivo.

No obstante, los primeros días sí muestran resultados positivos, lo que reafirma la utilidad de los medios y la necesidad de realizar cambios parciales del medio para que el cultivo recupere nutrientes. El cambio en este sentido no debe ser total, debido a que estas células se encuentran en suspensión en estos medios libres de suero, además en el cultivo también hay factores de crecimiento que producen los hidromas y que son necesarios para la vida del cultivo.

En la figura 4 se muestra la concentración de células viables durante el estudio de cinética realizado y la desviación estándar de los datos.



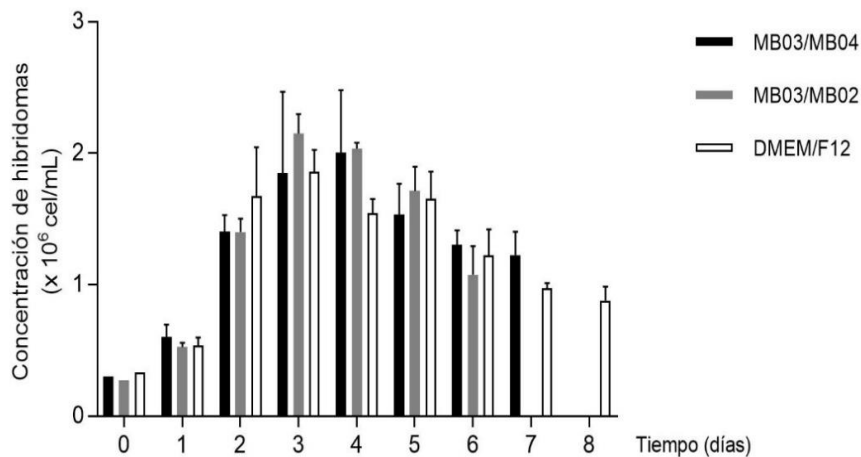


Figura 4. Concentración celular de hibridomas HLH01 en los distintos medios de cultivo. Los valores muestran la media \pm la desviación típica estándar ($n=3$). Se aplicó un ANOVA de clasificación simple ($p<0.05$).

En cuanto a la concentración de los hibridomas, se apreció un crecimiento celular en los tres primeros días del experimento, en los distintos medios utilizados. El día cuatro la concentración mostró una tendencia a la estabilización, con un crecimiento en el medio MB03/MB04 y una disminución en los medios MB03/MB02 y DEMEM/F12. A partir del quinto día de cinética disminuye la concentración de células viables en los tres medios debido a las deficiencias que presentan los distintos sueros al llevar varios días sin tratar. Al disminuir los nutrientes, las células empiezan a morir y se afecta el crecimiento de células nuevas. Las que sobreviven no tienen los elementos en el medio que necesita para desarrollarse completamente y poder producir anticuerpos.

En los tres medios se logró una concentración superior al millón de células viables por mililitro entre los días tres y seis de la cinética. Esto indica que una vez alcanzadas las condiciones óptimas para la proliferación, sin existir limitación del sustrato energético, la velocidad de crecimiento no varía (van der Valk et al., 2010).

El medio MB03/MB02 logró un incremento en la concentración mayor de dos millones de células viables por mililitro, obteniéndose valores de $2,15 \times 10^6$ cels/mL y $2,04 \times 10^6$ cels/mL aproximadamente en los días tres y cuatro respectivamente. Este resultado supera el obtenido por Aragón (2013), cuando reporta valores de $1,17 \times 10^6$ cels/mL para el medio libre de suero y proteínas y $1,15 \times 10^6$ cels/mL para el medio suplementado con suero fetal bovino. Beltran Paschoal et al., (2014) obtuvo una concentración de $1,0 \times 10^6$ cels/mL para los dos hibridomas evaluados. En cambio, Borgiani, (2020), obtuvo valores de concentración de $2,0 \times 10^6$ cels/mL aproximadamente después de 36 horas de cultivo. Este último resultado presenta valores de concentración similares a los que se muestran en el presente estudio, pero su velocidad de crecimiento es mayor. Borgiani atribuye este resultado a que el medio utilizado para la adaptación de sus células de hibridoma es químicamente definido y formulado especialmente para ese tipo de hibridomas.

El ANOVA confirmó que no existen diferencias significativas entre los medios en los distintos días, en cuanto a la concentración de células viables. Este es un resultado positivo, ya que demuestra que ambos medios son aptos para el cultivo de hibridomas productores de anticuerpos monoclonales anti-C3, teniendo en cuenta su concentración y el crecimiento celular. Este resultado permitió demostrar que la falta de suero fetal bovino no afecta el crecimiento celular en estos medios ya que tienen los componentes necesarios para que las células se desarrollen correctamente.

