



REDVET. Revista Electrónica de
Veterinaria

E-ISSN: 1695-7504

redvet@veterinaria.org

Veterinaria Organización

España

Miranda, Dany; Veitía, Isi; Carpio, Emilio; Pérez, Joel; Pérez- Bernal, Maylin; Blanco, Reinaldo; Hernández, Carlos; Machín, Yeleiny; Martínez, Duniesky; Benítez, Liudmila; Marrero, Adaleikys; Reyes, Yanisleidy; Cruz, Alexander
Caracterización in vitro e in vivo de tres hibridomas de interés veterinario
REDVET. Revista Electrónica de Veterinaria, vol. 17, núm. 12, diciembre, 2016, pp. 1-11
Veterinaria Organización
Málaga, España

Disponible en: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=63649052013>

- Cómo citar el artículo
- Número completo
- Más información del artículo
- Página de la revista en redalyc.org

redalyc.org

Sistema de Información Científica

Red de Revistas Científicas de América Latina, el Caribe, España y Portugal

Proyecto académico sin fines de lucro, desarrollado bajo la iniciativa de acceso abierto

Caracterización *in vitro* e *in vivo* de tres hibridomas de interés veterinario - *In vitro* and *in vivo* characterization of three hybridomas of veterinary interest

Dany Miranda, Isi Veitía, Emilio Carpio, Joel Pérez, Maylin Pérez-Bernal*, Reinaldo Blanco, Carlos Hernández, Yeleiny Machín, Duniesky Martínez, Liudmila Benítez, Adaleikys Marrero, Yanisleidy Reyes, Alexander Cruz.

Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología de Sancti Spiritus, Apartado Postal 83, Sancti Spiritus, Cuba.

*Contacto: maylin.perez@cigb.edu.cu

RESUMEN

Se caracterizaron los hibridomas CBSSHA.2, CBSSBm.1 y CBSSE2.1, que secretan anticuerpos monoclonales contra las proteínas hemaglutinina del virus de la Influenza Aviar, Bm86 de la garrapata *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* y E2 del virus de la Peste Porcina Clásica, respectivamente. Se determinó la clase, subclase y el tipo de cadena ligera de los anticuerpos secretados. Se evaluó *in vitro* la viabilidad, concentración celular, el crecimiento exponencial y tiempo de duplicación. Para el diseño *in vivo* se emplearon tres grupos de ratones Balb/c inoculados con: 1×10^6 , 2×10^6 ó 3×10^6 cél/mL. Se estudió el efecto de la cantidad de células sobre la formación de tumores, la mortalidad y producción de ascitis. A los sobrenadantes de cultivo y las ascitis se les determinó por ELISA la concentración de IgG. Se evaluó la influencia de las cantidades de células inoculadas sobre los volúmenes de ascitis y la concentración de anticuerpos. La viabilidad, concentración celular, el crecimiento exponencial y tiempo de duplicación se correspondieron con lo descrito en la literatura para otros hibridomas. Existió alta correlación entre las concentraciones de IgG en sobrenadantes de cultivo y en las ascitis. Los hibridomas estudiados formaron tumores líquidos en más del 90% de los ratones inoculados, con una mortalidad inferior al 10%. Los valores promedios de concentración de IgG en ascitis del hibridoma CBSSE2.1 difirió significativamente según el inóculo empleado. La capacidad de secreción *in vitro* e *in vivo* del hibridoma CBSSBm.1 fue inferior a los demás hibridomas.

Palabras clave: anticuerpos monoclonales| ascitis| concentración de IgG

ABSTRACT

It were characterized the hybridomas CBSSHA.2, CBSSBm.1 and CBSSE2.1, which secrete monoclonal antibodies against the proteins hemagglutinin from Avian Influenza virus, Bm86 from *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* and E2 from Classical Swine Fever virus, respectively. The class, subclass and light chain type of the antibodies were determined. The viability, cell concentration and exponential growth were evaluated *in vitro*. *In vivo* design required three groups of Balb/c mice, inoculated with 1×10^6 , 2×10^6 ó 3×10^6 cél/mL, for study the effect of cell concentration on tumor formation, mortality and ascite production. The IgG concentrations in culture supernatants and ascites were determined by ELISA. It was evaluated the effect of inoculated cells on ascite volumes and antibody concentration. The results obtained in parameters of viability, cell concentration, exponential growth and duplication time corresponded with literature descriptions for other hybridomas. The IgG concentrations in culture supernatants and ascites were highly correlated. All hybridomas formed liquid tumors in more than 90% of inoculated mice, and the mortality was less than 10%. IgG concentration in ascite from CBSSE2.1 hybridoma depended on inoculum. *In vitro* and *in vivo* secretion of CBSSBm.1 was lesser in respect to CBSSHA.2 and CBSSE2.1.

