

## COMUNICACIÓN BREVE

INSTITUTO DE MEDICINA TROPICAL "PEDRO KOURÍ"

### Reconocimiento de células intactas de *Cryptococcus neoformans* por el AcM 4B3 antiglucuronoxilomanano

Dr. René Gato Armas,<sup>1</sup> Dr. Gerardo Martínez Machín,<sup>2</sup> Lic. Hermis Rodríguez Sánchez,<sup>3</sup> Lic. Anselmo Otero González,<sup>4</sup> Lic. Jorge Sarracent Pérez<sup>5</sup> y Dra. María T. Illnait Zaragoza<sup>6</sup>

#### RESUMEN

Se estudió la capacidad del anticuerpo monoclonal 4B3, obtenido mediante inmunización de ratones BALB/c con el polisacárido capsular de *Cryptococcus neoformans*, para reconocer a dicha estructura como parte de la célula intacta de esta levadura. Con este propósito el anticuerpo 4B3 fue evaluado mediante ELISA celular e inmunofluorescencia indirecta empleando como antígeno una suspensión de células de la cepa 028 LMIPK de *Cryptococcus neoformans*. Se usó como control positivo suero del ratón empleado en la fusión para la obtención del anticuerpo monoclonal 4B3 y como control negativo un anticuerpo monoclonal anti-dengue. Ambos métodos demostraron que este anticuerpo monoclonal es capaz de reconocer al antígeno nativo, lo que permitirá su posterior evaluación con fines diagnósticos y terapéuticos.

**Palabras clave:** *Cryptococcus neoformans*, glucuronoxilomanano, ELISA celular, inmunofluorescencia, anticuerpo monoclonal.

Los anticuerpos monoclonales (AcM) se han convertido en el reactivo idóneo para el diagnóstico de gran número de enfermedades infecciosas, la purificación y caracterización de moléculas diversas, la detección sérica de hormonas, drogas y tóxicos, el tratamiento de infecciones y tumores malignos, así como la tipificación de antígenos en tejidos entre otras aplicaciones, revolucionándose el estudio de la inmunología, la biología celular y la biomedicina.<sup>1,2</sup>

El AcM 4B3 de clase IgG<sub>1</sub> fue previamente obtenido mediante la inyección de ratones BALB/c

con el polisacárido glucuronoxilomanano (GXM) de *C. neoformans* acoplado a eritrocitos de carnero.<sup>3</sup>

El GXM utilizado en la inmunización de los ratones había sido purificado por precipitación alcohólica a partir de un cultivo de la cepa 030 LMIPK.<sup>4</sup> Se conoce que durante los procesos de purificación pueden ocurrir cambios conformacionales en la molécula; caso en el cual es posible que los anticuerpos elaborados contra el mismo, no reconozcan al antígeno nativo.<sup>5</sup> Esto hizo necesario, antes de emprender otros estudios,

<sup>1</sup> Máster en Bacteriología-Micología. Especialista de II Grado en Microbiología. Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kourí" (IPK).

<sup>2</sup> Especialista de II Grado en Microbiología. Investigador Auxiliar. IPK.

<sup>3</sup> Máster en Bacteriología-Micología. Licenciada en Microbiología. Investigadora Agregada. IPK.

<sup>4</sup> Doctor en Ciencias Biológicas. Investigador Titular. Profesor Titular Adjunto. Facultad de Biología, Universidad de La Habana.

<sup>5</sup> Doctor en Ciencias Biológicas. Investigador Titular. IPK.

<sup>6</sup> Especialista de II Grado en Microbiología. Investigador Auxiliar. IPK.

determinar la capacidad del 4B3 para reconocer el antígeno en su forma natural, es decir, como componente de la cápsula del microorganismo.

Para esto se diseñó un ELISA celular siguiendo la metodología recomendada por *Ternynck y Avrameas*.<sup>6</sup> Se preparó una suspensión de  $1 \times 10^6$  células/mL de *C. neoformans* de la cepa 028 LMIPK para fijar las placas de poliestireno de 96 pozos (Costar). Las muestras fueron constituidas por diluciones del 4B3 (1,25; 2,5; 5, 10 y 20 g/mL), un control negativo (diluciones seriadas dobles del suero de un ratón sano desde 1/50 hasta 1/800) y un control positivo (suero del ratón utilizado para la fusión en la obtención del AcM a las mismas diluciones que el control negativo). Como valor de corte fue establecido el doble del valor de densidad óptica (DO) del suero control negativo en cada dilución.

Se consideraron positivas las concentraciones de 20, 10 y 5 mg/mL del 4B3 (fig. 1). No obstante puede apreciarse que los valores de DO en todos los casos resultaron bajos, lo cual pudo ser ocasionado por la poca sensibilidad de este tipo de ensayo, que tiene entre otras desventajas, valores de fondo elevados y la posibilidad de que las células

no se fijen de forma uniforme en los diferentes pocillos.<sup>6</sup>

Estos resultados fueron corroborados mediante inmunofluorescencia indirecta,<sup>7</sup> empleando la misma suspensión antigénica utilizada en el ELISA celular. Se aplicaron diluciones seriadas dobles desde 1/50 hasta 1/400 de las muestras; un control positivo (suero del ratón utilizado para la fusión en la obtención del 4B3) y un control negativo (AcM anti-dengue). Se consideró positiva la observación de fluorescencia de color verde delimitando las levaduras (fig. 2). La fluorescencia homogénea sobre la cápsula de la levadura le confiere un aspecto anular, que coincide con los trabajos de *Mukherjee* y otros que describieron varios patrones de fluorescencia al utilizar diferentes clases de AcMs.<sup>8</sup>

Los resultados de este trabajo permiten corroborar que el AcM 4B3 obtenido a partir del polisacárido capsular de *C. neoformans* es capaz de reconocer a este antígeno como parte de la célula intacta de esta levadura, lo cual da paso a su empleo en posteriores estudios para su posible utilización en sistemas de diagnóstico rápido o como agente terapéutico, o ambos.