La caracterización de los anticuerpos estuvo basada en la potencia de aglutinación en las distintas diluciones, tanto para C3b como C3d (Fig. 5 y 6), obteniéndose como resultados un aumento de la potencia de aglutinación (tanto para C3b como C3d) durante los primeros días.

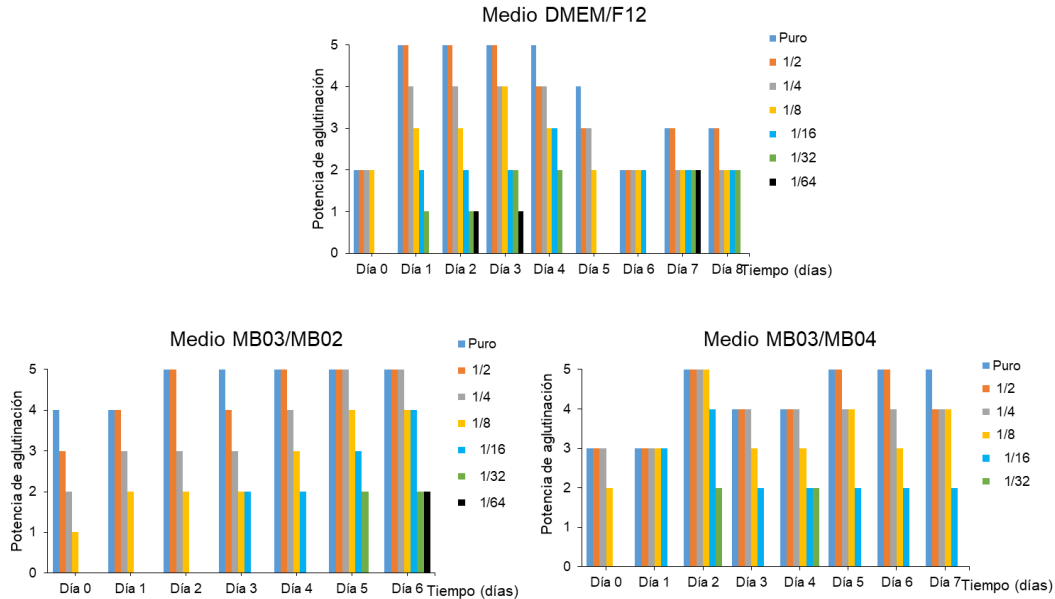


Figura 5. Potencia de aglutinación del fragmento C3b del Sistema de Complemento Humano de los dos medios en estudio y el medio control según la prueba de hemaglutinación directa con diluciones seriadas.

Con respecto a C3b se logró una potencia de aglutinación mayor de 1/4 todos los días y en los tres medios estudiados, cumpliéndose el requisito mínimo para considerar válidos los anticuerpos monoclonales para este fragmento del sistema de complemento humano. En todos los medios se obtuvo una potencia mínima de 1/8, alcanzando valores mayores a partir del día uno en los medios MB03/MB04 y DEMEM/F12 y a partir del día tres para el medio MB03/MB02. La potencia máxima obtenida fue de 1/64 para los medios DEMEM/F12 y MB03/MB02 y de 1/32 para el medio MB03/MB04.

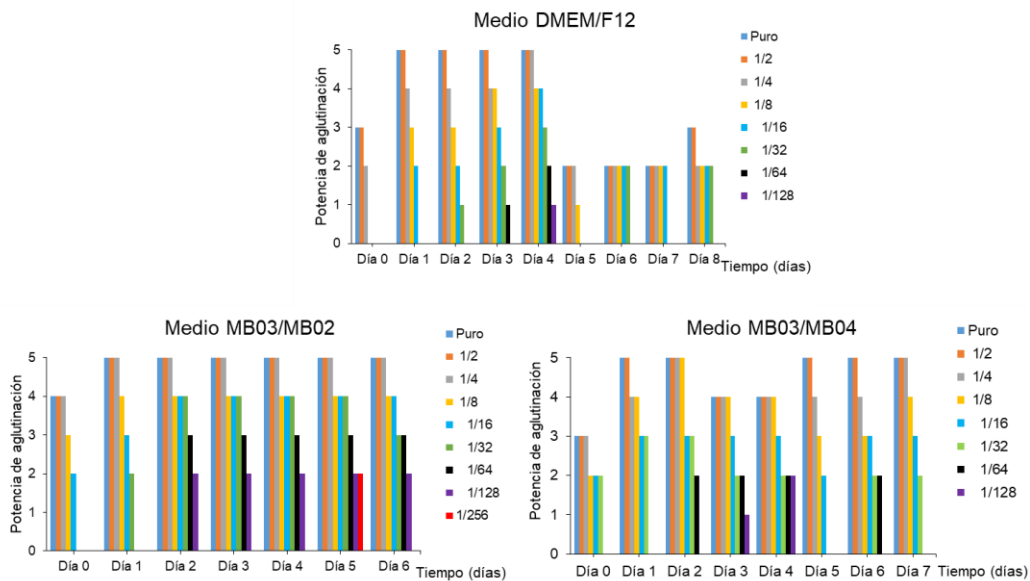


Figura 6. Potencia de aglutinación del fragmento C3d del Sistema de Complemento Humano de los dos medios en estudio y el medio control según la prueba de hemaglutinación directa con diluciones seriadas.



