

Obtención de un marcador leucocitario anti-CD45 para citometría de flujo

Obtaining a anti-CD45 leukocyte marker for flow cytometry

MsC. Grisel Rabell Velázquez^I, DraC. Suyén Rodríguez Pérez^I, MsC. Jorge Fernández Duarte^I, Ing. Yanet Rivero Fernández^I, MsC. Katya Ramirez Tur^I, MsC. Mercedes Cedeño Arias^{III}, Lic. Rancés Blanco Santana^{III}, Dr. Elio Cisneros Prego^I, Dra.C. Rosa María Pérez Silva^{II}

suyen@cim.sld.cu

^I **Laboratorio de Anticuerpos y Biomodelos Experimentales (LABEX). Santiago de Cuba. Cuba.** ^{II} **Universidad de Oriente. Santiago de Cuba. Cuba,** ^{III} **Centro de Inmunología Molecular. Habana. Cuba**

Recibido: 22 de septiembre de 2016

Aprobado: 8 de Febrero de 2017

Resumen

El reactivo anti-CD45 conjugado con Isotiocianato de Fluoresceína (FITC) es útil para el diagnóstico y estudio de inmunodeficiencias de células T y B; en este trabajo para su obtención se modificó la relación entre el fluorocromo y el anticuerpo a conjugar mediante tres protocolos, partiendo de la proporción 1:2 recomendada. El anticuerpo fue purificado por cromatografía de afinidad, a una pureza de 99,3 %. Se evaluó la relación FITC/Proteína mediante la lectura del conjugado a 495 nm y 280 nm; y el porcentaje de reconocimiento leucocitario para citometría de flujo. El producto mostró buena actividad biológica con porcentaje de reconocimiento leucocitario en el rango de 90,7 % - 96,8 %, destacando el P-2 que permite del reactivo a un menor costo de producción, en comparación con el precio del producto importado; quedando establecido el proceso de conjugación para el anti-CD45 con FITC en el Laboratorio de Anticuerpos y Biomodelos Experimentales (LABEX).

Palabras clave: anticuerpo monoclonal, marcador leucocitario, Isotiocianato de Fluoresceína (FITC), citometría de flujo.

Abstract

The reactive anti-CD45 is useful for the diagnostic and the study of T or B cells immunodeficiency. In this works were assayed three protocols with the purpose to obtain this reagent for the production, each one modifying the relation among the fluorochrome and the antibody (F:P) to conjugate, referred to the proposal of 1 : 2 recommended. The antibody was purified by affinity chromatography with 99,3 % of purity; was evaluated the relation FITC/Protein to 495 nm and 280 nm; and also, was obtained the leukocyte recognition percent through cytometry of flow by three tried protocols which evidence good biological activity (90,7 % - 96,8 %). The best protocol was P-2, with the lowest production cost and highest profits compared with product imported usually used in health system. This study permitted establishes the process to obtain anti-CD45 - FITC conjugated in LABEX laboratories.

Keywords: monoclonal antibodies, leukocyte marker, Fluorescein isotiocyanate (FITC), flow cytometry.

Introducción

La posibilidad de generar anticuerpos específicos para detectar una gran variedad de enfermedades contribuye a diversificar su uso en clínica. Estos resultan de gran ayuda en el diagnóstico, identificación y evaluación de trastornos neoplásicos (ej. leucemias y linfomas), a través del reconocimiento de antígenos presentes en la superficie de las células para determinadas subpoblaciones leucocitarias.

El CD45 es un antígeno blanco para la detección de poblaciones de leucocitos, consistente en un grupo de glicoproteínas de superficie de las membranas que se expresan en todas las células hematopoyéticas normales, exceptuando los eritrocitos maduros. Este tiene un peso molecular de 180 - 240 kDa y es conocido también como antígeno común leucocitario (*common leukocyte antigen*, CLA) o panleucocitario, que funciona asociado a una tirosina fosfatasa que parece ser crucial para los procesos de activación celulares. [1,2] Los anticuerpos que son dirigidos a su estructura principal, reconocen todas las isoformas presentes de la molécula leucocitaria.

Una herramienta poderosa para definir y enumerar leucocitos es la Citometría de Flujo (CF), pues permite distinguir el linaje celular e inferir el estadio de maduración de la mayoría de las células hematopoyéticas. [3] En la actualidad se aplica en ensayos de rutina en laboratorios clínicos y de investigación para el fenotipaje de estirpes celulares diferentes. [4] La CF utiliza anticuerpos (Ac) marcados con Fluorocromos, como el Isotiocianato de Fluoresceína (FITC), para la detección de antígenos sobre las superficies celulares; de forma tal, que cuando el Ac reacciona con el antígeno se forma un complejo específico y el fluorocromo acoplado a este, al recibir la luz incidente, emite una señal fluorescente que revela la reacción la que es detectada por el Citómetro.

El Isotiocianato de Fluoresceína (FITC) es una molécula pequeña que se conjuga normalmente mediante reacción vía aminos primarias, uniéndose mediante enlace covalente con los grupos amino y carboxilo de la proteína y el cloruro de sulfonilo del FITC, en condiciones de pH alcalino. Para cada molécula de anticuerpo se describen conjugaciones de 3 a 6 moléculas de FITC, ya que una mayor cantidad de uniones puede provocar problemas de solubilidad. [5, 6]

El anti-CD45 es un anticuerpo monoclonal que se utiliza para identificar y enumerar leucocitos CD45 en sangre periférica humana y para identificar células tumorales, no hematopoyéticas. [7, 8] Su utilidad en la tipificación en celular se basa en que es una proteína expresada de manera constitutiva en todas las células hematopoyéticas, que

incrementa su presencia en los estadios finales de la hematopoyesis para los diferentes linajes celulares leucocitarios o ante situaciones que generen altas concentraciones celulares y permanece de manera estable en las células maduras.

Partiendo de lo anterior, el objetivo de este trabajo fue obtener el anticuerpo anti-CD45 purificado a partir de Líquido Ascítico Murino y evaluar su conjugación con Isotiocianato de Fluoresceína, a través de tres protocolos de experimentación para la obtención de un reactivo de uso en Citometría de Flujo, con criterio de costo aceptable para el desempeño productivo.

Materiales y métodos

El trabajo experimental de esta investigación fue desarrollada en el Centro de Inmunología Molecular (CIM) en Ciudad de La Habana y en su Dirección de diagnósticos, Laboratorios de Anticuerpos Monoclonales y Biomodelos Experimentales (LABEX) en Santiago de Cuba.