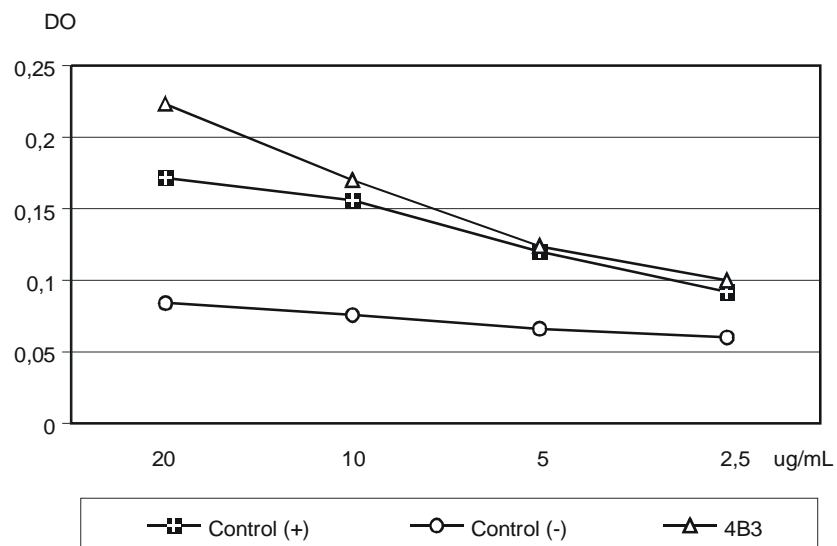


Fig. 1. Evaluación de la capacidad del AcM 4B3 para reconocer células de *C. neoformans* mediante ELISA celular.



Fig. 2. Determinación de la capacidad del AcM 4B3 para reconocer el antígeno polisacárido como parte de la estructura íntegra de la cápsula de *C. neoformans* mediante inmunofluorescencia directa.

### Recognition of intact cells from *Cryptococcus neoformans* by the anti-glucuronoxylomannan 4B3 monoclonal antibody

#### SUMMARY

The capacity of the 4B3 monoclonal antibody, previously obtained by immunization of BALB/c mice with the capsular polysaccharide of *Cryptococcus neoformans* was studied to recognize this structure as part of the intact cell of this yeast. With this aim, 4B3 was evaluated by cellular ELISA and indirect immunofluorescence, using as an antigen a cell suspension of the 028 LMIPK *C. neoformans* strain. Serum from the mouse used in the fusion for obtaining 4B3 monoclonal antibody was used as a positive control, whereas an anti-dengue monoclonal antibody was used as a negative control. Both methods demonstrated that the above mentioned monoclonal antibody is capable of recognizing the native antigen, which will allow its future evaluation for diagnostic and therapeutic purposes.

**Key words:** *Cryptococcus neoformans*, glucuronoxylomannan, cellular ELISA, immunofluorescence, monoclonal antibody.

#### REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Gavilondo JV. Anticuerpos monoclonales. La Habana: Elfos Scientiae; 1995.

2. Stites DP, Terr AI, Parslow TG. Inmunología básica y clínica. 9ª ed. México (DF): El Manual Moderno; 1999.
3. Rodríguez H, Pupo M, Illnait MT, Otero A, Martínez GF. Anticuerpos monoclonales que reconocen el polisacárido capsular de *Cryptococcus neoformans*. Rev Cubana Med Trop 2005;55(2):162-4.
4. Toraño GT, Rodríguez W, Martínez GF. Evaluación del polisacárido capsular tipo específico de *Cryptococcus neoformans* como inmunógeno y antígeno control positivo. Rev Cubana Med Trop 1998;50(3):207-8.
5. Kwong-Chung KJ, Kozel TR, Edman JC, Polacheck DE, Shinoda T, Dromer F. Recent advances in biology and immunology of *Cryptococcus neoformans*. J Med Vet Mycol 1992;30(Supl):133-42.
6. Ternynck TH, Avrameas S. Immunoenzymatic techniques. Amsterdam: Elsevier Science Publishers B.V.; 1990.
7. Palmer DE, Kauffman L, Kaplan W, Cavallaro JJ. Serodiagnosis of mycotic diseases. Springfield:CC Thomas; 1977. p. 1-245.
8. Mukherjee J, Nussbaum G, Scharff MD, Casadevall A. Protective and nonprotective monoclonal antibodies to *Cryptococcus neoformans* originating from one B cell. J Exp Med 1995;181(2):405-9.

Recibido: 22 de febrero de 2006. Aprobado: 29 de mayo de 2006.  
Dra. María Teresa Illnait Zaragoza. Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kourí". AP 601, Marianao 13, Ciudad de La Habana, Cuba. Correo electrónico: mtilnait@ipk.sld.cu