ORANGE JOURNAL

En cuanto al fragmento C3d, según los requisitos que se utilizan para valorar la calidad de los anticuerpos monoclonales, se necesitaba un título de anticuerpos no menos de 1/1 (puro) y reacción de 2+ de aglutinación. Los resultados obtenidos fueron mucho mayores que los esperados, obteniéndose valores mayores que con el fragmento C3b. El día uno se alcanzaron valores mínimos de 1/16 para el medio DEMEM/F12 y de 1/32 para los dos medios en estudio, llegando a alcanzar valores de 1/128 para el medio control y MB03/MB04 y valores de 1/256 para el medio MB03/MB02.

Estos resultados se correspondieron con el aumento de la concentración y viabilidad celular observadas en la caracterización de las células de hibridoma. En los últimos días, al disminuir la concentración de células viables productoras de anticuerpos, disminuye la potencia de aglutinación, tanto para C3b como para C3d. Se pudo observar como en un mismo día la potencia va disminuyendo a medida que aumentan las diluciones, lo que reafirma la veracidad de los resultados.

No se detectaron diferencias en cuanto al medio control y los medios libres de suero y proteínas evaluados, con valores obtenidos similares en todos los medios. El método utilizado para evaluar la producción de anticuerpos (hemaglutinación) es semicuantitativo, por lo tanto, no permite cuantificar la producción de anticuerpos monoclonales por las células de hibridoma. No obstante, como se puede apreciar en las figuras 5 y 6, la potencia de aglutinación presentó valores altos y similares para todos los medios, por lo que se puede concluir que la adaptación a medio libre de suero y proteínas no afectó la producción de anticuerpos monoclonales en ninguno de los dos medios a evaluar. Se considera entonces que ambos son aptos para su utilización en el cultivo de la línea celular HLH01. Estos resultados concuerdan con los de Aragón (2013).

El método de cinética resultó de gran valor para la caracterización de hibridomas y anticuerpos producidos, aportando elementos relevantes en cuanto a la utilidad de los medios libres de sueros y proteínas seleccionados para el estudio. Considerando la similitud en los aspectos evaluados, en contraste con el medio usado tradicionalmente, se demuestra que ambos medios son aptos para el cultivo de células de la línea de hibridoma HLH01. Al garantizar que estas células se desarrollen en un medio adecuado, se obtienen anticuerpos monoclonales anti-C3 de utilidad para la futura producción del suero de Coombs comercial.

Conclusiones

La inmunización con eritrocitos revestidos con el fragmento C3d del complemento constituyó una metodología relativamente sencilla y eficiente para la sensibilización de ratones BALB/c, proporcionando una población de linfocitos B contra el factor C3 para la fusión celular. Se generaron anticuerpos monoclonales, los cuales cumplieron los requisitos de especificidad y potencia de aglutinación requeridos para un componente anti-C3 de reactivos antiglobulínicos humanos. El estudio de cinética demostró la eficacia en la adaptación a las formulaciones de medios MB03/MB02 y MB03/MB04 del hibridoma secretor de anticuerpos monoclonales. Se demostró que ambos medios son aptos para su cultivo, garantizando un producto eficaz para la futura producción del suero de Coombs comercial de procedencia nacional.

Referentes bibliográficas

- Amin-Blanco, N., Reyes-López, F., Camacho-Casanova, F., Otero-Alfaro, O., Cuello-Pérez, M., Núñez-Martínez, D., ... & García-Imía, L. G. (2015). Obtención de un anticuerpo monoclonal murino que reconoce al polisacárido capsular Vi de Salmonella Typhi. *VacciMonitor*, 24(2), 57-63.
- Aragón, H., González, M., Valdés, R., Álvarez, T., Brown, E., Rodríguez, Y., ... & Wood, M. (2013). Replacement of serum supplemented medium for CB. Hep-1 hybridoma cell freezing and monoclonal antibody production. *Bioteconología Aplicada*, 30(1), 57-62.
- Borgiani, A. (2020). *Adaptación del proceso de cultivo del virus rábico en células BHK con medio libre de suero* (Trabajo final de carrera), Universidad ORT Uruguay. Repositorio Académico Digital: <https://dspace.ort.edu.uy/handle/20.500.11968/4646>
- Chronopoulou, E., Uribe-Benninghoff, A., Corbett, C. R., & Berry, J. D. (2014). Hybridoma technology for the generation of rodent mAbs via classical fusion. *Methods Mol Biol*, 1131, 47-70.