Obtención del Anticuerpo monoclonal purificado

El anti-CD45 fue purificado a partir Líquido Ascítico Murino (LAM) obtenido en ratones Balb/c, como resultado de un proceso de inmunización descrito en trabajos anteriores. [9,10]

Purificación del AcM

Se descongeló el LAM en baño de agua atemperada entre 2 y 8 °C, y posteriormente se filtró a gravedad con papel de filtro para eliminar los lípidos. Para la obtención del anticuerpo purificado se utilizó un sistema cromatográfico FPLC (*Fast Protein Liquid Chromatography*), utilizando una matriz de Afinidad con Proteína A-Sepharose. Para su control se utilizó el software Unicorn 4.12®, como buffer de equilibración el Tris 50 mM, NaCl 1M a pH 8,5; y la elución de la IgG 1 se realizó con Buffer Citrato 0,1 M pH 4. El purificado fue dializado en Buffer Fosfato Salino pH 7,2 (PBS) para su cambio de pH, durante 24 horas, a una temperatura entre 2 - 8 °C; realizando tres cambios de diálisis. [11]

Análisis de recobrado

El recobrado del proceso de purificación se calculó según la siguiente ecuación (1):

$$Y = \frac{\text{masa 2}}{\text{masa 1}} \times 100 \quad (1)$$

dónde:

Y: Recobrado (%).

Masa 2: Masa del Ac M purificado (g).

Masa 1: Masa del Ac M en el LAM (g).

Determinación de la concentración de IgG por espectrofotometría

La determinación de la concentración de la IgG 1 murina, se realizó mediante espectrofotometría (UV-visible) utilizando el espectrofotómetro marca PG INSTRUMENTS modelo T80.

Ensayos de pureza de la muestra purificada

Para la determinación de la pureza del purificado se utilizaron dos métodos: la electroforesis reducida y no reducida y la Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC).

Electroforesis en gel de poliacrilamida

La electroforesis de proteínas, cuyo fundamento es la separación de las moléculas según su carga eléctrica, nos permite aislar y caracterizar moléculas según su peso molecular. [12]

Para comprobar la pureza e integridad del anticuerpo Anti-CD45 purificado a partir de LAM, se aplicó la técnica de electroforesis reducida y sin reducir en geles de poliacrilamida en presencia Duodecil Sulfato de Sodio (desnaturalizante) y en condiciones reductoras (2-mercaptoetanol) como método de bajo costo ampliamente utilizado para cuantificar, comparar y caracterizar proteínas según lo describe. [13,14]

Se utilizó, en un equipo de electroforesis vertical Mini Protean 3[®] Cell (Bio-rad; Alemania); la visualización de la banda se alcanzó con Azul de Coomassie (Biorad[®]).

Determinación de Pureza por HPLC

La cromatografía líquida en alta presión (HPLC), es un método que se caracteriza por la selectividad, reproducibilidad, sensibilidad y rapidez, permitiendo analizar potencialmente una mezcla de proteínas. Entre los mecanismos de interacción utilizados en el HPLC se encuentra la exclusión molecular, que se basa en las diferencias de peso molecular de las moléculas presentes en el purificado, donde las moléculas de mayor peso molecular son aquellas que ofrecen menor tiempo de retención en la matriz de exclusión, seguidas de la de menor peso molecular que al tener menor peso molecular y

mayor tiempo de retención, demoran más en abandonar la fase estacionaria. [15] La separación se realizó en presencia de un gel de exclusión TSK-GEL G3000 SW_{XL}.

Obtención del conjugado

Preparación del AcM

Para la conjugación con el FITC (isómero I, Sigma Catálogo F4274) del anticuerpo monoclonal purificado, se verificó que la concentración de proteína fuese mayor de 4 mg/mL. Se dializó el anticuerpo por 24 h en buffer carbonato-bicarbonato de pH 9,5 utilizando bolsas de diálisis (Spectral/Por4[®]).

Conjugación del AcM con FITC

La conjugación del AcM se realizó mediante tres protocolos (1, 2, 3) en los cuales se varió la cantidad del fluorocromo empleado en la mezcla de conjugación, utilizando como disolvente del fluorocromo, el Dimetilsulfóxido (DMSO) Hybri-max SIGMA[®]. [16]

El protocolo de conjugación 1 se estableció partiendo de la relación establecida FITC/proteína (1:2) por Harlow, E. and Lane D; siendo aplicada dicha relación a la molécula en particular. Los protocolos 2 y 3 se obtuvieron variando la relación descrita por los autores a una proporción de 1 : 4,6 y 1 : 7, respectivamente; en correspondencia con una razón molar F/P de 3-8 reportada por Roederer. [16, 17, 18]

Se preparó la solución FITC-DMSO según la cantidad de FITC de cada protocolo (isómero I, Sigma F4274) para 500 uL de DMSO (Sigma), adicionando al anticuerpo en agitación, 50 µL de la mezcla FITC-DMSO, en alícuotas de 5 uL; con posterior incubación del Ac en fluorocromo, por 24 h de 2 - 8°C. [19]

Purificación del Conjugado

La purificación del conjugado se realizó mediante la cromatografía de exclusión molecular utilizando Sephadex G-25, realizando la colección de la fracción coloreada, para evaluar posteriormente el comportamiento de la relación FITC/Proteína y el porcentaje de Reconocimiento leucocitario mediante Citometría de flujo. [20]

Métodos analíticos

Determinación de la relación FITC/Proteína

La determinación de la relación F/P en la muestra purificada se realizó por espectrofotometría a una densidad óptica de 280 nm para detectar las moléculas de

anticuerpo fluorescente en el producto conjugado y a 495 nm para detectar la presencia de moléculas de fluorocromo acoplado a la proteína en el espectro visible del equipo. Para determinar la razón molar se utilizó la siguiente ecuación (2).

$$\frac{F}{P} = \frac{2,77 \times A(495 \text{ nm})}{A(280 \text{ nm}) - 0,35 (A 495 \text{ nm})} \quad (2)$$

donde:

F/P Relación FITC/Proteína

A 495 nm Absorbancia a 495 nm (del fluorocromo)

A 280 nm Absorbancia a 280 nm (del anticuerpo)

Se compilaron y tabularon los datos obtenidos.

Determinación de la actividad biológica del producto

La actividad biológica del producto se determinó mediante el porcentaje de reconocimiento leucocitario del Anticuerpo fluorescente por Inmunofluorescencia Directa (I.F.D), entre el anticuerpo fluorescente y el antígeno CD45 de la superficie de los leucocitos. Esta reacción fue detectada a través de un Citómetro de Flujo Beckman Coulter, modelo Gallios. [21]

Análisis estadístico

Se procedió a determinar los valores promedios y las desviaciones estándares, para las respuestas a los tratamientos (protocolos ensayados): la relación FITC/Proteína y la actividad biológica. Se realizó análisis de normalidad usando la prueba de Kolmogorov-Smirnov, a los valores obtenidos en las fracciones de purificación de cada protocolo, indicando transformación de escala de 0,05 utilizando el programa Microsoft Excel®2010. Posteriormente se compararon cada protocolo mediante ANOVA tipo II y comparación de medias *a posteriori*.

