

INSTITUTO DE MEDICINA TROPICAL "PEDRO KOURÍ"

Anticuerpos monoclonales que reconocen al polisacárido capsular de *Cryptococcus neoformans*

Lic. Hermis Rodríguez Sánchez,¹ Dra. Maritza Pupo Antúnez,² Dra. María Teresa Ilnait,³ Lic. Anselmo Otero⁴ y Dr. Gerardo Martínez Machín⁵

RESUMEN

Se estableció como objetivo la obtención de anticuerpos monoclonales (AcM), mediante la tecnología de fusión celular, capaces de reconocer a la fracción glucuronoxilomanano (GXM), serotipo A. *Cryptococcus neoformans* es un hongo levaduriforme rodeado por una cápsula polisacáridica y agente de micosis profundas en el hombre, que afecta particularmente a los pacientes con el síndrome de inmunodeficiencia adquirida. Fueron inmunizados 3 grupos de ratones Balb/c con GXM acoplado a eritrocitos de carnero con una dosis de 10 µg de GXM vía subcutánea, 50 µg de GXM vía subcutánea y 50 µg de GXM vía intraperitoneal. Se obtuvieron 2 hibridomas secretores de AcM murinos contra el polisacárido capsular de *Cryptococcus neoformans*, de la clase IgG₁, cadena ligera k, los sobrenadantes de cultivo fueron evaluados por ELISA utilizando el polisacárido capsular sin conjugar. Estos anticuerpos serán utilizados en estudios de protección y fagocitosis *in vitro*.

Palabras clave: Anticuerpos monoclonales, *Cryptococcus neoformans*, polisacárido capsular.

Los anticuerpos monoclonales (AcM) específicos contra el polisacárido capsular de *Cryptococcus neoformans* se han utilizado en diferentes técnicas diagnósticas con el objetivo de detectar antígeno, además en el serotipaje de cepas y en la captura e inmovilización de antígeno polisacárido en sistemas inmunoenzimáticos. Por otra parte, se ha reportado que la habilidad protectora en ratones con criptococosis experimental presenta diferentes niveles de protección, en dependencia del modelo experimental, del isotipo y de la especificidad del anticuerpo.¹

En el presente trabajo se reportó la obtención de AcM que reconocen al glucuronoxilomanano (GXM) de *C. neoformans* y su caracterización parcial. Para su generación se utilizó la cepa autóctona de *C. neoformans* var. *neoformans*,

serotipo A, perteneciente al laboratorio de Micología, Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kourí" (IPK). El polisacárido capsular fue aislado y purificado por el método de Cherniak.² La determinación de carbohidratos solubles totales se realizó por el método del fenol sulfúrico de Dubois³ y para la determinación del ácido D-glucurónico, se aplicó el *test* cualitativo de Dische.⁴ Una vez obtenido el GXM, fue acoplado a eritrocitos de carnero para ser utilizado como inmunógeno. Para el acople, se aplicó el método descrito por Kozel y Cazin,⁵ con una ligera modificación en la extensión del tiempo de incubación hasta 3 h. Se utilizaron 3 grupos de ratones hembras Balb/c, entre 8-10 semanas, con un peso de 20-26 g, los que fueron inmunizados con 0,1 mL del GXM purificado y acoplado a eritrocitos de carnero 0,5 %⁶ y emulsificado con adyuvante incompleto de Freund.

¹ Máster en Bacteriología. Licenciada en Bioquímica. Aspirante a Investigadora. Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kourí" (IPK).

² Doctora en Ciencias de la Salud. Licenciada en Microbiología. Investigadora Titular. Departamento de Virología. IPK.

³ Doctora en Ciencias. IPK.

⁴ Doctor en Ciencias. Licenciado en Biología. Universidad de La Habana.

⁵ Especialista de I Grado en Microbiología. Investigador Agregado. IPK.

La inoculación se realizó por vía subcutánea (sc) e intraperitoneal (ip), con una dosis de 10 mg de GXM/ratón (sc), 50 mg de GXM/ratón (sc) y 50 mg de GXM/ratón (ip), respectivamente, durante 6 semanas hasta obtener títulos de anticuerpos superiores a 1/10 000 mediante un ensayo tipo ELISA de doble anticuerpo o “sandwich”; 3 d antes de la fusión celular, se le realizó al ratón una inoculación final con 50 mg de GXM/ratón vía intravenosa (iv) (esquema 10 mg de GXM/ratón, sc).⁷ El suero de los ratones inmunizados, según los diferentes esquemas, fue evaluado mediante ELISA tipo “sandwich” (Illnait MT. Detección y cuantificación de antígeno de *Cryptococcus neoformans* mediante ELISA. Trabajo para optar por el grado de Maestro en Bacteriología - Micología. IPK, 1996. Ciudad de La Habana).

