

INSTITUTO DE MEDICINA TROPICAL "PEDRO KOURÍ"

Anticuerpo monoclonal que mimetiza la estructura de un epítoto inmunoprotector contra *Fasciola hepatica*

Lic. Ricardo Marcet Sánchez,¹ Téc. Mabel Figueredo Pino² y Dr. Jorge Sarracent Pérez³

RESUMEN

Se reportó la producción de 4 anticuerpos monoclonales anti-idiotipos (3G5, 5G1, 3H4 y 1H6) que inhiben la reacción antígeno-anticuerpo monoclonal ES-78, el cual reconoce antígenos de excreción-secreción de *Fasciola hepatica* y se emplea para el diagnóstico en heces de la fasciolosis en el ganado bovino y en humanos. Cuando se utilizó en conejos el 3G5, como inmunógeno, se produjo una respuesta de anticuerpos contra antígeno de excreción-secreción de *Fasciola hepatica* sin un previo contacto con este. El empleo como inmunógeno de este anticuerpo monoclonal anti-idiotipo, que mimetiza un epítoto protector contra la fasciolosis, junto a adyuvantes apropiados puede ser una manera novedosa de disminuir la carga parasitaria en modelos experimentales de fasciolosis.

Palabras clave: *Fasciola hepatica*, anticuerpo monoclonal ES-78, anticuerpos monoclonales anti-idiotipos, vacunas parasitarias.

La infección causada por el tremátodo *Fasciola hepatica* es considerada como una entidad de importancia médico veterinaria por las pérdidas económicas estimadas en tres mil millones de dólares por año.¹ Además, el interés en esta parasitosis es creciente debido al elevado número de casos reportados en humanos en algunos países de zonas tropicales y subtropicales.¹

A pesar de que el uso de la terapia durante más de 2 décadas ha influido en la reducción de los niveles de morbilidad,^{2,3} una vacuna sería una de las opciones más atractivas, a largo plazo, para el control de esta enfermedad.

Se han estudiado diferentes candidatos vacunales de naturaleza proteica que en ensayos preliminares han mostrado resultados promisorios. Sin embargo, hasta el momento no se ha obtenido una vacuna efectiva contra esta parasitosis. En 1990 se reportó la obtención del anticuerpo

monoclonal (AcM) ES-78 dirigido contra antígenos de excreción-secreción (AgES) de parásitos adultos mantenidos *in vitro*.⁴ Este es capaz de conferir altos niveles de protección en ratones BALB/c cuando se administra pasivamente 24 h antes de un reto con metacercarias de *F. hepatica*.⁵ El epítoto reconocido por este monoclonal está presente en moléculas con actividad de cisteíno-proteasa,⁵ las cuales modulan la respuesta inmune hacia un patrón de citosinas Th2.⁶ Este epítoto es conformacional, glicoproteico, contiene al menos un enlace disulfuro y presenta en su estructura b galactosa, probablemente en forma del disacárido galactosa b(1-3)-N-acetilgalactosamina.⁷ Estas características hacen difícil su obtención por los métodos convencionales de ADN recombinante. Se ha reportado el uso de AcMs anti-idiotipos para mimetizar estructuras de carbohidratos y

¹ Licenciado en Bioquímica. Investigador Agregado.

² Técnica A en Laboratorio.

³ Doctor en Ciencias. Investigador Auxiliar.

glicoproteínas.⁸ Un AcM anti-idiotipo que imite la estructura del epítipo reconocido por el AcM ES-78 administrado con un adyuvante adecuado, pudiera ser útil como vacuna experimental para reducir la carga parasitaria en un modelo murino de fasciolosis.

El objetivo de este trabajo consistió en mimetizar el epítipo reconocido por el anticuerpo monoclonal ES-78 utilizando la vía de obtención de anticuerpos monoclonales anti-idiotipos.

MÉTODOS

Animales de experimentación

En los esquemas de inmunización se utilizaron ratones BALB/c hembras, de 20-25 g de peso, y conejos Chinchillas machos, de aproximadamente 2 kg de peso, provenientes del Centro de Producción de Animales de Laboratorio (CENPALAB).