Resultados y discusión

Obtención del AcM purificado

Para la obtención del anticuerpo purificado se utilizó como materia prima el LAM L3 anti CD45, el cual, según documentos técnicos debe tener una concentración $\geq 0,2$ mg/mL del anticuerpo específico. El LAM L3 anti CD45 fue obtenido en ratones Balb/c, aplicando un esquema de inmunización descrito por Soria N., como se mencionó anteriormente en Materiales y Métodos. [9,10]

Con el desarrollo de la tecnología de obtención de AcM, varios autores reportan que los costos de la etapa de purificación resultan los mayoritarios en el proceso y se encuentran entre el 40 y el 80 % de los costos de producción total. [20,21] En este trabajo el método seleccionado para separar la IgG 1 murina purificada a partir del LAM fue la cromatografía de afinidad con proteína A, a pesar del mayor costo relativo de esta; debido a que en un solo paso cromatográfico se obtiene el anticuerpo concentrado, pudiendo superar lo recomendado para el producto y en menor tiempo, menos pasos que incrementan las pérdidas del producto deseado. [¡Error! Marcador no definido.]

La concentración de inmunoglobulinas en el purificado fue determinada por espectrofotometría UV-visible, evidenciándose además la presencia de una sola especie absorbente. El valor de la concentración obtenido fue de 7,08 mg/mL de IgG1 murina, superando el criterio de aceptación para la IgG1 purificada a partir de LAM según los documentos técnicos aplicados en LABEX para este producto, el cual plantea que debe ser mayor de 0,50 mg/mL. [21]

El análisis de recobrado mediante el cálculo, arrojó un porciento de 83 %; por lo que para una masa inicial de 180 mg se colectó una masa final de 149,4 mg. Esto demostró la eficacia del proceso cromatográfico, permitiendo la captura de los anticuerpos en un solo paso y recuperando gran parte del anticuerpo de interés debido a la alta selectividad de la misma. [23]

Obtención del conjugado IgG1-FITC

Una vez obtenida la molécula de AcM de interés que permitirá el diseño del diagnosticador, mediante el reconocimiento específico del antígeno diana, se ha de proceder a la unión covalente (conjugación) con el fluorocromo definido según el método de detección que se emplee en el diagnóstico. En trabajos anteriores se ha establecido entre las condiciones óptimas para que se logre de manera efectiva el proceso de conjugación, que es importante garantizar una concentración del anticuerpo mayor de 4 mg/mL. [¡Error! Marcador no definido., 18] Por lo que el paso cromatográfico desarrollado, permite cumplir con este requerimiento en cuanto a concentración de moléculas de anticuerpos como proteínas disponibles.

En los procesos de conjugación con anticuerpos monoclonales resulta vital para la obtención del producto, la ausencia de cualquier contaminante en la muestra, ya que esta puede producirse de manera inespecífica afectando la actividad biológica esperada. Por lo que durante todo el proceso deben aplicarse métodos que comprueben la pureza

de la misma. Se conoce que la IgG 1 tiene un peso molecular aproximado de 150 kDa, y la presencia de una única banda a este nivel puede tenerse como un criterio de pureza. [21,22]

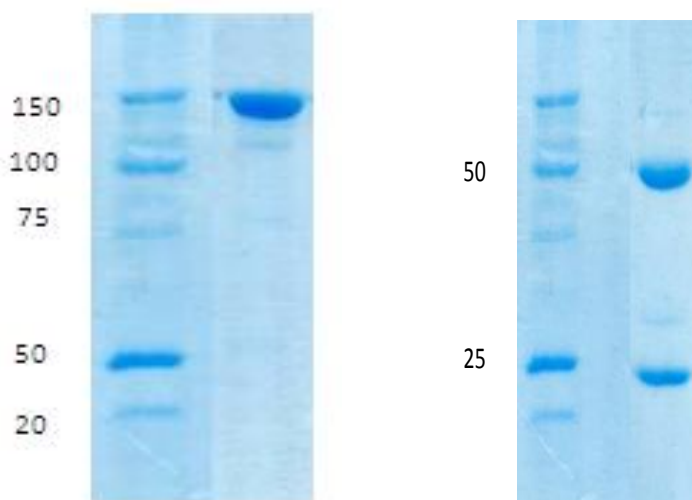


Fig. 1. Electroforesis no reducida (A) y reducida (B) de proteínas para identificar IgG. Se aplicaron 10 μ L del patrón (Unstained de Biorad®) y de la muestra purificada. Línea 1: patrones de peso molecular, Línea 2: muestras del purificado.

El resultado mostrado en la figura 1 demuestra que en el purificado obtenido, comparado con el patrón (Unstained de Biorad®) de pesos moleculares, solo exhibe una banda con un peso molecular aproximado de 150 kDa en correspondencia con la IgG 1, lo que nos permite fundamentar que el producto obtenido no contiene ningún contaminante detectable en las condiciones de ensayo y que se trata de la biomolécula de interés.

En la figura 2 se muestra el cromatograma obtenido mediante HPLC en el gel de filtración para la separación e identificación de la IgG1. En el cromatograma se reportan cuatro picos, los que corresponden a la separación de compuestos detectados por medios ópticos. No obstante, solo tres de estos picos cromatográficos resultan de interés, por presentar una resolución ≥ 1 (tabla de la figura 2), lo que separa la probabilidad de lectura del ruido por la sensibilidad de los métodos involucrados. Atendiendo a los tiempos de retención de cada uno de los picos “útiles”, se puede establecer una identificación de la presencia de la IgG1 nativa (monómero) y agregados moleculares de estas.

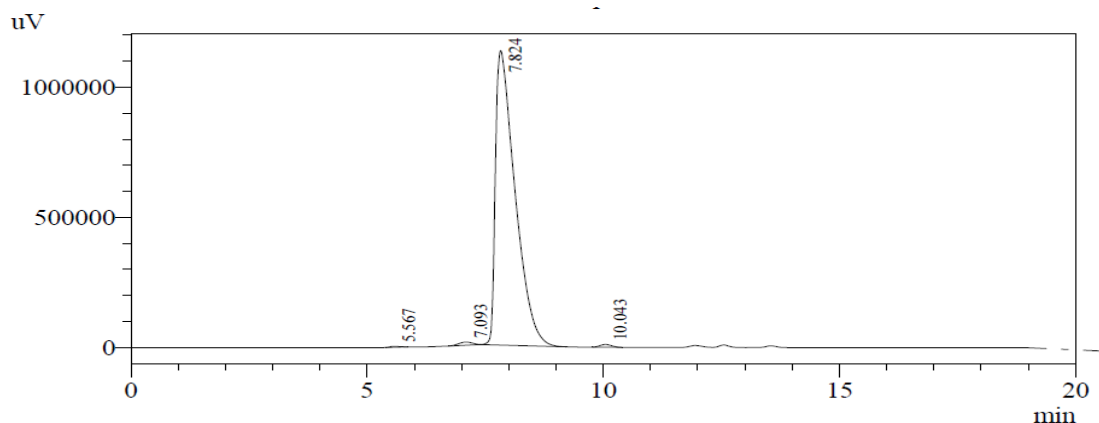


Fig. 2. Cromatograma obtenido de la aplicación de una muestra de IgG1 murina purificada, mediante HPLC. La muestra fue aplicada a una concentración de 5 mg/mL. El eje X representa el tiempo de retención de la proteína a través del gel de filtración con relación a la intensidad de la señal de absorbancia en el UV en el eje Y.

