

## CAPÍTULO XVII

# DESARROLLO DE HERRAMIENTAS PARA INMUNODETECCIÓN: GENERACIÓN DE ANTICUERPOS POLICLONALES, MONOCLONALES Y BIBLIOTECAS DE FAGOS

SUSANA MAGADÁN,

*Centro Oceanográfico de Vigo, Instituto Español de Oceanografía (IEO)*

ELINA GARET, LEONARDO MANTILLA y ÁFRICA GONZÁLEZ-  
FERNÁNDEZ

*Área de Inmunología, Edificio Ciencias Experimentales,  
Universidade de Vigo*

### 1. ANTECEDENTES

Los anticuerpos o inmunoglobulinas forman parte de la defensa de los animales vertebrados. Son glicoproteínas séricas producidas por unas células denominadas linfocitos B. Poseen una estructura básica simétrica (en forma de Y) compuesta por dos cadenas pesadas idénticas (H, del inglés «*heavy*») y dos cadenas ligeras (L, del inglés «*light*»), también idénticas entre sí, unidas por puentes disulfuro. En esta estructura podemos diferenciar y separar fácilmente sus funciones: por un lado, la región por la que interacciona con el antígeno (los brazos de la Y o fragmento Fab), y por otro, la región que le confiere capacidad efectora (la base de la Y o fragmento Fc) (Fig. 1). En el fragmento Fab se encuentran los dominios variables de las cadenas pesadas (VH) y ligeras (VL), los cuales establecen el contacto directo con el antígeno. Se denominan así porque en ellos se encuentran la mayoría de las diferencias de secuencia entre los distintos anticuerpos.

Tras la entrada de un agente extraño o antígeno, los linfocitos B que presenten anticuerpo capaz de reconocer a este agente se activarán y proliferarán, dando lugar a clones de células idénticas que se di-

ferencian a células plasmáticas productoras de anticuerpos solubles o a células de memoria. Así, el clon originado a partir de la activación de un único linfocito B producirá un mismo anticuerpo o *anticuerpo monoclonal* (AcM). Debido a que la mayoría de los antígenos son estructuras complejas (bacterias, virus, parásitos), la respuesta inmune que se genera no afecta a un único tipo de linfocito B específico. Suelen activarse diferentes células B, cada una de ellas productora de un anticuerpo específico frente a una región concreta del antígeno. Como resultado, tras la respuesta inmunitaria, en el suero aparece una mezcla de anticuerpos, denominados *anticuerpos policlonales* (AcPs), puesto que proceden de distintos clones de linfocitos B.

Aunque cada linfocito puede producir un único tipo de anticuerpo, la gran diversidad de anticuerpos que se pueden generar (miles de millones diferentes), junto a su gran especificidad, ha hecho que los anticuerpos se hayan convertido en unas herramientas imprescindibles en el desarrollo de muchos campos científicos, en técnicas de inmunodiagnóstico, investigación o incluso en terapia.

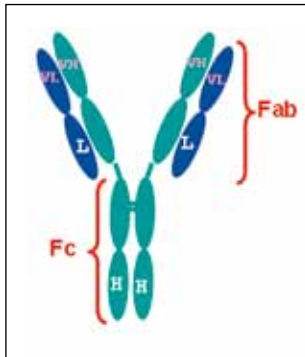


FIGURA 1. Estructura básica de un anticuerpo: dos cadenas pesadas (H) y dos cadenas ligeras (L) unidas por puentes disulfuro. Presenta dos regiones de unión al antígeno (Fab) y una efectora (Fc).

En este capítulo hablaremos de cómo obtener anticuerpos policlonales y monoclonales, y también reflejaremos las ventajas y desventajas de cada uno de ellos. Además, abordaremos cómo los avances en la biología molecular han hecho posible el uso de genes codificantes de inmunoglobulinas para la construcción de anticuerpos recombinantes frente a casi cualquier molécula sin la necesidad de utilizar animales de experimentación.