Purificación de anticuerpos monoclonales

Los anticuerpos monoclonales fueron purificados a partir de líquido ascítico mediante cromatografía de afinidad, utilizando como soporte Proteína G Sefarosa, según indicaciones del manual de instrucciones de la firma *Pharmacia Fine Chemicals* (Pharmacia Fine Chemicals. Affinity Chromatography. Principles and methods. Printed in Sweden by Ljungforetagen AB, Orebro, August 1983-2)

Obtención del fragmento $F(ab')_2$ del AcM ES-78

Se realizó la proteólisis del AcM ES-78 (IgG_{2a}) con pepsina bovina (2 g de pepsina x 30 mg de AcM) a 37 °C durante 4 h. Los fragmentos $F(ab')_2$ se purificaron por cromatografía de afinidad, utilizando como matriz Proteína G Sefarosa. El grado de pureza se determinó por electroforesis en geles de poliacrilamida.

Conjugación del fragmento $F(ab')_2$ a hemocianina

A las moléculas $F(ab')_2$ se les añadió el agente condensante SMCC (succinimidil-4-maleimido metil ciclohexano 1 carboxilado) y se incubó durante 2 h a temperatura ambiente en condiciones de oscuridad. El exceso de SMCC fue eliminado por diálisis. La molécula de $F(ab')_2$ se mezcló con 4 mg de *Keyhole limpet* Hemocianina (KLH) que habían sido previamente tratados con 2,8 mg de 2 iminotiolano en solución tampón de fosfato (31 mM fosfato de sodio, 0,46 M de NaCl, 41 mM sacarosa, pH 7,4), y se incubaron por 2 h a temperatura ambiente hasta la formación del conjugado.

Esquema de inmunización para la obtención de anticuerpos monoclonales anti- $F(ab')_2$ del AcM ES-78

Se realizaron esquemas de inmunización de 3 inoculaciones por ratón, a intervalos de 2 semanas, del $F(ab')_2$ acoplado a KLH con concentraciones decrecientes de 50, 40 y 30 mg de proteínas, respectivamente. La primera con adyuvante completo de Freund y las restantes con adyuvante incompleto de Freund. Las titulaciones de sueros de los animales para la detección de anticuerpos contra $F(ab')_2$, se realizaron por ELISA. Al ratón de mayor título se le realizó una última inoculación de 20 mg por vía intravenosa.

Obtención de hibridomas

Se le realizó 3 d antes de la fusión una última inoculación con $F(ab')_2$ ES-78 al animal de más alto título contra este inmunógeno y mayor porcentaje de inhibición de la reacción Ag-AcM ES-78. A este animal se le extrajo el bazo como fuente de esplenocitos sensibilizados y se realizó la fusión según procedimientos clásicos, utilizando las células de mieloma P3X63 Ag8 6.5.3. Los clonajes y reclonajes se realizaron por el método de dilución limitante. Los clones productores de AcMs anti-idiotipos fueron seleccionados y criopreservados en nitrógeno líquido.

Sistema de ELISA para la detección de anticuerpos anti- F(ab')₂ del AcM ES-78

El ensayo ELISA para la detección de anticuerpos contra F(ab')₂ del AcM ES-78 se realizó adsorbiendo este a la superficie de placas MaxiSorp. Se utilizó como conjugado un anti-Fc de ratón fosfatasa alcalina y como solución de sustrato, p-nitrofenilfosfato en tampón dietanolamina pH 9,8. Una vez obtenidos los anticuerpos que reconocen el F(ab')₂ del AcM ES-78, se determinó cuales podían ser los que mimetizaban el epítoto antigénico. Para esto se realizó un ELISA de inhibición como se describe a continuación.

Sistema de ELISA de inhibición para determinación de AcMs anti-idiotipos

Este sistema fue utilizado para la evaluación de los sueros y para la evaluación secundaria de hibridomas productores de anticuerpos anti F(ab')₂. Se incubó el AcM ES-78 con los sueros de ratón o sobrenadantes de hibridomas durante 1 h a 37 °C, luego se adicionaron sobre una placa MaxiSorp, recubierta con AgES. La reacción se reveló con un conjugado anti-ratón peroxidasa y con la adición de la solución de sustrato (5 mg de orto-fenilendiamina (OPD) + 5 mL de H₂O₂ + 12,5 mL de tampón citrato-fosfato pH 5,0).

Determinación de isotipos

Los isotipos de inmunoglobulina fueron determinados a través de un sistema ELISA utilizando tiras MaxiSorp recubiertas con F(ab')₂ ES-78. Sobrenadantes de cultivos de hibridomas y/o líquido ascítico fueron añadidos posteriormente. El sistema fue revelado utilizando los conjugados anti-isotipos de ratón peroxidasa y la solución de sustrato correspondiente.