Según el orden de elución, el primer pico se corresponde con aquellos agregados de la IgG 1 formados por más de dos moléculas, conocidos como multímeros; el segundo, representa los dímeros formados de la agregación; el tercer pico y de mayor tamaño, corresponde a los monómeros constituidos por las moléculas del Ac no agregados; y a continuación se observa otro pico menor correspondiente a pequeños fragmentos de Ac, lo cual podría adjudicarse a la liberación de pequeños péptidos que se obtienen como resultado de la presión del sistema sobre las moléculas de IgG 1. Esto coincide con el tiempo de retención reportado para los anticuerpos monoclonales, bajo similitud de condiciones. [23,24]

Este ensayo muestra una pureza de 99,3 % para la IgG 1 con relación a las muestras añadidas y la sumatoria de las áreas bajo los picos identificados (ver tabla resumen del gráfico), las que se relacionan con las concentraciones recuperadas en cada fracción. [23,24] Se resalta que este valor no tiene en cuenta la aportación por la presencia en la muestra de los multímeros y los fragmentos peptídicos del Ac, puesto que se asume que estos últimos no constituyen contaminantes, sino sólo agregados moleculares de la misma proteína por las condiciones de purificación, conservación y estabilidad. [25, 26]

Como complemento del estudio y a diferencia de la electroforesis, el método de HPLC permitió evaluar en este ensayo la predominancia de la IgG 1 en forma nativa, a partir de los datos de purificación obtenidos.

La molécula de inmunoglobulina al separarse en la electroforesis en sus cadenas ligeras y pesadas, favorecida por las condiciones reductoras, exhiben pesos relativos que son de

aproximadamente 25 kDa y 50 kDa respectivamente.[27] Estos datos coincide con las dos bandas mostradas en la Figura 1, donde se observan correspondencia con: la cadena pesada (50 kDa), con un 48,8 % del total de proteínas y la cadena ligera (25 kDa), representando unos 23,1 % de proteínas; referidos al patrón utilizado.

Determinación de la relación F/P

Para la obtención del Anti CD45 conjugado con FITC se aplicaron tres protocolos de conjugación. Se toma como referencia la proporción 1 : 2 (m/m) (FITC/Proteína), validada por varios autores y se variaron respetando las proporciones entre 3 - 10. [5, **¡Error! Marcador no definido., ¡Error! Marcador no definido.**] La proporción 1 : 2 usada como referencia a la IgG1 murina se asumió como el protocolo 1 del ensayo y el resto de las proporciones ensayadas consistieron en los protocolos 2 (F/P 1:4,6) y 3 (F/P 1:7).

La relación FITC/Proteína (F/P) se establece para dar a conocer la cantidad de moléculas de fluorocromo que hay acopladas por molécula de anticuerpo, en este caso IgG 1 murina. Para su obtención y seguimiento se utilizó la espectrofotometría mediante la relación entre la densidad óptica leída a 495 nm y a 280 nm. [**¡Error! Marcador no definido.**]

En la figura 3 se representa el rango de relaciones moleculares obtenidas en el proceso de conjugación, usando los tres protocolos para la IgG1 murina con FITC. En el protocolo 1 se obtuvo entre 7,1 - 9,7 moléculas de FITC conjugadas al anticuerpo; el 2, en el rango de 4,8 - 7,1 y el 3, en el rango de 5,1 - 5,3. Esta relación molar indica una alta capacidad adsorptiva de la molécula de fluorocromo por el anticuerpo (≥ 5), favoreciendo la intensidad de fluorescencia y por tanto la potencia del diagnosticador. Como se aprecia la adsorción de moléculas de FITC por este Ac, según protocolo 3 resulta más restringida que el 2 y el 1, evidenciando una capacidad de saturación de sitios específicos de reacción lo que limita esa capacidad adsorptiva. Por otro lado, se sugiere evaluar con cuidado las cantidades del fluorocromo a emplear, por la influencia negativa que puede tener su exceso por la competencia al ocupar los sitios de unión al antígeno; pudiendo afectar funcionalmente la molécula. Para descartar estas posibilidades, se recomienda incorporar en la evaluación una técnica sensible de detección del reconocimiento celular, como las técnicas de inmunofluorescencia directa (I.F.D).