## 2. ANTICUERPOS POLICLONALES

Para la obtención de anticuerpos policlonales se requieren distintos pasos:

1. *Preparar el antígeno* para que induzca una buena respuesta inmune. El antígeno puede ser de cualquier tipo (proteína, azúcares, lisados celulares, de algas, de larvas, etc.), pero si es de pequeño tamaño debe conjugarse a una proteína para inducir respuesta. Debe emplearse una dosis adecuada de antígeno, evitándose al máximo la presencia de impurezas que estimulen la producción de anticuerpos no deseados, haciéndose necesaria una pu-

rificación exhaustiva del antígeno. Por otra parte, suelen añadirse sustancias adyuvantes que potencian dicha inmunidad, entre los que se encuentran sales de aluminio (alum), aceites (completo o incompleto de Freund), o escualeno.

2. *Seleccionar el animal a inmunizar.* Suelen emplearse cabras, conejos, caballos por su gran tamaño y facilidad de manejo. En los últimos años también se están utilizando gallinas ponedoras, lo que permite la obtención de anticuerpos a partir de los huevos (TINI *et al.*, 2002).

3. *Utilizar una vía de inmunización adecuada.* Subcutánea o intramuscular son las más utilizadas dado que inducen una mejor respuesta.

Se inmuniza al animal varias veces (con intervalos de 3-4 semanas) con el fin de inducir memoria inmunológica y una buena producción de anticuerpos específicos, y se recogen muestras de sangre de forma periódica. Tras la formación del coágulo, se centrifuga la sangre y se obtiene el suero que contiene los AcPs. Para conocer el nivel de AcPs generados se pueden realizar técnicas de inmunodetección como ELISA, inmunofluorescencia, etc. (ver capítulo LORENZO *et al.*) frente al antígeno de interés (Fig. 2). Los sueros pueden conservarse congelados durante largos períodos de tiempo con preservantes para evitar su contaminación.

### 3. ANTICUERPOS MONOCLONALES

En 1975 los Drs. César Milstein y George Köhler (KÖHLER y MILSTEIN, 1975) desarrollaron una técnica biotecnológica capaz de generar una célula inmortal con alta capacidad secretora de un único anticuerpo específico, lo que les hizo ser merecedores del Premio Nobel en 1984. Esta técnica consiste en la fusión celular entre un linfocito B específico y una célula plasmática tumoral para obtener una célula híbrida inmortal o hibridoma (Fig. 2). Esta célula híbrida secreta en grandes cantidades un único anticuerpo que se denomina Anticuerpo monoclonal (AcM) (MAGADÁN y GONZÁLEZ-FERNÁNDEZ, 2004).

De forma semejante a lo descrito en la obtención de AcPs, si queremos desarrollar AcMs debemos preparar el antígeno para que induzca una buena respuesta inmune, seleccionar el animal a utilizar (suelen ser ratones o ratas) e inmunizar a través de una vía adecuada, generalmente la intraperitoneal, y unos días antes del sacrificio del animal se inmuniza vía intravenosa.