Keywords: ascite| IgG concentration| monoclonal antibodies

INTRODUCCIÓN

Las inmunoglobulinas o anticuerpos son proteínas que se unen a moléculas llamadas antígenos, especialmente a ciertas regiones denominadas determinantes antigénicos o epitopos. Las reacciones entre antígenos y anticuerpos son la base de los inmunoensayos y estos constituyen las técnicas de laboratorio más utilizadas para el diagnóstico veterinario y humano (Gómez *et al.* 2008).

La mayor parte de los anticuerpos que se utilizan en estas técnicas son monoclonales (Hendriksen & de Leeuw, 1998). Estos abren enormes perspectivas a la investigación básica y aplicada, agregando especificidad, sensibilidad y reproducibilidad, características que marcan la diferencia con los anticuerpos policlonales; de ahí que una de sus primeras aplicaciones prácticas haya sido en los ensayos de diagnóstico clínico de enfermedades infecciosas, parasitarias y tumores malignos en humanos y animales (Gómez *et al.* 2008).

En 1975, George Köhler y Cesar Milstein publicaron un nuevo método de producción de anticuerpos monoclonales (AcMs), moléculas que pueden ser producidas de forma continua por hibridomas. Un hibridoma está formado biológicamente por la unión entre una célula mortal productora de anticuerpos y una inmortal llamada mieloma. Esta tecnología representó un significativo avance, pues permitió obtener cantidades ilimitadas de AcMs, y conllevó una

revolución en todos los campos de la biomedicina y la biotecnología (Valdés, 2007).

La producción de anticuerpos monoclonales consta esencialmente de dos etapas: a) la inducción de la producción de anticuerpos *in vivo* por las células linfoides y la selección *in vitro* del hibridoma productor de anticuerpos; b) propagación *in vitro* o *in vivo* de los clones de hibridomas seleccionados (Marx *et al.* 1997).

Una caracterización inmunoquímica elemental de los hibridomas implica la determinación de clase, subclase, afinidad y la especificidad, que incluye la evaluación de reactividad cruzada con antígenos de estructura similar. Otros aspectos que complementan la caracterización son su tiempo de duplicación, la dosis tumoral 100%, la concentración de AcM producida en cultivo y en la ascitis y la estabilidad del hibridoma en el tiempo (Gavilondo, 1995).

Como parte de las buenas prácticas de fabricación de reactivos biológicos, cada línea celular (hibridoma) productora de un anticuerpo de interés comercial en el Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología (CIGB) debe tener un banco de células caracterizado, que garantice la reproducibilidad y la calidad de los anticuerpos y diagnosticadores que son producidos en el centro.

El CIGB de Sancti Spiritus tiene en su banco de células a los hibridomas CBSSHA.2, CBSSBm.1 y CBSSE2.1, que secretan anticuerpos monoclonales contra las proteínas Hemaglutinina del virus de la Influenza Aviar, Bm86 de la garrapata *Rhipicephalus microplus* y E2 del virus de la Peste Porcina Clásica, respectivamente.

El objetivo del presente trabajo fue caracterizar estos tres hibridomas de interés veterinario. Para ello se determinó la clase y subclase del anticuerpo secretado por cada hibridoma, se caracterizó el comportamiento de los hibridomas en cultivo *in vitro* según su viabilidad, concentración celular, crecimiento exponencial y tiempo de duplicación. Se estudió el comportamiento *in vivo* de estos hibridomas en ratones BALB/c, en cuanto a la formación de tumores, volumen de ascitis por animal, concentración de IgG en la ascitis y mortalidad. Además, se evaluó la relación entre las concentraciones de IgG en el sobrenadante de cultivo y en la ascitis, así como la influencia de la cantidad de células del inóculo en la concentración de IgG y en los volúmenes de ascitis.

MATERIALES Y MÉTODOS

Los hibridomas evaluados fueron: CBSSE2.1, CBSSBm.1 y CBSSHA.2, obtenidos en el CIGB Sancti Spiritus a partir de diferentes fusiones de células mielíticas X63 Ag8 653 y linfocitos B de ratones BALB/c.