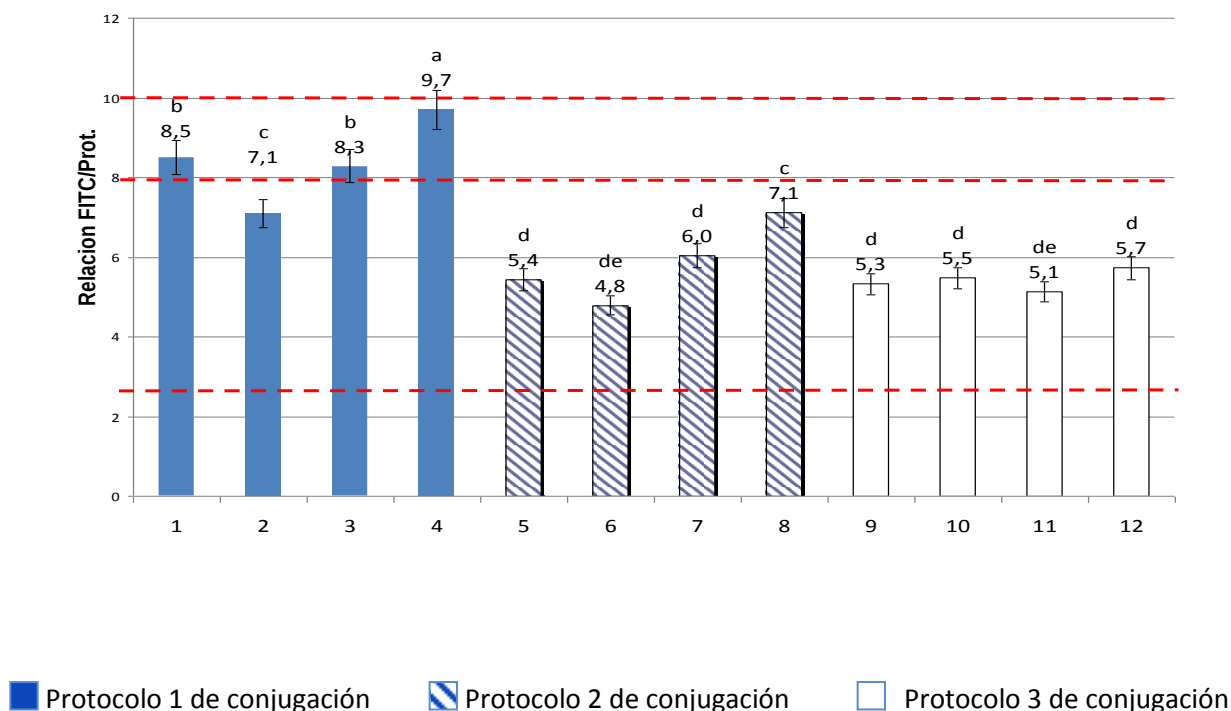


Fig. 3. Comportamiento de la relación Fluorocromo/Proteína de anticuerpo, de las fracciones conjugadas según los diferentes protocolos ensayados. (En líneas discontinuas los límites recomendados en las proporciones de F/P).

Determinación de la actividad biológica de los conjugados

La actividad biológica del producto conjugado se determinó mediante la detección del porcentaje de reconocimiento leucocitario del Anticuerpo fluoresceinado por la técnica de Inmunofluorescencia Directa (I.F.D); revelando por Citometría de Flujo (C.F), la reacción antígeno anticuerpo que se establece entre el anticuerpo fluorescente y el antígeno CD45 presente en la superficie celular de los leucocitos en sangre periférica humana. Esta reacción es detectada a través de un Citómetro como equipo. [8, 18]

La figura 4 representa los gráficos obtenidos en el citómetro de flujo Beckman Coulter, al ensayar los conjugados obtenidos por los tres protocolos de conjugación. La figura muestra en el eje de las X la complejidad de la células o granulosidad como FSC (forward scatter) y el tamaño de la célula es representado en el eje de las Y, como SSC (side scatter), permitiendo identificar las poblaciones subpoblaciones.

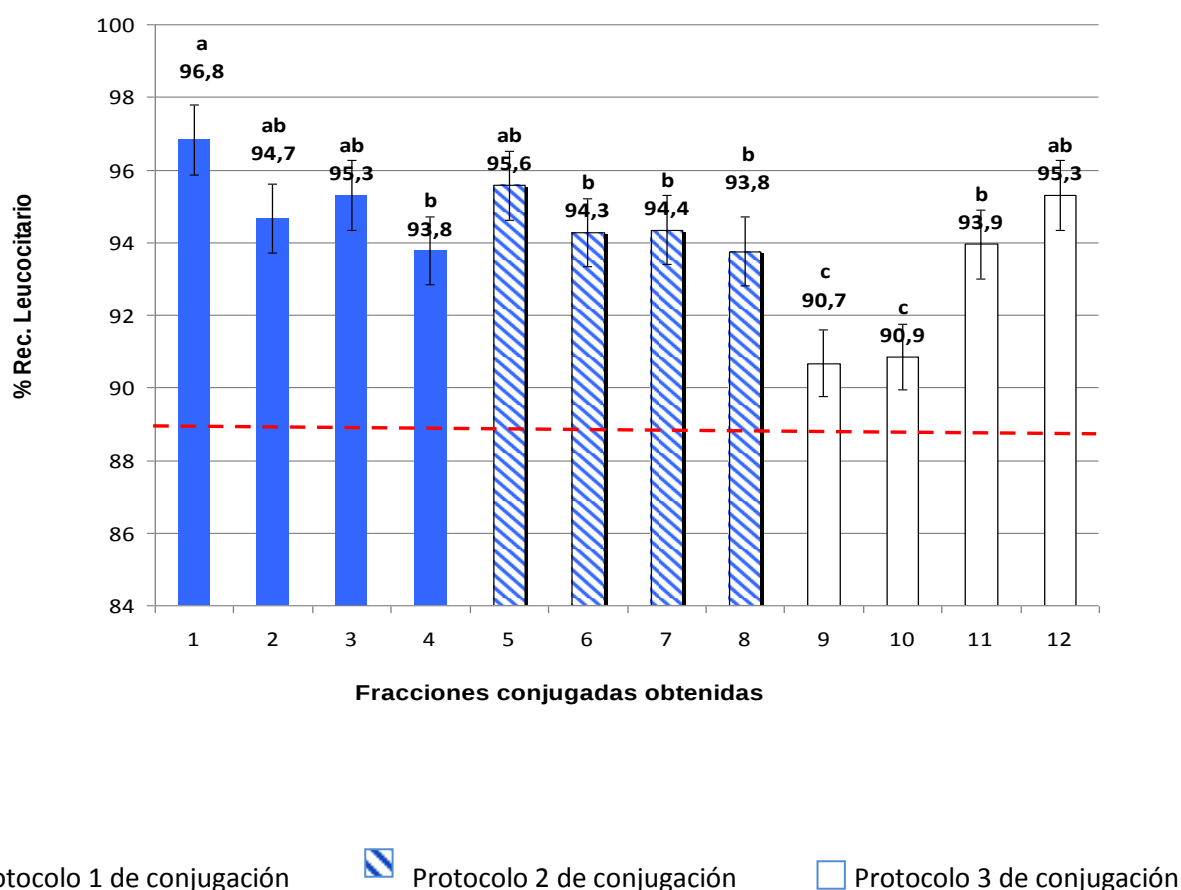


Fig. 4. Comportamiento del Porcentaje de Reconocimiento Leucocitario de las fracciones conjugadas. (En líneas discontinuas el límite aceptado de reconocimiento para los reactivos de diagnóstico por Citometría de Flujo).

Estos resultados fueron evaluados comparando el anticuerpo conjugado antiCD45-FITC obtenido con uno patrón de la firma comercial DAKO™, el cual manifiesta un porcentaje de reconocimiento leucocitario en el rango de 89 - 100 % permitiendo la detección de los leucocitos en sangre periférica humana.