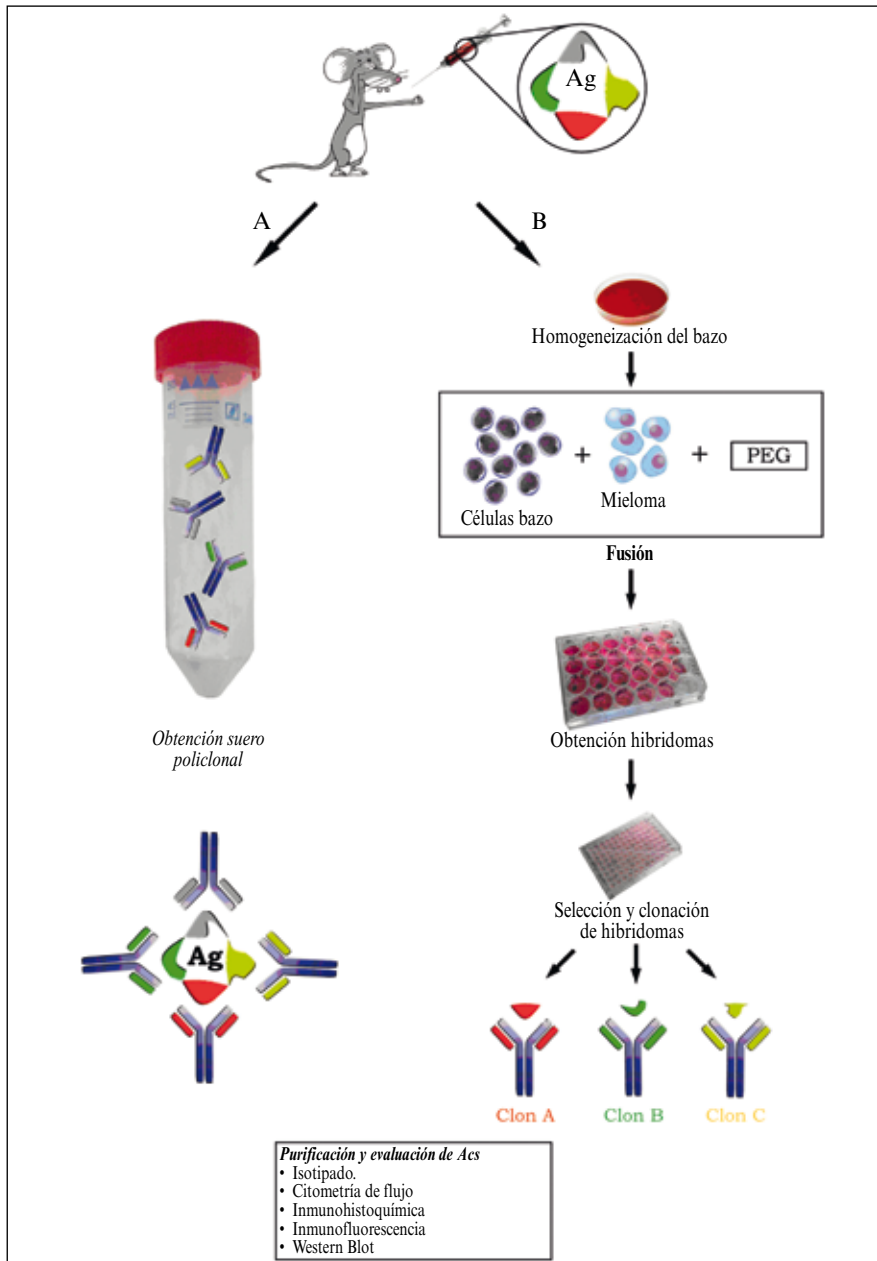


FIGURA 2. Esquema explicativo de la obtención de anticuerpos policlonales (A) y monoclonales (B) tras la inmunización de un ratón con un antígeno (Ag) complejo. Una vez obtenidos los anticuerpos tienen que ser purificados y evaluados con diferentes técnicas.

La producción de AcMs es un proceso laborioso (Fig. 2) en el que podemos destacar los siguientes pasos:

1. *Inmunización repetida* del animal con intervalos de 3-4 semanas. Las inmunizaciones repetidas permitirán una correcta activación del sistema inmunitario, y que puedan conseguirse anticuerpos que reconozcan con mayor fuerza (afinidad) al antígeno inmunizante.

2. *Obtener bazo u otro órgano linfoide*. El segundo paso es muy distinto al de los AcPs. A diferencia de éstos en los que se recogía el suero inmune, aquí se emplean las propias células B activadas presentes en órganos linfoides. Por tanto hay que sacrificar al animal y extraer el órgano linfoide de interés (suele ser el bazo), donde se encuentran las células B activadas (MAGADÁN y GONZÁLEZ-FERNÁNDEZ, 2004).

3. *Generación de hibridomas*. Las células B se fusionan con células plasmáticas tumorales (mieloma) en presencia de polietilenglicol (PEG). Las células de mieloma de ratón más comúnmente utilizadas son las NS0 y Sp2/0, las cuales presentan la característica de no secretar anticuerpos propios y ser defectivos en un enzima.