Cada hibridoma se cultivó en frascos CellStar con una concentración celular inicial de $0,3 \times 10^6$ cél/mL. El medio de cultivo utilizado fue RPMI-1640 suplementado con 10% de suero fetal bovino (v/v), 2 mM L-glutamina, 1 mM

piruvato de sodio y 40 µg/mL de gentamicina-80. Las células se mantuvieron a 37°C en atmósfera húmeda con 5% de CO₂. El medio de cultivo se renovó cada 48 h.

La viabilidad y concentración celular se determinaron por conteo en cámara de Neubauer, empleando el método de exclusión con el colorante tripán azul. La velocidad del crecimiento exponencial (CE) y el tiempo de duplicación (TD) se calcularon según las siguientes ecuaciones:

$$CE = (\ln X_2 - \ln X_1) / (t_2 - t_1)$$

Donde:

t₁ y t₂: tiempos en que se tomaron las muestras.

X₁ y X₂: número de células vivas a los tiempos t₁ y t₂ respectivamente.

$$TD = \ln 2 / CE$$

La determinación de clase, subclase y cadena ligera de los anticuerpos se realizó mediante el kit comercial IsoQuick™ Strips for Mouse Monoclonal Isotyping (Sigma). Las tiras del kit se colocaron en 300 µL del sobrenadante de cultivo de cada hibridoma y después de 10 minutos se observaron las señales correspondientes.

Para la producción de ascitis se utilizaron 135 ratones BALB/c de 22-24 gramos de peso y 20-22 semanas de edad, obtenidos y certificados en el Centro Nacional para la Producción de Animales de Laboratorio (La Habana, Cuba). Los animales se mantuvieron en áreas controladas a 22°C, 50% de humedad, bajos niveles de amoníaco, con 12 h de iluminación por 12 h de oscuridad y la alimentación *ad libitum*. Se irritaron con aceite mineral parafínico, 0,5 mL/animal, por vía intraperitoneal 7 días antes de la inoculación de las células. El estudio de preñamiento se realizó en tres grupos con diferentes cantidades celulares inoculadas por hibridoma (1x10⁶ cél/mL, 2x10⁶ cél/mL y 3x10⁶ cél/mL) con una distribución de 15 ratones por grupos. Estos ratones fueron inspeccionados clínicamente todos los días desde la irritación peritoneal hasta la extracción del líquido ascítico. La ascitis se colectó por punción abdominal, en tubos de 50 mL previamente preparados con 150 µL de ácido etilendiaminotetracético 0,21 M, se centrifugó a 1 006 g durante 30 minutos y se filtró por membranas de 0,22 µm.

La cuantificación de IgG en los sobrenadantes del cultivo y las ascitis se hizo en placas de ELISA (Nunc Maxisorp) recubiertas con un anticuerpo policlonal (AcPc) anti-IgG de ratón, generado en carnero, a 10 µg/mL en tampón de recubrimiento carbonato-bicarbonato, pH 9,6 y se incubaron 2 h a 37°C. Posteriormente las placas se lavaron con 0,05% Tween-20. Luego se les adicionó cada muestra por duplicado, diluidas en PBS/leche 1%: 1/50 para los sobrenadantes de cultivo y 1/50 000 para las ascitis. Para la curva de

cuantificación se utilizó el AcM CBRV.1, en un rango de dilución desde 150-2,34 ng/mL, aprobado por el laboratorio de Control de la Calidad del CIGB de Sancti Spíritus. Después de una hora de incubación a 37°C las placas se lavaron cuatro veces con la solución 0,05% Tween-20 y se les adicionó el mismo AcPc de recubrimiento, conjugado con peroxidasa de rábano picante, diluido 1/100 000 en PBS/leche 1% y se incubó durante una hora a 37°C. Las placas finalmente se lavaron en iguales condiciones y la reacción se reveló usando una solución sustrato cromógeno compuesta por dihidrocloruro de o-fenilendiamina 5,5 mg/mL disuelto en tampón citrato-fosfato 0,1 M, pH 5,0 y peróxido de hidrógeno 0,015%. La reacción se detuvo a los 15 min con la adición de 100 µL de ácido sulfúrico 2 M e inmediatamente se leyó la absorbancia a 492 nm en un lector de placas (Multiskan).