El comportamiento gráfico del porcentaje de Reconocimiento Leucocitario para los protocolos ensayados se representa en la figura 5, utilizando el mismo código de colores/tramas de la figura 3. Los resultados mostraron valores que se encuentran en el rango reportado por la literatura, según la norma de Calidad para un marcador Leucocitario de sangre periférica humana, el cual debe tener un porcentaje de reconocimiento de células leucocitarias de 89 – 100 %. [28]

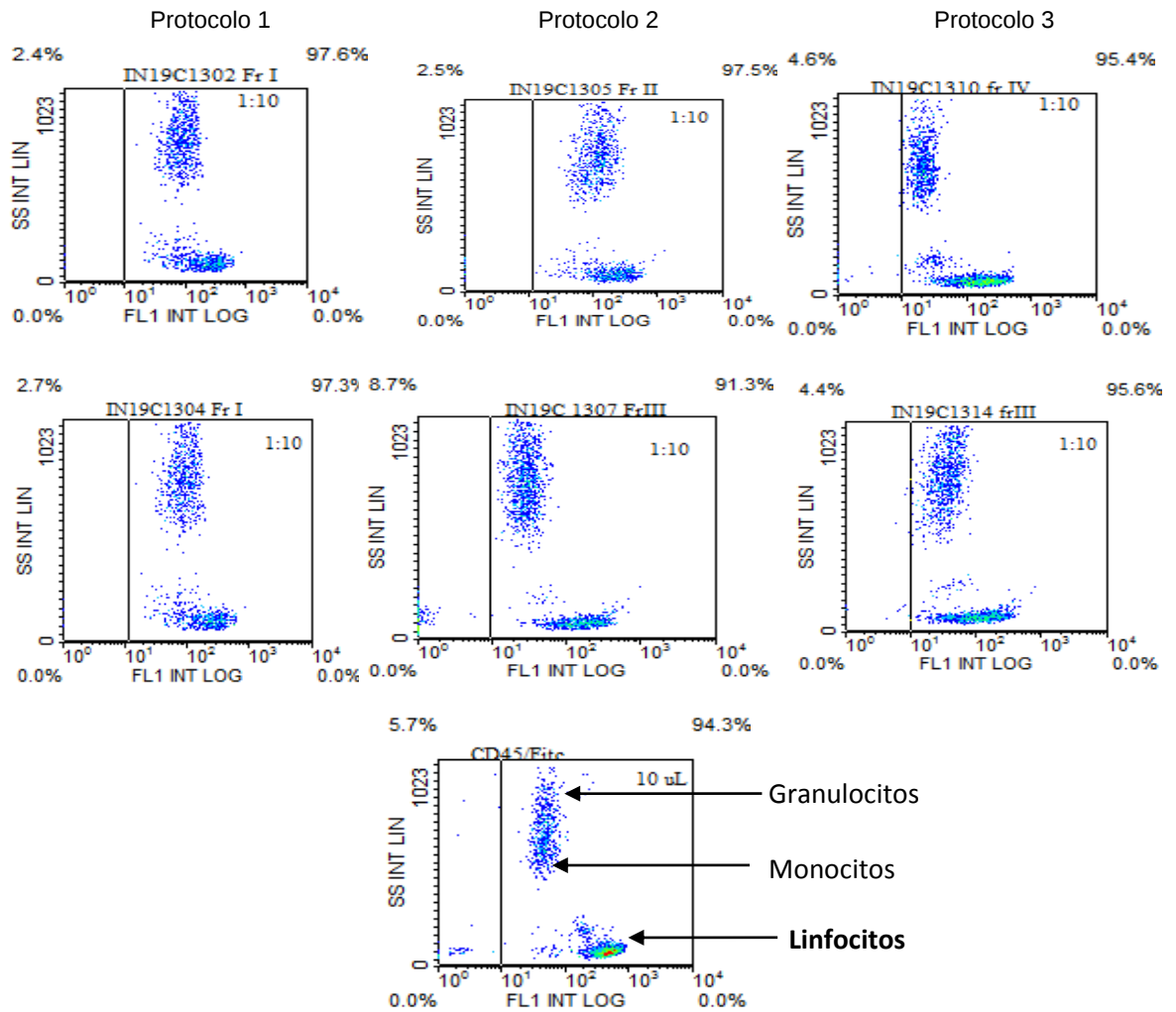


Gráfico del patrón anti-CD45-FITC (DAKO)

Fig. 5. Comportamiento gráfico de la actividad de reconocimiento de los conjugados FITC/Proteínas de anticuerpos, obtenidos por Inmunofluorescencia Directa medida mediante Citometría de Flujo, según cada protocolo ensayado. Se muestra a modo de comparación el patrón del anti-CD45 conjugado con FITC.

Los mejores protocolos en cuanto a actividad biológica fueron el 1 y 2. En las fracciones del producto conjugado obtenido mediante el P-1, se observa que el porcentaje de reconocimiento se comportó en el rango de 93,8 - 96,8, similar en el P-2 con 93,8 - 95,6. Los valores de reconocimiento leucocitarios obtenidos en los tres protocolos anteriores fueron altos para la identificación celular, por la presencia en el producto conjugado de la mayor cantidad de anticuerpos fluorescentes facilitando la interacción de las moléculas presentes, con un mínimo de interferencias en la especificidad quizás por fenómenos de competencias.

Los tres protocolos de conjugación dieron lugar a la obtención de un producto conjugado, con una razón molar según los criterios reportados y un porcentaje de reconocimiento leucocitario en el rango adecuado para un marcador leucocitario.

Consideraciones económicas sobre la obtención del marcador leucocitario

Para obtener un primer acercamiento a una valoración económica del posible diagnosticador basado en el Ac antiCD45 conjugado con FITC, se tuvo en cuenta el costo de producción del mismo según protocolos ensayados y en comparación con los costos de productos similares importados al país para el diagnóstico, basado en sus precios de adquisición, ya que no se tienen referencias de costos productivos asociados. Hay que significar que el Sistema de Salud Pública cubano promueve la inserción de nuevos productos biotecnológicos para la ampliación de los servicios de salud que se ofrecen a la población, aún cuando los márgenes de utilidades sean exiguos o a costo de producción, reconociendo la valía de las políticas sociales implementadas por Cuba.

De los tres protocolos de conjugación ensayados, los que reportaron un menor costo de producción total fueron el 1 y 2 con 2 308,9 UM y 2 203,9 UM respectivamente, favorable al P-2 (figura 6); para los que se obtuvo igualmente una actividad biológica promedio que permitió una mayor dilución y por tanto, una mayor cantidad de frascos con volumen de 1 mL por protocolo. En el caso del protocolo 3, demostró un costo de producción el cual resulta alrededor de 1,2 veces mayor con respecto a los dos primeros aplicados, agregando además que por tener una menor actividad biológica ha de hacerse menores diluciones del producto, aspecto que redundaría en la producción total a obtener.