Esquema de inmunización en conejo utilizando AcMs anti-idiotipos

El esquema de inmunización en conejo se realizó en 3 inoculaciones espaciadas por 15 d por

vía subcutánea, intramuscular y subcutánea, respectivamente; utilizando los 4 anticuerpos monoclonales que inhibían la reacción antígeno-AcM ES-78 y adyuvante de Freund. Se emplearon dosis decrecientes de 1 000, 800 y 600 mg/conejo. Después de 10 d de la última inoculación, a los animales le realizaron extracciones de sangre para medición del título de anticuerpos anti-AgES de *F. hepatica*.

Sistema de ELISA de detección de anticuerpos anti-antígeno de Fasciola hepatica en sueros de conejos inmunizados con AcM anti-idiotipo

El sistema inmunoenzimático se desarrolló recubriendo placas de poliestireno, MaxiSorp, con antígeno de *F. hepatica* purificado (Ag ES-78) por cromatografía de afinidad, en la que se usó como ligando el AcM ES-78. Las placas fueron bloqueadas con albúmina de suero bovino (ASB) 2,5 %. La solución de bloqueo fue removida de los pozos y los sueros, a dilución 1/1 000, de conejos inmunizados con los anti-idiotipos se añadieron e incubaron durante 1 h a 37 °C. Después del procedimiento de lavado se añadió el conjugado anti IgG de conejo-peroxidasa a la placa. La reacción fue revelada con la adición de la solución de sustrato (4 mg OPD + 5 mL de H₂O₂ + 12,5 mL de tampón citrato-fosfato pH 5). La densidad óptica fue medida a una longitud de onda de 492 nm.

RESULTADOS

Se obtuvieron títulos elevados contra F(ab')₂, con un porcentaje de inhibición de hasta 80 % de la reacción antígeno-AcM ES-78 en el suero de los ratones. Se seleccionó el ratón número 7 para la fusión por presentar el mayor porcentaje de inhibición de la reacción Ag-AcM ES-78 y un título mayor de 1/20 000 (tabla 1). Como resultado del sistema de evaluación primaria de la fusión se obtuvieron 8 AcMs que reconocen F(ab')₂. Estos hibridomas fueron evaluados nuevamente mediante un ensayo tipo ELISA de inhibición, encontrando que 4 (3G5, 5G1, 3H4 y 1H6), fueron capaces de inhibir la reacción antígeno-AcM ES-78 contra

F. hepatica (tabla 2). Estos anticuerpos monoclonales presentaron un isotipo de inmunoglobulina IgG₁. Con estos 4 AcMs se realizó un esquema de inmunización en conejos y posteriormente el suero de los conejos fue evaluado por ELISA para determinar el título de anticuerpo contra Ag ES-78 de *F. hepatica*. Solo el anti-idiotipo 3G5 fue capaz de desarrollar una respuesta de anticuerpo contra el Ag ES-78 de este parásito (tabla 3).

TABLA 1. Titulación de los sueros de ratones Balb/c inmunizados con F(ab')₂

Ratón No.	Título	% de inhibición de la reacción Ag- AcM ES-78
1	>1/20000	72,0
2	1/10000	31,2
3	>1/20000	56,2
4	>1/20000	61,7
5	>1/20000	51,3
6	>1/20000	75,4
7	>1/20000	80,8
8	>1/20000	51,8

TABLA 2. Resultados del % de inhibición de la reacción de AgES-AcM ES-78 con los diferentes anti-idiotipos

AcM anti-idiotipo	% de inhibición
3G5	89,31
5G1	81,81
3H4	88,96
1H6	88,65

TABLA 3. Resultados del sistema de detección de anticuerpos anti-antígeno de excreción-secreción de *Fasciola hepatica* en sueros de conejos inmunizados y no inmunizados con AcM anti-idiotipos

AcMs anti-idiotipos	Relación SI/SNI- (1/1 000)
3G5	4,51
3H4	1,65
1H6	1,23
5G1	1,15

SI: suero de conejo inmune, SNI: suero de conejo no inmune, SI/SNI= 1.

DISCUSIÓN

Está bien establecido que moléculas proteicas como péptidos y anticuerpos anti-idiotipos pueden imitar estructuras antigénicas constituidas por carbohidratos o glicoproteínas, además de inducir la producción de anticuerpos específicos contra estos antígenos.^{8, 9-11}

Existen numerosos reportes sobre la capacidad de los AcM anti-idiotipos murinos como vacuna contra diferentes patógenos.^{12,13} Por otra parte, se ha demostrado que fragmentos de simple cadena scFv, de estos anticuerpos, son capaces de inducir una respuesta de anticuerpos específicos hacia una estructura antigénica determinada.¹⁴ Estos fragmentos recombinantes pueden ser fácilmente manipulados para su uso en vacunas de ADN y/o fusión con citosinas o péptidos inmunogénicos.