Análisis estadístico

Los datos de concentración de IgG en los sobrenadantes de cultivo y en las ascitis fueron procesados mediante un análisis de varianza bifactorial completamente aleatorizado, donde se utilizaron como factores el inóculo y el hibridoma. Se efectuó la comparación múltiple de medias mediante la prueba de Tukey, con un nivel de significación $\alpha=0,05$.

La evaluación de la interacción entre factores se realizó mediante una comparación de medias por pares utilizando la prueba de Bonferroni, con un nivel de significación $\alpha=0,05$.

Se realizó un test de correlación entre las concentraciones de IgG de los sobrenadantes de cultivo y las concentraciones de IgG en las ascitis. Todo el procesamiento estadístico se realizó con el programa SPSS versión 15,0.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El conocimiento de la clase y subclase de las inmunoglobulinas es una herramienta importante para su posterior purificación. Se comprobó que los hibridomas evaluados secretaron IgG de diferentes subclases y con cadena ligera tipo Kappa (Tabla 1). En 1995, Gavilondo planteó que cerca del 95% de las inmunoglobulinas de ratón presentan este tipo de cadena ligera.

Tabla 1: Resultados de la determinación de clase, subclase y tipo de cadena de las inmunoglobulinas secretadas por los hibridomas estudiados.

Hibridoma	Clase y subclase				Cadena ligera	
	IgG1	IgG2a	IgG2b	IgG3	Kappa	Lambda
CBSSBm.1	+	-	-	-	+	-
CBSSE2.1	-	+	-	-	+	-
CBSSHA.2	-	-	+	-	+	-

En la Tabla 2 se muestran las variables evaluadas entre las 96 y 144 h del cultivo *in vitro* de cada hibridoma. En este período se alcanzó la concentración celular máxima, resultados similares fueron observados por Segreo *et al.* (2015). La viabilidad celular se comportó por encima del 95% hasta las 144 h, a partir de la cual comenzó a disminuir, coincidiendo con los resultados de Mendoza *et al.* (2009) y Vitón *et al.* (2015).

Tabla 2: Comportamiento de los hibridomas durante su cultivo *in vitro*.

Hibridomas	Parámetros del Cultivo Celular			
	Viabilidad (%)	Concentración celular ($\times 10^6$ cél/mL)	Crecimiento exponencial (h^{-1})	Tiempo de duplicación (h)
CBSSBm.1	97,59 \pm 0,08	1,39 \pm 0,00	0,0325 \pm 0,0006	21,31 \pm 0,35
CBSSE2.1	96,72 \pm 0,39	1,22 \pm 0,01	0,0287 \pm 0,0002	24,17 \pm 0,17
CBSSHA.2	96,05 \pm 0,57	1,16 \pm 0,01	0,0268 \pm 0,0018	25,95 \pm 1,80

Los valores de concentración celular estuvieron en el rango entre 1,16 y 1,39 $\times 10^6$ cél/mL, similares a los observados por Darfler (1990), Shinmoto y Dosako (1993) y Aragón *et al.* (2013). Sin embargo Vicente y Dustet (2015) y Segreo *et al.* (2015) publicaron valores de concentración celular superiores a los 3×10^6 cél/mL para un cultivo estacionario.

El crecimiento exponencial mostró valores en el rango de 0,0268 h^{-1} hasta 0,0325 h^{-1} , similares a los reportados por Mendoza *et al.* (2009); Vicente y Dustet (2015); Vitón *et al.* (2015) y Segreo *et al.* (2015).

El tiempo de duplicación de los hibridomas se mantuvo en el intervalo entre 21,31 y 25,95 horas; entre estos valores se comportaron los analizados por Mendoza *et al.* (2009). Aunque otros como Aragón *et al.* (2013) y Vicente y Dustet (2015) observaron tiempos de duplicación por encima de las 30 horas.

En este estudio más del 90% de los ratones desarrollaron tumores líquidos (Tabla 3), este resultado se relaciona con lo planteado por Soria *et al.* (2010) quienes consideraron adecuado un prendimiento por encima del 90% en los procesos de obtención de líquido ascítico rico en anticuerpos monoclonales.

La mortalidad fue inferior al 10% en todos los hibridomas. Jackson *et al.* (1999) observaron animales muertos en el rango de 0-25% y reportaron diferencias significativas en la mortalidad entre varias líneas celulares.

Tabla 3: Comportamiento *in vivo* de los hibridomas.