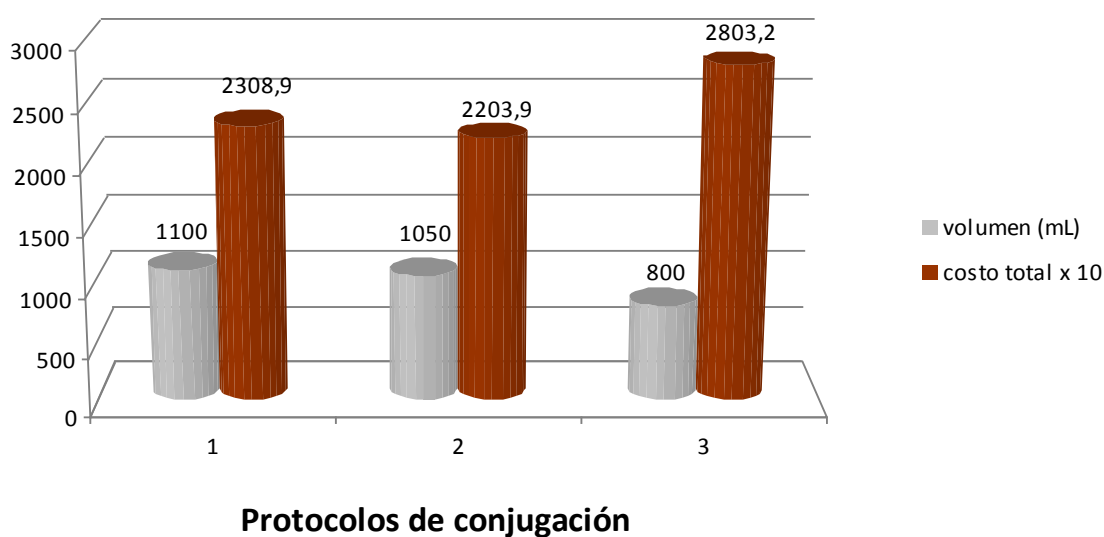


Fig. 6. Volumen obtenido del anti-CD45 conjugado con FITC y su relación con los costos totales, para los diferentes protocolos ensayados.

Mediante los protocolos de conjugación 1 y 2 empleados a la IgG 1 murina se obtiene un producto antiCD45-FITC, con un costo unitario de 0,21 UM para ambos a diferencia del obtenido mediante el protocolo 3 (0,350 UM). Es necesario indicar que 1 frasco de anti-CD45 conjugado con FITC consta de 1 mL de producto, con el que se realizan 100 determinaciones por citometría de flujo, según procedimiento técnico de formulación. Por lo que el mayor volumen del producto se obtiene por medio del protocolo 1, el que permite la obtención de 1 100 mL partiendo de las diluciones definidas por la actividad biológica detectada, resultando en la posibilidad de 110 000 conteos celulares a pacientes. Mientras que por la aplicación del protocolo 2 se obtuvieron 1 050 mL para 105 000 determinaciones (figura 6). Los dos primeros se obtienen al mismo costo unitario a pesar de ser el protocolo 1 el de mayor empleo del FITC, por existir una compensación con la mayor cantidad de determinaciones obtenidas para la Citometría de Flujo, por la actividad biológica del producto.

En la figura 7 se muestra el costo de producción de los protocolos de conjugación aplicados por determinación (paciente), en comparación con el costo de la determinación del producto SIGMATM que se importa para suministro a la red asistencial, el cual tiene un precio de 0,93 USD/mL.

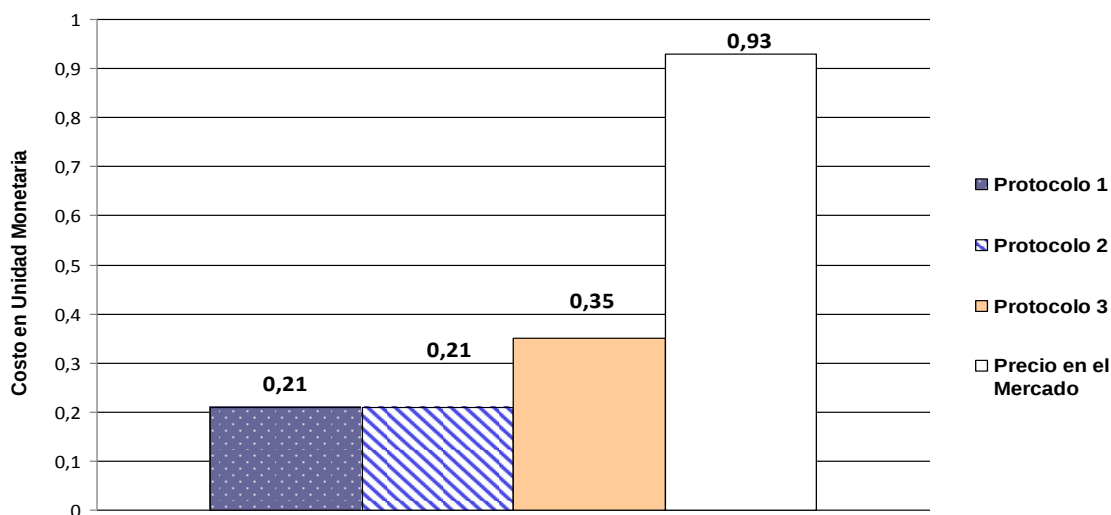


Fig.7. Costo por Determinación del producto anti-CD45 conjugado con FITC con respecto al producto importado de la Firma Comercial DAKO.

En la tabla 2 se muestra, el análisis realizado para determinar la sustitución de importaciones del producto anti-CD45 conjugado con FITC. Se partió del costo de producción de cada determinación obtenida de los protocolos ensayados, en comparación con el precio de la determinación del producto importado, si se cubriera la

demanda ascendente a 6 000 determinaciones. Se determinó que los protocolos 1 y 2 muestran un costo 4,4 veces menor con respecto al reactivo comercial importado; mientras que para el protocolo 3 se determinó un costo 2,6 veces menor con respecto al reactivo de SIGMA. Los tres protocolos son rentables en base al costo de producción por determinación con respecto al producto SIGMA, que es el que actualmente se importa en nuestro país, permitiendo un ahorro de aproximadamente 4 000 USD para la demanda establecida.

TABLA 1. ANÁLISIS DE SUSTITUCIÓN DE IMPORTACIONES POR LOS PROTOCOLOS APLICADOS.
(SE CONSIDERA PARA CONVERSIÓN 1 USD EQUIVALE 1UM)

Sustitución de Importaciones anual (determinaciones)					
Protocolos	Costo	Demanda (dosis)	Costo/demanda	Importación	Ahorro
	UM		UM	USD	UM
1	0,209	6 000	1 254	5 580	4 326,00
2	0,209	6 000	1 254	5 580	4 326,00
3	0,350	6 000	2 100	5 580	3 480,00

El impacto que se produce en obtener un reactivo diagnosticador antiCD45-FITC bajo las condiciones aquí descritas, reviste especial importancia y beneficio para el Sistema Nacional de Salud por lo viable económicamente de su disponibilidad y haciendo notar que la obtención del producto *per se* reporta beneficios, pues no se dispone de un marcador *panleucocitario* de producción nacional.