- Cruz, C., & León, G. (2007). A Simple Method for the Production of Anti-C3d Monoclonal Antibody. *Hybridoma*, 26(6), 433-434.
- Beltran Paschoal, J. F., Patiño, S. S., Bernardino, T., Rezende, A., Lemos, M., Pereira, C. A., & Calil Jorge, S. A. (2014, October). *Adaptation to serum-free culture of HEK 293T and Huh7. 0 cells*. In BMC Proceedings (Vol. 8, pp. 1-1). BioMed Central.
- Garzón Feria, M., Megret Despaigne, R., Aldana Laterrade, A., & Brugal Mustelier, E. (2022). Comunicación del farmacéutico comunitario desde la perspectiva del paciente crónico en Santiago de Cuba. *Revista Científica Del Amazonas*, 5(9), 5-13. <https://doi.org/10.34069/RA/2022.9.01>
- GUOTIENT. (2022). *Polyspecific Anti-Human Globulin Reagent BLOOD GROUPING REAGENT Rabbit Polyclonal*. Murine Monoclonal Blend. United Kingdom. https://alivedx.com/wp-content/uploads/2023/09/Z350PI_07.pdf
- International Reference Reagents. (2013). *Antihuman Globulin Reagent*. United Kingdom. <https://europepmc.org/article/MED/10516559>
- Hashmi, F. K., Cail, R., Islam, M., Saleem, Z., Amin, U., Hussain, K., & Saeed, H. (2014). Adaptation of WM-68 Hybridoma Cell-line in Minimal Serum and Serum Free Culture Conditions. *Pakistan J. Zool.*, 46(2), 355-362.
- Machado, N. P., Tèllez, G. A., & Castaño, J. C. (2006). Anticuerpos monoclonales: desarrollo físico y perspectivas terapéuticas. *Infection*, 10(3), 186-197.
- Palacio-Oliva, J. L., & Pérez-Yanes, R. A. (2019). Nuevas formulaciones de medios de cultivo libres de suero para el incremento de la productividad de la línea celular recombinante Her-1. *Revista Cubana de Ciencias Biológicas*, 7(2), 1-5.
- Pérez-Bernal, M., Valdivia, O., Blanco, R., Pérez, J., Domínguez, A., Basabe, L., & Cabrera, Y. (2021). Murine Monoclonal Antibodies against the Antimicrobial Peptide Oreoch-2 from Tilapia (*Oreochromis niloticus*). *International Journal of Scientific Research in Biological Sciences*, 8(1), 32-35.
- Rapid Labs. (2020). *Anti-human globulin (rabbit) polyspecific anti-IgG and C3d directions for use, AHG for Antiglobulin Techniques*. United Kingdom. <https://acortar.link/YWfqCq>
- Rivera-Rivera, K. A. (2019). *Evaluación comparativa del crecimiento de la línea celular BHK 21 en un medio suplementado con suero bovino adulto y otro medio libre de suero*. (Trabajo final de carrera), Universidad de La Salle, Bogotá. Repositorio de tesis de la Universidad de La Salle <https://ciencia.lasalle.edu.co/biologia/54>
- Rodríguez Leyva, R., Menéndez Corona, J., Silveira Sánchez, E., & Paneque Tamayo, D. (2010). "Producción de suero de Coombs en carneros inmunizados con globulinas humana opsonizadas." *Rev Cubana Hematol Inmunol Hemoter*, 26(3), 228-235.
- Ruiz, G. (2007). *Anticuerpos monoclonales terapéuticos. Informe de Vigilancia Tecnológica*. Editorial: Genoma España.
- Simancas-Escorcia, V., & Diaz-Caballero, A. (2019). Impacto de la concentración de suero fetal bovino sobre las células epiteliales dentales. *Entramado*, 15(1), 276-284.
- Spinreact. (2017). *Anti human globulin (coombs)*. C. S. Coloma. España. <https://acortar.link/IWRaAl>
- Theis, S. R., & Hashmi, M. F. (2020). *Coombs Test*. National Library of Medicine. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK547707/>
- Van der Valk, J., Brunner, D., De Smet, K., Svenningsen, Å. F., Honegger, P., Knudsen, L. E., ... & Gstraunthaler, G. (2010). Optimization of chemically defined cell culture media—replacing fetal bovine serum in mammalian in vitro methods. *Toxicology in vitro*, 24(4), 1053-1063.
- Yokoyama, W. M., Christensen, M., Santos, G. D., Miller, D., Ho, J., Wu, T., ... & Neethling, F. A. (2013). Production of monoclonal antibodies. *Current protocols in immunology*, 102(1), 2-5.