Hibridomas	Parámetros del comportamiento en ratones			
	Cantidad total de ratones	Ratones con tumores (%)	Ratones sin tumores (%)	Mortalidad (%)
CBSSBm.1	45	91,1	0,0	8,9
CBSSE2.1	45	95,6	0,0	4,4
CBSSHA.2	45	97,8	0,0	2,2

En ningún caso se observó la presencia de tumores sólidos. Un resultado diferente reportaron Fuentes *et al.* (2003) con otros hibridomas, donde observaron tumoraciones sólidas con dosis similares a las utilizadas en este trabajo. Gavilondo (1995) ha descrito que, aunque los tumores sólidos pueden ser formados por la inyección de sustancias irritantes necesarias para estimular el sistema retículo endotelial del peritoneo en el ratón, la frecuencia de aparición de estos depende también del hibridoma empleado.

Los valores de concentración de IgG del hibridoma CBSSBm.1 en sobrenadante de cultivo y en ascitis fueron los más bajos obtenidos en el estudio (Figura 1). Teniendo en cuenta este resultado se realizó un test de correlación entre las medias de las concentraciones de IgG de los sobrenadantes de cultivo y de las ascitis. El coeficiente de correlación calculado para estos datos fue altamente significativo ($r=0,990$; $p=0,000$), lo cual quiere decir que los niveles de concentración de IgG que se obtengan en el sobrenadante de cultivo serán proporcionales a los de las ascitis. Al respecto, Gavilondo (1995) planteó que bajas concentraciones de IgG en los sobrenadantes de cultivo se correlacionan con bajas cantidades de IgG en el líquido ascítico.

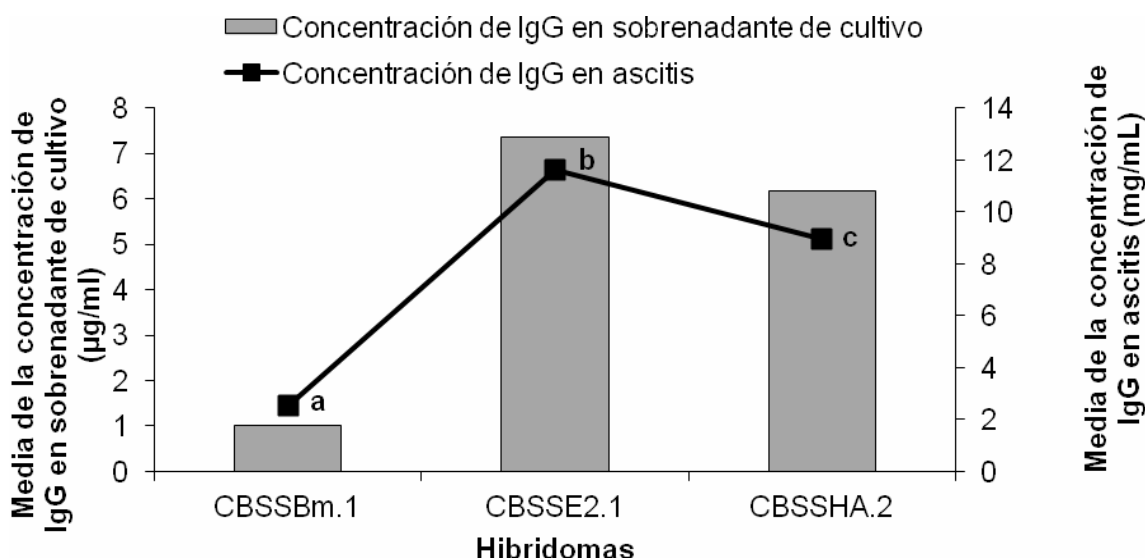


Figura 1: Concentración de IgG determinadas por ELISA en los sobrenadantes de cultivo y las ascitis de los diferentes hibridomas trabajados.

Letras desiguales indican diferencias significativas entre las medias marginales de concentración de IgG en ascitis de los diferentes hibridomas (Prueba de Tukey, $p\leq 0,05$).

El análisis de varianza bifactorial mostró diferencias significativas ($p\leq 0,05$) entre los hibridomas en los valores promedios de concentración de IgG en ascitis (Figura 1). Jackson *et al.* (1999) también publicaron diferentes valores de concentración de anticuerpos entre las ascitis de varios hibridomas estudiados.