La vía de obtención de anticuerpos monoclonales anti-idiotipos es una alternativa que permite mimetizar el epítipo protector reconocido por el anticuerpo monoclonal ES-78 obtenido contra AgES de adulto de *F. hepatica*.

En este trabajo se reportó un mimotopo usando como molde el AcM ES-78 altamente protectoro contra fasciolosis en ratones BALB/c.

El hecho de que los 4 anticuerpos monoclonales anti-idiotipos que se obtuvieron fueran capaces de inhibir la reacción antígeno-AcM ES-78 sugiere que estos debían reconocer a la región F(ab')₂ del AcM ES-78 por la región idiotípica, o sea, por el sitio de reconocimiento con el antígeno o uno cercano a este. La única manera de saber si estos anticuerpos anti-idiotipos son capaces de imitar el epítipo es inmunizando animales con ellos y realizando una evaluación posterior de los sueros de estos contra el antígeno. La presencia en el suero de conejo de anticuerpos contra el Ag ES-78 de *Fasciola* sin un previo contacto con este, es la certeza de que el anti-idiotipo está mimetizando al antígeno. Se realizó un esquema de inmunización en conejos con los 4 AcMs y posteriormente los sueros de los conejos fueron evaluados por un ELISA para la determinación del título de anticuerpo contra antígeno de *F. hepatica*. De la inmunización en los conejos con los 4 anti-idiotipos, se determinó que solo el 3G5 fue capaz de imitar el epítipo que reconoce el AcM ES-78.

Estudios previos sugieren que la infección crónica con *F. hepatica* presenta una respuesta inmune que responde a un patrón de citosina de tipo Th2.^{6,15,16} Brown y otros demostraron en 1994 que clones de células T, antígeno específico, aisladas de bovinos crónicamente infectados con *F. hepatica* expresaron un patrón de citosinas Th0 y Th2. No se detectó patrón de citosinas de tipo Th1.¹⁷ Estos datos están acorde con los reportado

por O'Neill en 2001, quien demostró que cisteíno-proteasas (catepsinas L) liberadas por *F. hepatica* suprimían la respuesta inmune de tipo Th1 generando respuesta de anticuerpos de isotipo Th2.¹⁸ Estos datos sugieren la existencia de un sistema de regulación negativa de la respuesta inmune de tipo Th1 en bovinos infectados con este parásito, como un mecanismo de escape del parásito a la respuesta inmune del hospedero.

Estos resultados sugieren la realización de experimentos en los que se inmunice con este anticuerpo anti-idiotipo, utilizando adyuvantes apropiados, de manera que desplace la respuesta inmune hacia un patrón de citosinas Th1.

AGRADECIMIENTOS

A la *International Foundation for Science*, IFS (*Research grant* No. B/3097-1) por el soporte económico y apoyo para la realización del presente estudio.

Monoclonal antibody mimicking the structure of an immunoprotective epitope against *Fasciola hepatica*

SUMMARY

The ES-78 monoclonal antibody recognizes excretory-secretory antigens of *Fasciola hepatica*. This monoclonal antibody is used for diagnosis of humans and cattle fasciolosis. The production of 4 anti-idiotypic monoclonal antibodies (3G5, 5G1, 3H4 and 1H6) inhibiting the antigen-monoclonal antibody ES 78 reaction was reported. This antibody recognizes excretion-secretion antigens of *Fasciola hepatica* and it is used for the diagnosis in faeces of fascioliasis in the bovine cattle and in humans. When the 3G5 was used in rabbits as an immunogen there was a response of antibodies against the excretion-secretion antigen of *Fasciola hepatica* without a previous contact with it. The utilization of this anti-idiotypic monoclonal antibody as an immunogen mimicking a protective epitope against fascioliasis together with appropriate adjuvants may be a new way of reducing the parasitic burden in experimental models of fascioliasis.