4. La siguiente fase consiste en la *selección de los hibridomas* en un medio selectivo con hipoxantina, aminopterina y timidina (denominado HAT) que permitirá sólo la supervivencia de las células híbridas. Aquellos linfocitos B y células de mieloma no fusionadas mueren en pocos días. Como resultado, el hibridoma posee las características de sus células parentales: producen un anticuerpo específico y son inmortales.

5. Posteriormente, se lleva a cabo el estudio de los hibridomas que secretan el anticuerpo con la especificidad deseada. Para ello, el sobrenadante se analiza frente a la diana específica mediante diversas técnicas (ELISA, inmunofluorescencia, Western blot, etc.).

6. Cada célula híbrida secretora debe *individualizarse en un pocillo* (mediante dilución límite o clonación en agar), con el fin de asegurar la monoclonalidad del anticuerpo. Esta célula dará lugar a células hijas idénticas secretoras (clon), que pueden mantenerse en cultivo de forma indefinida o congeladas en presencia de un crioprotector como el dimetilsulfóxido (a  $-80^{\circ}\text{C}$  durante unos meses o en nitrógeno líquido durante años) para su utilización en el momento deseado.

7. El *anticuerpo monoclonal* puede obtenerse directamente del sobrenadante de los hibridomas. Los que secretan anticuerpos de isotipo IgG suelen producir entre 5-50  $\mu\text{g/mL}$ . Para aumentar la concentración del anticuerpo se han venido utilizando diferentes métodos, como la producción de ascitis en ratones (los hibridomas se inyectan

en la cavidad peritoneal de ratones donde crecen y liberan el anticuerpo), sin embargo, debido al sufrimiento que se genera al ratón y a su prohibición en determinados países, se han desarrollado sistemas de cultivos especiales que permiten crecer las células híbridas en alta concentración. En ambos casos la concentración de anticuerpo obtenida depende de la calidad del hibridoma y puede variar entre 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  a 2  $\text{mg}/\text{mL}$ .

#### 4. POLICLONALES *VERSUS* MONOCLONALES

Tanto los AcPs como AcMs se utilizan de forma rutinaria en muchas técnicas inmunológicas bien solos o conjugados a enzimas, fluorocromos, biotina, toxinas, sustancias radioactivas, nanopartículas (ver capítulo LORENZO *et al.*). También pueden emplearse para purificación de antígenos en columnas de cromatografía de afinidad.

En el campo biomédico, son verdaderamente los AcMs los que han revolucionado tanto las técnicas de diagnóstico, permitiendo identificar tipos celulares en leucemias, seguimiento de pacientes con SIDA, clasificación de patógenos, etc.; como en la aplicación terapéutica (frente al cáncer, enfermedades autoinmunes, cardiovasculares, etc.) en la que la aplicación continuada de AcPs puede inducir respuestas de hipersensibilidad o rechazo.

En la Biología y Ecología marina, la aplicación de estas herramientas abre grandes posibilidades en la identificación de especies (algas, larvas) (ABALDE *et al.*, 2003; PÉREZ *et al.*, 2009; CARRERA *et al.*, 2010), cuantificación de toxinas marinas (GARET *et al.*, 2010), detección y localización de agentes patógenos (ARZUL *et al.*, 2002), estudio del sistema inmune de diversos organismos marinos e, incluso, estudios ecológicos (BARREIRO *et al.*, 2006).

Si bien es cierto que los ámbitos de aplicación de los AcPs y AcMs son similares, es importante tener en cuenta diversos aspectos que afectan a la decisión del investigador en la elección de un tipo u otro:

1) Los AcPs son muy versátiles en su uso, y su obtención es sencilla y económica.

No debe utilizarse para organismos o mezclas complejas, ya que requiere la purificación exhaustiva del antígeno de interés.

Los lotes no son reproducibles, están limitados en cantidad, y el suero inmune contiene una mezcla heterogénea de anticuerpos.