Existieron diferencias significativas entre los valores promedios de concentración de IgG en ascitis del hibridoma CBSSE2.1 en dependencia del inóculo empleado (Tabla 4). Los valores de concentración de IgG en la ascitis

del hibridoma CBSSBm.1 fueron 3,6 y 4,6 veces menores que los obtenidos en las ascitis de CBSSHA.2 y CBSSE2.1, respectivamente. Vicente y Dustet (2015) refirieron que la disminución de la producción de ascitis por clones inestables se debe a la aparición de una población con un nivel de secreción muy bajo que aumenta su proporción en el cultivo a lo largo del tiempo.

Tabla 4: Concentración de IgG determinadas por ELISA en las ascitis obtenidas de los hibridomas estudiados, según la cantidad de células inoculadas.

Hibridomas	Media de la concentración de IgG en ascitis (mg/mL)		
	Cantidad de células/inóculo		
	1x10 ⁶	2x10 ⁶	3x10 ⁶
CBSSBm.1	2,11±0,1597 ^a	2,84±0,5323 ^a	2,66±0,1203 ^a
CBSSE2.1	11,34±1,4925 ^a	12,58±0,9606 ^b	10,90±0,5986 ^a
CBSSHA.2	9,31±0,5290 ^a	9,39±0,3663 ^a	8,22±0,4303 ^a

Letras desiguales indican diferencias significativas entre la concentración de IgG en ascitis por cada inóculo empleado en los diferentes hibridomas (Test de Bonferroni, p≤0,05).

Los valores de producción de ascitis obtenidos por cada ratón están recogidos en la Tabla 5. Las cantidades de células inoculadas están comprendidas en el rango entre 6x10⁵ y 5x10⁶ propuesto por Brodeur *et al.* (1984). También Hendriksen y de Leeuw (1998) recomendaron la inoculación en dosis de 3x10⁶ células para la producción de AcMs por el método de ascitis.

Tabla 5: Resultados obtenidos de la producción de líquido ascítico por cada ratón inoculado.

Hibridomas	Parámetros de producción de ascitis			
	Cantidad de células/inóculo	Volumen de ascitis/ratón (mL)	Concentración de IgG en ascitis (mg/mL)	Cantidad IgG por ratón (mg)
CBSSBm.1	1x10 ⁶	4,6	2,1	9,8
	2x10 ⁶	4,0	2,8	11,3
	3x10 ⁶	4,5	2,7	12,1
CBSSE2.1	1x10 ⁶	2,0	11,3	23,2
	2x10 ⁶	1,8	12,6	22,6
	3x10 ⁶	2,0	10,9	21,4
CBSSHA.2	1x10 ⁶	3,0	9,3	27,6
	2x10 ⁶	2,7	9,4	25,0
	3x10 ⁶	1,3	8,2	11,0

En los hibridomas CBSSE2.1 y CBSSHA.2 se comprobó que cuando aumentaron las cantidades de células inoculadas disminuyó la cantidad de IgG por cada ratón. Un comportamiento distinto se evidenció en el hibridoma CBSSBm.1 coincidiendo con De

Deken *et al.* (1994) cuando observaron que altos números de células inoculadas significaron altos títulos de anticuerpos en la ascitis.

Hendriksen (1998) planteó que comúnmente el rango de producción de ascitis se encuentra entre 0 a 10 mL/ratón, con un promedio de 2 a 4 mL/ratón y una concentración de 1 a 28 mg/mL. En este trabajo los volúmenes de ascitis/ratón y las cantidades de IgG/ratón que se obtuvieron se encuentran en el rango reportado por este autor.

El hibridoma CBSSBm.1 produjo más volumen de ascitis y menos cantidad de anticuerpos que el resto de los estudiados (Figura 2), lo que puede indicar que la obtención de mayores volúmenes de líquido ascítico no lleva implícito un aumento de la cantidad de anticuerpos.