Conclusiones

Se logró purificar el anti-CD45 a partir de LAM mediante cromatografía de afinidad con un porcentaje de pureza de 99,3 determinada por HPLC. Las tres variantes de conjugación ensayadas mostraron un porcentaje de reconocimiento leucocitario en el rango de 90,7 - 96,8 % en correspondencia con un marcador leucocitario, para ser usado en Citometría de Flujo. Los protocolos de conjugación más económicamente factibles en el ensayo fueron el 1 y el 2, los cuales reportan un costo de producción alrededor de 4 veces menor que el costo de la determinación con productos importados en el mercado internacional; siendo favorecido según la relación de costo total el protocolo 2 > 1 > 3. Por tanto, la obtención del diagnosticador anti-CD45

conjugado con FITC, garantiza la disponibilidad de este reactivo en el Sistema Nacional de Salud y un ahorro por concepto de sustitución de importaciones de 0,72 UM por determinación a realizar a los pacientes.

Referencias bibliográficas

1. JUSTEMENT, L. B. "The role of the protein tyrosine phosphatase CD45 in regulation of B lymphocyte activation". *Int. Rev. Immunol.* 2001, **20** (6), 713-738.
2. HUNTINGTON, N. D.; TARLINTON, D. M "CD45: direct and indirect government of immune regulation". *Immunol Lett.* 2004, **94** (3), 167-74.
3. WATERS, W. R.; HARKINS, K. R.; WANNEMUEHLER. "Five-color flow cytometric analysis of swine lymphocytes for detection of proliferation, apoptosis, viability, and phenotype". *Cytometr.* 2002, **48** (3), 146–152.
4. JOHNSON, I.; SPENCE, M. "The Molecular Probes Handbook. A Guide to Fluorescent Probes and Labeling Technologies". *11th Edition, Life Technologies.* 2010, **76** (11), 1060.
5. HOWARD SHAPIRO, M.; WILEY, J.; HOBOKEN. 1941. Practical Flow Cytometry. *4th Ed. New Jersey*, 2003. ISBN 0-471-41125-6
6. GUTIÉRREZ, E. J.; SAMÓN, T.; MIRANDA, A.; FERNÁNDEZ, G.; HIGGINSON, D.; SIERRA, G.; SCHADE, R. Obtención de un conjugado anti IgG de ratón–FITC mediante la tecnología IgY para uso como anticuerpo secundario en la detección de antígenos de superficie celular". *Rev. CENIC Ciencias Biológicas.* 2007, **38** (1), 85-89.
7. NAKAMURA, A.; TSURUSAWA, M.; KATO, A.; TAGA, T.; HATAE, Y.; MIYAKE, M. "Prognostic impact of CD45 antigen expression in high-risk, childhood B-cell precursor acute lymphoblastic leukaemia". *Leuk Lymphoma* 2001, **42** (3), 393-398.
8. HUSSEIN, A. *et al.* "Valor del fenotipaje mediante citometría de flujo en la confirmación del diagnóstico de leucemia de células plasmáticas". *Rev Latinoamer Patol Clin.* 2012, **59** (3), 134-141.

9. SORIA PEÑALVER, N. Obtención de un reactivo hemoclasificador anti B con el hibridoma C6G4 en biomodelos murinos Ofbalb (F1) y Balb/c. Tesis de Maestría en Biotecnología, Universidad de Oriente, Santiago de Cuba, 2010.
10. FUENTES, D.; GONZALES, R. “Influencia de la edad y el sexo de ratones Balb/c sobre la producción de líquido ascítico rico en anticuerpos monoclonales. *Rev. Salud Animal*. 2001, **23** (1), 62-64.
11. LABEX. Procedimiento Normalizado de Operación. Purificación de anticuerpos monoclonales, O5 PNO.010. Edición 03, 2017
12. JOHN, W.; CHRISTER, J. “Principles, high resolution methods, and applications”. *Electrophoresis*. 2011, **54** (3), 12-16.
13. LAEMMLI, U. K. “Clavage of structural proteins during de assembly of the head of bacteriophage T4”. *Nature*. 1970, **227**, 680-685.
14. Centro de Inmunología Molecular. Procedimiento Normalizado de Operación. “Análisis e identificación mediante electroforesis desnaturizante en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE) de Anticuerpos Monoclonales”, G10-PNO-0015. Edición 01, 2007.
15. Handbooks from GE Healthcare Life Sciences Gel Filtration: Principles and Methods. *Amersham Biosciences*. 2004, 18-1022-18.
16. HARLOW, E.; LANE, D. “Antibodies: A Laboratory Manual. Ed. “Cold Spring”. Harbor Laboratory. 1988, 353-355.
17. CANTOR, A. FITC conjugation of Antibodies. *SIGMA. FD*, Catálogo de Producto, *Life Science Research* 2004-2005, Washington Editions, 1239-1242.
18. BAUMGARTH, N.; ROEDERER, M. “A practical approach to multicolor flow cytometry for immunophenotyping”. *Journal of Immunological Methods*. 2000, **243**, 77-97.
19. JAMES, W. “Conjugation of antibodies with fluorochromes: Modifications to the standard methods”. *Goding Journal of Immunological Methods*. 1976, **13**, 215-226.
20. LABEX. “Anti-CD45 purificado a partir de Líquido Ascítico Murino”. Especificación 5036, Edición 03, 2012. Pág. 1

21. JAGSCHIES, G.; GRONBERG, A.; BJORKMAN, T.; LACKI, K. "Technical and Economical Evaluation of downstream processing options for monoclonal antibody (Mab) Production". *BioPharm International*. 2006, **19**, 23-26.
22. SZABOLCS FEKETE, A. B.; LUC VEUTHEY, J.; GUILLARME, D. "Theory and practice of size exclusion chromatography for analyses of protein aggregates". *Journal of pharmaceutical and biomedical Analysis*, 2014, **101**, 161-173.
23. GALAKTIONOV, V. G. "Evolutionary development of the immunoglobulins super family". *Izv Akad Nauk Ser Biol*. 2004, **2**, 133-45.
24. SOFER G.; CHIRICA, L. "Downstream Processing: Improving Productivity in Downstream Processing", *BioPharm Int*. 2006, **19**, 48-55.
25. HARTMANN, W. K.; SAPTHARISHI, N.; YANG, X. Y.; MITRA, G.; SOMAN, G. "Characterization and analysis of thermal denaturation of antibodies by size exclusion high-performance liquid chromatography with quadruple detection". *Analytical Biochemistry*. 2004, **325** (2), 227-39.
26. GROTEFEND, S. *et al.* "Protein quantitation using various modes of high performance liquid chromatography". *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2012, **7**, 127-138.
27. VON BERGWELT-BAILDON, M. S. *et al.* "Human primary and memory cytotoxic T lymphocyte responses are efficiently induced by means of CD40-activated B cells as antigen-presenting cells potential for clinical application". *Immunobiology blood*. 2002, **9** (99), 3319-3325.