2) La generación de un anticuerpo monoclonal es más cara que la obtención de policlonales. Requiere de un laboratorio bien equipa-

do (medios, microscopio invertido, cabinas de flujo laminar, incubadores con suministro de CO<sub>2</sub>, material plástico especial, etc.) bajo condiciones de esterilidad que permita realizar cultivos celulares, así como un animalario donde se mantengan los individuos durante todo el proceso en condiciones controladas. Además, las células híbridas son inestables y gran parte de ellas pierden su capacidad de secreción o división. Es por tanto una metodología laboriosa y menos eficiente que la utilizada para la obtención de policlonales.

Sin embargo, los AcMs son mucho más específicos que los policlonales, no hay variabilidad ni mezcla de anticuerpos, permitiendo una mayor y mejor reproducibilidad de las técnicas.

## 5. OBTENCIÓN DE ANTICUERPOS A PARTIR DE BIBLIOTECAS DE FAGOS RECOMBINANTES

La obtención y aplicación de los AcPs y AcMs son técnicas convencionales para muchos laboratorios de Inmunología. Sin embargo, ha sido necesario desarrollar nuevas tecnologías que permitan obtener anticuerpos de especies en las que está prohibida una inmunización intencionada (como la humana) o frente a sustancias que no generan una buena respuesta inmune. Esto ha sido posible gracias a los avances en la biología molecular y en la ingeniería de anticuerpos que facilitan el uso de genes codificantes de inmunoglobulinas para la construcción de anticuerpos recombinantes. Éstos pueden ser expresados en diversos sistemas tales como: bacterias, insectos, levaduras y plantas. Esta tecnología permite la obtención de anticuerpos frente a casi cualquier antígeno, sin la necesidad de utilizar animales.

De las tecnologías disponibles, la más utilizada es la *exposición en virus bacteriófagos (fagos) o phage display*, la cual mimetiza a la célula B de los animales vertebrados. Este procedimiento fue propuesto por George P. Smith en 1985 (SMITH, 1985), y describe una técnica de selección *in vitro* en la cual billones de genes codificantes para péptidos o proteínas son fusionados al gen que codifica para una proteína de la cápside viral (pVIII o pIII), e insertados en un vector fago o fagémido. Esta fusión asegura que cuando las partículas virales sean ensambladas, la proteína al ser expuesta será presentada en la superficie del fago, que llevará a su vez la secuencia que la codifica. La aplicación de esta tecnología permite generar bibliotecas de millones o billones de secuencias nucleotídicas para proteínas diferentes. Los virus más utilizados en la construcción de bibliotecas son bacteriófagos atemperados que infectan, sin matarlas, a bacterias Gram -, como *Escherichia coli* (*E. coli*).

Se han desarrollado numerosas bibliotecas donde los anticuerpos recombinantes son presentados en la proteína viral de cubierta como fragmentos variables de simple cadena (*scFv*, del inglés *single chain fragment variable*) (HOLT *et al.*, 2000), en los que regiones variables de cadena ligera ( $V_L$ ) y pesada ( $V_H$ ) están unidos mediante una cadena peptídica flexible (péptido de unión) y son expresados asociados a la proteína viral pIII.

Los genes codificantes para las cadenas  $V_H$  y  $V_L$  pueden obtenerse de distintas fuentes (como se indica en la Fig. 3): (i) a partir de genes  $V$  naturalmente reagrupados, aislados del ARNm de células B de donantes no inmunizados (bibliotecas naturales), (ii) de células B de donantes inmunizados (biblioteca inmune), (iii) a partir del ensamblaje *in vitro* de segmentos génicos VDJ, mediante PCR (biblioteca sintética).