Las células provenientes del bazo de los ratones inmunizados fueron obtenidas 3 d después de la inoculación final y fusionadas con la línea celular de plasmacitoma murino P3/X63.Ag8.653 (ATCC, 1992) en una relación 10:1 con polietilenglicol 1500 Sigma (St Louis, MO), utilizando el procedimiento empleado para la obtención de hibridomas descrito por Fazekas de St Groth.⁸

Los hibridomas productores de anticuerpos fueron seleccionados mediante un ELISA directo tipo “sandwich”, para ser posteriormente clonados 2 veces por dilución limitante.⁹ La obtención de AcM *in vivo* se realizó por inoculación ip de aproximadamente 2×10^6 células del hibridoma en ratones Balb/c.

El isotipo de las inmunoglobulinas fue determinado mediante un ELISA directo empleando antisuero de carnero específico (anti-IgM, anti-IgG₁, IgG_{2a}, IgG_{2b}, e IgG₃) de acuerdo con las instrucciones del productor (estuche de reactivos Sigma Inmuno Chemicals ISO-1, St. Louis, MO).

Para la determinación del tipo de cadena ligera se empleó también un ELISA, en el que las placas fueron recubiertas con anti IgG de ratón en carnero a 10 mg/mL en tampón de recubrimiento durante toda la noche a 4 °C. El bloqueo se realizó con albúmina bovina sérica 3 % en solución salina fosfato (PBS). Las muestras a evaluar fueron los sobrenadantes puros de los hibridomas estudiados. Se utilizó IgG anti ratón de cadena ligera k y l

conjugada con peroxidasa, a una dilución de trabajo 1/2000 con suero fetal bovino 1 %, en PBS-Tween 20, 1 h a 37 °C y como sustrato una mezcla de ortofenilendiamina (OPD) y H₂O₂. Todos los lavados se realizaron con PBS-Tween 20.¹⁰

En la evaluación de la respuesta inmune de los ratones por ELISA, se obtuvo un mayor título de anticuerpos en el grupo inmunizado con 10 mg de GXM/ratón (sc), el cual fue de hasta una dilución 1/20 000, valor adecuado para seleccionar el animal a ser utilizado en la fusión celular. No obstante, el número de ratones que respondieron al inmunógeno fue bajo, lo que coincide con lo reportado antes por otro estudio en el que de 60 ratones infectados solo 4 presentaron títulos de anticuerpos antipolisacárido capsular significativos superiores a 1/10 000.¹¹

En el grupo de ratones inmunizados con 50 mg de GXM/ratón, vía subcutánea; el mayor título de anticuerpos fue aproximadamente de 1/5 000, no ocurriendo así con los ratones inmunizados con 50 mg de GXM/ratón, vía intraperitoneal, donde los títulos obtenidos fueron inferiores a 1/5 000. Los bajos títulos obtenidos para la mayoría de los ratones pueden ser debido a la pobre inmunogenicidad que presenta el GXM en humanos y animales de experimentación, razón por la cual es utilizado conjugado a otras proteínas.¹²

Se obtuvieron 13 hibridomas productores de AcM contra el GXM. Los 2 AcM seleccionados, mantuvieron altos niveles de producción al cabo de varias generaciones y estos AcM producidos fueron clasificados como IgG₁(k). Los isotipos de AcM con una capacidad protectora mayor son los IgG_{2a} e IgG₁, porque se ha demostrado que la administración pasiva de estos puede modificar el curso de la infección por *C. neoformans* y provocar una rápida reducción en los niveles del polisacárido capsular,^{13,14} de ahí que los AcM obtenidos pudieran tener una gran importancia si se considera su utilidad en estudios de protección pasiva.

La especificidad demostrada por estos anticuerpos en el sistema de tamizaje es una característica que podría hacerlos útiles en el diagnóstico, mediante inmunoensayos como anticuerpos de recubrimiento o bien conjugado con enzimas.