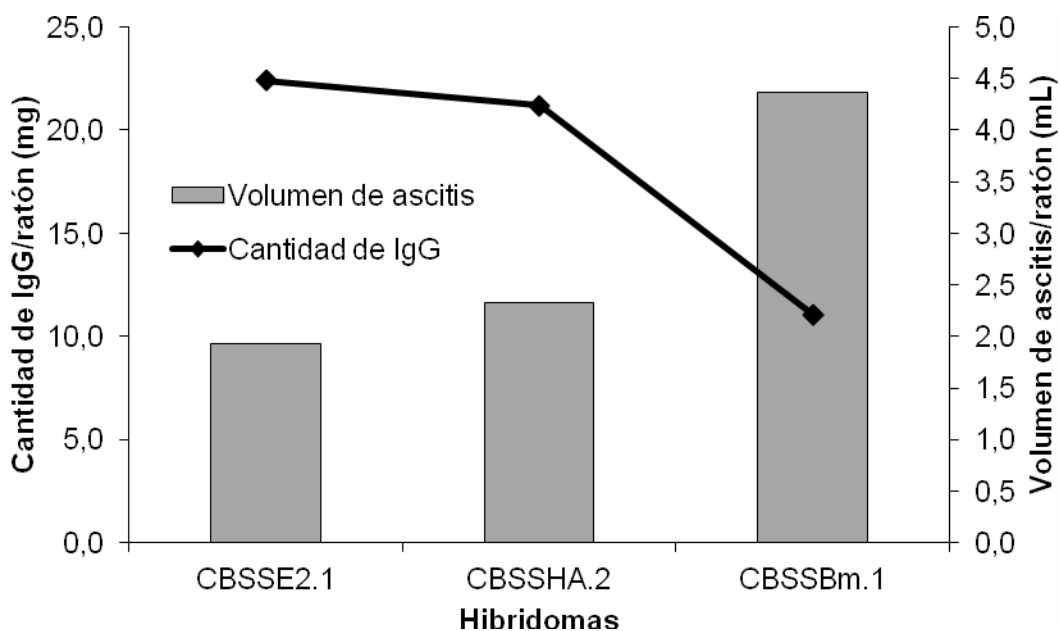


Figura 2: Relación entre las cantidades de IgG y los volúmenes de ascitis por ratón.

Se muestran los valores promedios obtenidos con cada hibridoma.

En el 2001 Barnes *et al.* afirmaron que la pérdida de la producción de anticuerpos específicos en hibridomas se atribuye a la aparición de poblaciones no productoras que tienen ventaja en el crecimiento sobre el resto de la población. Dorai *et al.* (2011) plantearon que la aparición de poblaciones no productoras se atribuye a la pérdida de cromosomas, mutaciones o por el reordenamiento de genes asociados con la síntesis y regulación de la proteína de interés.

CONCLUSIONES

1. El hibridoma CBSSE2.1 secreta anticuerpos IgG2a; el CBSSHA.2, anticuerpos IgG2b y el CBSSBm.1, anticuerpos IgG1.

2. La viabilidad, concentración celular, el crecimiento exponencial y tiempo de duplicación se corresponden con lo descrito en la literatura para otros hibridomas.
3. Los hibridomas estudiados forman tumores líquidos en más del 90% de los ratones inoculados, con una mortalidad inferior al 10%.
4. Existe una alta correlación entre las concentraciones de IgG de los sobrenadantes de cultivo y las concentraciones de IgG en las ascitis.
5. Los valores promedios de concentración de IgG en ascitis del hibridoma CBSSE2.1 difieren significativamente, en dependencia del inóculo empleado.
6. Con los hibridomas CBSSHA.2 y CBSSE2.1 se obtienen mejores rendimientos productivos con menos células inoculadas.

REFERENCIAS

- Aragón H; González M; Valdés R; Álvarez T; Brown E; Rodríguez Y; González T; Somoza R; Wood M. Replacement of serum supplemented medium for CB.Hep-1 hybridoma cell freezing and monoclonal antibody production. *Biología Aplicada (Cuba)*. 2013; 30: 57-62.
- Barnes L; Bentley C; Dickson A. Characterization of the stability of recombinant protein production in the GS-NS0 expression system. *Biotechnol. Bioeng.* 2001; 73 (4): 261-270.
- Brodeur BR; Tsang P; Larose Y. Parameters affecting ascites tumour formation in mice and monoclonal antibody production. *J. Immunol. Methods*. 1984; 71: 265.
- Darfler FJ. A protein-free medium for the growth of hybridomas and other cells of the immune system. *In Vitro Cell. Dev. Biol.* 1990; 26 (8): 769-778.
- De Deken R; Brandt J; Ceulemans F; Geerts S; Beudeker R. Influence of priming and inoculation dose on the production of monoclonal antibodies in two age groups of BALB/c mice. *Hybridoma*. 1994; 13 (1): 53-57.
- Dorai H; Corisdeo S; Ellis D; Kinney C; Chomo M; Hawley-Nelson P; Moore G; Betenbaugh MJ; Ganguly S. Early prediction of instability of Chinese hamster ovary cell lines expression recombinant antibodies and antibody-fusion proteins. *Biotechnol. Bioeng.* 2011; 109: 1016-1030.
- Fuentes D; González R; González B; Negrín N. Estudio de los tumores sólidos desarrollados por los ratones durante la producción de Anticuerpos Monoclonales. *VacciMonitor*. 2003; 12 (3): 11-14.
- Gavilondo JV. Anticuerpos monoclonales. La Habana. Ed. Elfos Scientiae. 1995. 11-33.
- Gómez FRA; Tamez GRS; Tamez GP; Rodríguez PC. Impacto de la biotecnología en la inmunología. *Medicina Universitaria (México)*. 2008; 10 (39): 92-101.
- Hendriksen CF; de Leeuw WA. *In vivo* and *in vitro* production of monoclonal antibodies: current possibilities and future perspectives. *Res. Immunol.* 1998; 149: 611-620.