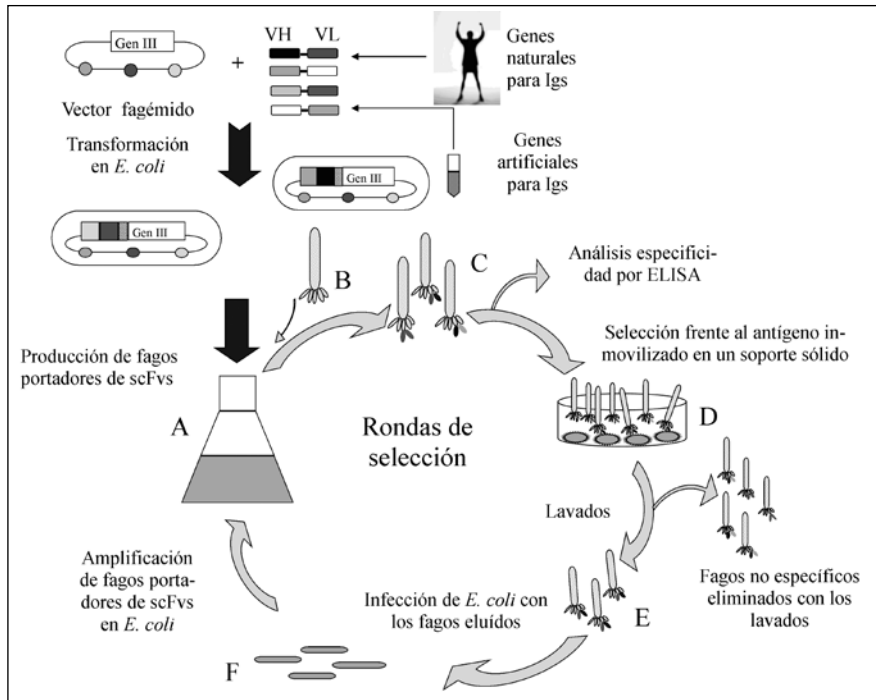


FIGURA 3. Esquema de la construcción de una biblioteca de fragmentos de anticuerpos de simple cadena (*scFv*) expresados en fagos, y la selección de anticuerpos específicos frente a un antígeno diana. Tras crecer bacterias portadoras de fagémidos (A), se infectan con un fago auxiliar (B) para obtener fagos que expresan una amplia variedad de *scFv* (C) los cuales se enfrentan al antígeno inmobilizado en un soporte sólido (D). Los fagos inespecíficos son eliminados en los lavados y aquellos unidos al antígeno (E) son amplificados en un nuevo cultivo de *E. coli* (F). La selección se repite varias veces con el fin de obtener una población homogénea de fagos específicos frente al antígeno.



Una vez obtenido el repertorio de genes  $V_H$  y  $V_L$ , éstos son clonados junto con el gen codificante para la proteína viral de cubierta (generalmente pIII), en un plásmido fagémido con origen de replicación viral, un promotor (generalmente *lac Z*), un péptido señal que dirige la secreción de la proteína recombinante, una señal de unión al ribosoma bacteriano y un gen de resistencia a antibiótico. Estos vectores son transformados en una cepa supresora de *E. coli*, generando así una biblioteca ampliamente diversa ( $> 10^8$  secuencias diferentes), la cual tras ser infectada con un fago auxiliador (*helper phage*) como M13, necesario para la formación de nuevas partículas virales, dará lugar a una nueva progenie viral que «expone» el fragmento de anticuerpo y que contiene además el gen que lo codifica (Fig. 3).

Esta población ampliamente diversa de fagos modificados permite la selección de anticuerpos de alta afinidad frente a una inmensa variedad de antígenos. Durante el proceso de selección, conocido como *panning*, la población de fagos recombinantes es expuesta al antígeno de interés inmovilizado sobre un soporte sólido con el fin de capturar aquellas partículas capaces de reconocerlo específicamente (HOOGENBOOM *et al.*, 1998). Este proceso consta de rondas sucesivas de unión, lavado, elución y amplificación (Fig. 3 A-F), donde la población viral originalmente muy diversa, se incrementa, enriqueciéndose en aquellos fagos capaces de reconocer al antígeno. Este proceso de manipulación del ADN para crear una biblioteca de millones de variantes, empaquetamiento dentro del fago, y subsecuente selección es el protocolo básico para la tecnología de *exposición en fagos*, el cual se está utilizando con éxito en la obtención de anticuerpos frente a moléculas que no pueden ser inyectadas en animales debido a su alta toxicidad, como por ejemplo, las toxinas producidas por determinadas algas marinas (McELHINEY *et al.*, 2000).