Key words: *Fasciola hepatica*, monoclonal antibody ES-78, anti-idiotypic monoclonal antibodies, parasitic vaccines.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Mas-Coma S, Esteban JG, Bargues MD. Epidemiology of human fascioliasis: A review and proposed new classification. *Bull WHO* 1999; 77:340-6.
- Magno Vilar M, Barrientos F, Almeida M, Thaumaturgo N, Simpson A, Garratt R, et al. An experimental bivalent peptide vaccine against schistosomiasis and fasciolosis. *Vaccine* 2003;22:137-44.

- Bundy DAP. This wormy world-then and now. *Parasitol Today* 1997;13:407-8.
- Espino AM, Marcet R, Finlay CM. Detection of circulating excretory secretory antigens in human fascioliasis by sandwich ELISA-linked immunosorbent assay. *J Clin Microbiol* 1990;28:2637-40.
- Marcet R, Díaz A, Arteaga E, Finlay CM, Sarracent J. Passive protection against Fasciolosis in mice by immunization with a monoclonal antibody (ES-78 MoAb). *Parasite Immunol* 2002;24:103-8.
- Meeusen E, Bradon M. The use of antibody secreting cell probes to reveal tissue-restricted immune responses during infection. *Eur J Immunol* 1994;24:469-74.
- Díaz A, Espino AM, Marcet R, Otero O, Torres D, Finlay CM, et al. Partial characterization of the epitope on excretory-secretory products of *Fasciola hepatica* recognized by monoclonal antibody ES78. *J Parasitol* 1998;84:55-61.
- Maitta RW, Datta K, Lees A, Belouski SS, Pirofski L. Immunogenicity and Efficacy of *Cryptococcus neoformans* capsular polysaccharide Glucuronoxylomannan peptide mimotope-protein conjugates in human immunoglobulin transgenic mice. *Infect Immun* 2004;72:196-208.
- Moe GR, Tan S, Granoff DM. Molecular mimetics of polysaccharide epitopes as vaccine candidates for prevention of *Neisseria meningitidis* serogroup B disease. *FEMS Immun. Med. Microbiol* 1999;26:209-26.
- Vyas NK, Vyas MN, Chervenak MC, Bundle DR, Pinto BM, Quijcho FA. Structural basis of peptide-carbohydrate mimicry in an antibody-combining site. *PNAS* 2003;25:15023-8.
- Beninati C, Arseni S, Mancuso G, Magliani W, Conti S, Midiri A, et al. Anti-idiotypic DNA vaccination induces serum bactericidal activity and protection against group B meningococci. *J Immunol* 2004;172:2461-8.
- McNamara M, Ward RE, Kohler H. Monoclonal idiotypic vaccine against *Streptococcus pneumoniae* infection. *Science* 1984;226:1325-6.
- Westerink MA, Campagnari AA, Wirth MA, Apicella MA. Development and characterization of an anti-idiotypic antibody to the capsular polysaccharide of *Neisseria meningitidis* serogroup C. *Infect Immun* 1988;56:1120-7.
- Magliani W, Polonelli L, Conti S, Salati A, Rocca PF, Cusumano V, et al. Neonatal mouse immunity against group B streptococcal infection by maternal vaccination with recombinant anti-idiotypes. *Nat Med* 1998;4:705-9.
- Pfister K, Tuner A, Currie E, Hall, Jarrett EE. IgE production in rat fasciolosis. *Parasite Immunol* 1983;5:587-93.
- Poitou Y, Baeza E, Boulard C. Kinetic responses of parasite-specific antibody isotypes, blood leucocyte pattern and lymphocyte subsets in rats during primary infestation with *Fasciola hepatica*. *Vet Parasitol* 1993;49:179-90.
- Brown WC, Davis WC, Dobbelaere DA, Rice-Ficht AC. CD4+ T-cell clones obtained from cattle chronically infected with *Fasciola hepatica* and specific for adult worm antigen express both unrestricted and Th2 cytokine profiles. *Infect Immun* 1994;62:818-27.
- O'Neill SM, Mills KH, Dalton JP. *Fasciola hepatica* cathepsin L cysteine proteinase suppresses *Bordetella pertussis*-specific interferon-gamma production *in vivo*. *Parasite Immunol* 2001;23(10):541-7.

Recibido: 7 de abril de 2006. Aprobado: 5 de mayo de 2006.
Lic. Ricardo Marcet Sánchez. Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kourí". Autopista Novia del Mediodía Km 6 ½., La Lisa. AP 601, Marianao 13, Ciudad de La Habana, Cuba. Teléf: 537 202-0650. Fax: 537 2046051. Correo electrónico: marcet@ipk.sld.cu; sarracent@ipk.sld.cu