Hendriksen CFM. A call for a European prohibition of monoclonal antibody (mAb) production by the ascites procedure in laboratory animals. ATLAS. 1998; 26: 523-540.

Jackson LR; Trudel LJ; Fox JG; Lipman N. Monoclonal antibody production in murine ascites. II. Production characteristics. Lab. Anim. Sci. 1999; 49: 81-86.

Köhler G; Milstein C. Continuous culture of fused cells secreting antibodies of predefined specificity. Nature. 1975; 256: 495-497.

Marx U; Emblenton MJ; Fischer R; Gruber FP; Hansson U; Heuer J; de Leeuw WA; Logtenber T; Merz W; Portelle DW; Romette JL; Straughan W. Monoclonal Antibody Production. Report and recommendation of the ECVAM. Workshop 23, ATLAS. 1997; 25: 121-137.

Mendoza O; Valdés R; González M; Alemán R; Álvarez T; Padilla S; Tamayo A; Reyes B; Geada D; Fernández EG; Fuentes D; Hernández O; Zuasnabar L. Influence of the number of animal on the production of monoclonal antibody CB. Hep-1 by the Ascites method. Biotecnología Aplicada (Cuba). 2009. 26: 133-137.

Segreo A; Chico E; Rodríguez T; Concepción P; Frómata Y; Vicente Y; Labrada G. Estudio de la estabilidad productiva de los bancos celulares de un transfectoma productor de un anticuerpo monoclonal terapéutico. Bioprocesos (Cuba). 2015; 1 (2): 1-9.

Shinmoto H; Dosako S. Adaptation of mouse-human hibridomas to a protein free medium. Biotechnol. Lett. 1993; 15 (4): 327-330.

Soria NE; Morris HJ; Rivera S; Gutiérrez E. Obtención y evaluación del líquido ascítico murino hemoclasificador anti-B en las líneas de ratones Ofbalb (F1) y BALB/c. Rev. Cub. Inv. Biom. 2010; 29 (4): 454-462.

Valdés R. Implementación de un método de purificación consistente y virológicamente seguro del anticuerpo monoclonal CB. Hep-1 empleado en la purificación del antígeno de superficie del virus de la Hepatitis B. 2007; Tesis presentada en Opción al grado Científico de Doctor en Ciencias Biológicas. Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología. La Habana.

Vicente Y; Dustet JC. Obtención de un clon estable de una línea celular hibridoma para la producción de un anticuerpo anti-idiotípico. Bioprocesos (Cuba). 2015; 1 (2): 1-14.

Vitón PA; Rodríguez T; Tellez G; Casado L; Soler A; Zorrilla H; Hernández AR. Comportamiento en cultivo de los hibridomas productores de anticuerpos monoclonales leucocitarios: Parte I. Estudios cinéticos a pequeña escala del hibridoma L3 productor del AcM α CD45. Bioprocesos (Cuba). 2015; 1 (1): 1-16.

REDVET: 2016, Vol. 17 N° 12

Este artículo Ref. 091611 está disponible en <http://www.veterinaria.org/revistas/redvet/n121216.html>
concretamente en <http://www.veterinaria.org/revistas/redvet/n121216/121606.pdf>

REDVET® Revista Electrónica de Veterinaria está editada por Veterinaria Organización®.

Se autoriza la difusión y reenvío siempre que enlace con [Veterinaria.org](http://www.veterinaria.org)® <http://www.veterinaria.org> y con
REDVET®- <http://www.veterinaria.org/revistas/redvet>