## 6. REFERENCIAS

- ABALDE, S. L.; FUENTES, J., y GONZÁLEZ-FERNÁNDEZ, A. (2003): «Identification of *Mytilus galloprovincialis* larvae from the Galician rías by mouse monoclonal antibodies», *Aquaculture*, vol. 219, pp. 545-559.
- ARZUL, I.; RENAULT, T.; THEBAULT, A., y GERARD, A. (2002): «Detection of oyster herpesvirus DNA and proteins in asymptomatic *Crassostrea gigas* adults», *Virus Research*, vol. 84, pp. 151-160.
- BARREIRO, A.; GUISANDE, C.; FRANGÓPOLUS, M.; GONZÁLEZ-FERNÁNDEZ, A.; MUÑOZ, S.; PÉREZ, D.; MAGADÁN, S.; MANEIRO, I.;

- RIVEIRO, I., y IGLESIAS, P. (2006): «Feeding Strategies of the copepod *Acartia Cluse* upon sole and mixed diets of toxic and non-toxic strains of the dinoflagellate *Alexandrium minutum*», *Marine Ecology Progress Series*, vol. 316, pp. 115-125.
- CARRERA, M.; GARET, E.; BARREIRO, A.; GARCÉS, E.; PÉREZ, D.; GUISANDE, C. y GONZÁLEZ-FERNÁNDEZ, A. (2010): «Generation of monoclonal antibodies for the specific immunodetection of the toxic dinoflagellate *Alexandrium minutum* Halim from Spanish waters», *Harmful Algae*, vol. 9, pp. 272-280.
- GARET, E.; GONZÁLEZ-FERNÁNDEZ, A.; LAGO, J.; VIEITES, J. M., y CABADO, A. G. (2010): «Comparative Evaluation of Enzyme-Linked Immunoassay and Reference Methods for the Detection of Shellfish Hydrophilic Toxins in Several Presentations of Seafood», *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 58, pp. 1410-1415.
- HOLT, L.; ENEVER, C.; DE WILDT, R., y TOMLINSON, I. M. (2000): «The use of recombinant antibodies in proteomics», *Current Opinion in Biotechnology*, vol. 11, pp. 445-449.
- HOOGENBOOM, H. R.; DE BRUINE, A. P.; HUFTON, S. E.; HOET, R. M.; ARENDS, J. W., y ROOVERS, R. C. (1998): «Antibody phage display technology and its applications», *Immunotechnology*, vol. 4, pp. 1-20.
- KÖHLER, G., y MILSTEIN, C. (1975): «Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity», *Nature*, vol. 256, pp. 495-497.
- MAGADÁN, S., y GONZÁLEZ-FERNÁNDEZ, A. (2004): «Generación de Anticuerpos Monoclonales *in vivo*», en *Anticuerpos monoclonales, realidades y perspectivas*, Editorial Complutense, Madrid.
- McELHINEY, J.; LAWTON, L. A., y PORTER, A. J. R. (2000): «Detection and quantification of microcystins (cyanobacterial hepatotoxins) with recombinant antibody fragments isolated from a naive human phage display library», *FEMS Microbiology Letters*, vol. 193, pp. 83-88.
- PÉREZ, D.; LORENZO-ABALDE, S.; GONZÁLEZ-FERNÁNDEZ, A. y FUENTES, J. (2009): «Immunodetection of *Mytilus galloprovincialis* larvae using monoclonal antibodies to monitor larval abundance on the Galician coast: Optimization of the method and comparison with identification by morphological traits», *Aquaculture*, vol. 294, pp. 86-92.
- SMITH, G. P. (1985): «Filamentous fusion phage: novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface», *Science*, vol. 228, pp. 1315-1317.
- TINI, M.; JEWELL, U. R.; CAMENISCH, G.; CHILOV, D., y GASSMANN, M. (2002): «Generation and application of chicken egg-yolk antibodies», *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular and Integrative Physiology*, vol. 131, pp. 569-574.