Monoclonal antibodies recognizing the capsular polysaccharide of *Cryptococcus neoformans*

SUMMARY

Our objective was to obtain monoclonal antibodies (Mab), by using the cell fusion technology, capable of recognizing the serotype A glucuronoxylomannan (GXM) fraction. *Cryptococcus neoformans* is a yeastlike fungus surrounded by a polysaccharide capsule and an agent of deep mycosis in men that affects particularly AIDS patients. 3 groups of Balb/c mice were immunized with GXM coupled to lamb erythrocytes at a dose of 10 µg of GXM by subcutaneous route, 50 µg of GXM by subcutaneous route and 50 µg of GXM y intraperitoneal route. There were obtained 2 secreting hybridomas of murine MAb against the capsular polysaccharide of *Cryptococcus neoformans*, IgG1, light chain k. The overnads of culture were evaluated by ELISA, using the capsular polysaccharide without conjugating. These antibodies will be used in studies of protection and phagocytosis *in vitro*.

Key words: Monoclonal antibodies, *Cryptococcus neoformans*, capsular polysaccharide

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Casadevall A. Characterization of murine monoclonal antibody to *Cryptococcus neoformans* polysaccharide that is a candidate for human therapeutic studies. *Antimicrob Agents Chemotherapy* 1998;42(6):1437-46.
2. Cherniak R, Morris LC, Anderson BC, Meyer SA. Facilitated isolation, purification and analysis of glucuroxylomannan of *Cryptococcus neoformans*. *Infect Immun* 1991;59(1):59-64.
3. Dubois MK, Gilles A, Hamilton JK, Rebers PA, Smith F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal Chem* 1956;28:350-6.
4. Dische Z. Color reactions of sugar. In: *Methods of Carbohydrate Chemistry*. Wistler and Wolfrom. ed Academic Press 1962;1:490-513.
5. Kozel TR, Cazin J Jr. Immune Response to *Cryptococcus neoformans*. Soluble Polysaccharide I. Serological Assay for Antigen and Antibody. *Infect Immun* 1972;5(1):35-41.
6. Eckert TF, Kozel TR. Production and characterization of Monoclonal Antibodies Specific for *Cryptococcus neoformans* Capsular Polysaccharide. *Infect Immun* 1987;55(8):1895-9.
7. Falconar AKI. Monoclonal antibody production. London UK: School of Hygiene and Tropical Medicine;1989.
8. Fazekas de SG, Sheidegen D. Production of monoclonal antibodies: Strategies and tactics. *J Immunol Methods* 1980;35:1-21.
9. Lefkovits I, Waldmann H. Limiting dilutions analysis of cells in the immune system. Cambridge: University Press; 1979.
10. Voller A, Bidwell DE, Bartlett A. Enzyme immunoassay in diagnostic medicine. Theory and practice. *Bull WHO* 1976;53-55.
11. Casadevall A, Scharff MD. The mouse antibody response to Infection with *Cryptococcus neoformans*: V_h and V_l Usage in Polysaccharide Binding Antibodies. *J Exp Med* 1991;174:151-60.
12. Mukherjee J, Zuckier LS, Scharff MD, Casadevall A. Therapeutic efficacy of monoclonal antibodies to *Cryptococcus neoformans* glucuronoxylomannan alone and in combination with amphotericin B. *Antimicrobial Agents Chemother* 1994;38(3): 580-7.
13. Dromer F, Charreire J, Contrepolis A, Carbon C, Yeni P. Protection of mice against experimental cryptococcosis by anti *Cryptococcus neoformans* monoclonal antibody. *Infect Immun* 1987;55(3):749-52.
14. Shapiro S, Beenhouwer D, Feldmesser M, Tabonda C, Carroll M, Casadevall A. Immunoglobulin G monoclonal antibodies to *Cryptococcus neoformans* protect mice deficient in complement component C3. *Infect Immun* 2002;70(5):2598-604.

Recibido: 10 de enero de 2005. Aprobado: 16 de marzo de 2005.
Lic. *Hermis Rodríguez Sánchez*. Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kourí". Autopista Novia del Mediodía Km 6 1/2, AP 601, Marianao 13, Ciudad de La Habana. Teléf: 202-04-36 al 45. Correo electrónico: hermis@ipk.sld.cu