**ANTICUERPO MONOCLONAL QUE RECONOCE LA IGT RECOMBINANTE Y NATIVA DE LA TILAPIA DEL NILO (*Oreochromis niloticus*)**

*MONOCLONAL ANTIBODY THAT RECOGNIZES THE RECOMBINANT AND NATIVE IGT FROM NILE TILAPIA (Oreochromis niloticus)*

***Maylin Pérez-Bernal****\* MSc.* ***https://orcid.org/0000-0002-3769-4857;***

***Onel Valdivia Pérez****\*MSc.* [***https://orcid.org/0000-0002-3905-6877***](https://orcid.org/0000-0002-3905-6877)

Departamento de Investigación-Desarrollo, Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología de Sancti Spíritus, Cuba.

**Resumen**

Los anticuerpos monoclonales (AcMs) se aplican en diversos métodos inmunológicos dentro de las ciencias veterinarias. Se han generado AcMs contra inmunoglobulinas séricas de peces. En la tilapia del Nilo (*Oreochromis niloticus*), uno de los peces comestibles más producidos en el mundo, la IgM es la inmunoglobulina más abundante, pero la IgT está más especializada en la inmunidad mucosal y no existen AcMs que la reconozcan y que sustenten estudios inmunológicos en esta especie. En este trabajo se generó un AcM específico contra la IgT de *O. niloticus*. Se inmunizaron ratones BALB/c con péptidos sintéticos conjugados a KLH. El ratón con mayores títulos de anticuerpos recibió dosis de refuerzo del péptido más inmunogénico y sus esplenocitos se fusionaron a células de mieloma P3X63Ag8.653. Los hibridomas secretores de AcMs específicos se pesquisaron mediante ELISA contra el péptido conjugado a BSA, contra IgT recombinante y nativa y contra la IgM, y se clonaron por dilución limitante. Un clon altamente secretor demostró su especificidad contra la IgT recombinante y nativa y no tuvo reactividad cruzada con la IgM. Este AcM fue purificado mediante cromatografía de afinidad a proteína A y podrá utilizarse para evaluar los efectos protectores de vacunas contra patógenos que afectan el cultivo de la tilapia.

**Palabras clave**: anticuerpo monoclonal, ELISA, IgT, hibridoma, tilapia

**ABSTRACT**

Monoclonal antibodies (AcMs) are involved in immunological methods applied in veterinary sciences. AcMs have been generated against serum immunoglobulins of fish including tilapia species, one of the most extensively, produced food fish in the world. In Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) the IgM is the most abundant immunoglobulin, but IgT is more specialized for mucosal immunity and there are no AcMs that recognize it and that support the understanding of tilapia immune response. In this work we aimed to generate an AcM that specifically recognized the IgT from *O. niloticus*. BALB/c mice were immunized with synthetic peptides conjugated to KLH. Mouse with highest antibody titers was boosted with the most immunogenic peptide. Splenocytes from the mouse were fused with P3X63Ag8.653 myeloma cells. Hybridomas secreting specific AcMs were screened by ELISA against BSA-conjugated peptide, against recombinant and native IgT and against IgM, and they were cloned by limiting dilution. A highly secretory clone demonstrated its specificity against recombinant and native IgT and was not cross-reactive with IgM. This AcM was purified by protein A affinity chromatography and it can be used in the evaluation of protective effects of vaccines against pathogens that affect the tilapia culture.

**Keywords**: ELISA, IgT, hybridoma, monoclonal antibody, tilapia

1. **INTRODUCCIÓN**

Debido a su alta especificidad y afinidad, los anticuerpos monoclonales (AcMs) son herramientas poderosas para una amplia gama de métodos inmunológicos, como el ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA) y los procedimientos de inmunotransferencia, y análisis de antígenos en las ciencias médicas y veterinarias, así como en las opciones diagnósticas y terapéuticas para el seguimiento y el tratamiento de enfermedades (Holzlöhner y Hanack, 2017).

Los AcMs que reaccionan específicamente con inmunoglobulinas proporcionan un dispositivo eficaz para evaluar la producción de anticuerpos después de una infección o vacunación (Mohanty et al., 2020). Se han producido AcMs contra inmunoglobulinas séricas de una gran variedad de animales marinos y de agua dulce, incluidas las especies de tilapia, uno de los peces comestibles más producidos en el mundo. Las especies de tilapia se incluyen en el grupo de los teleósteos, que tienen tres isotipos de inmunoglobulinas séricas (IgM, IgD e IgT), tienen linfocitos B y T y reaccionan ante los patógenos al inducir respuestas de anticuerpos específicos contra un antígeno (Flajnik, 2018). En la tilapia del Nilo (*Oreochromis niloticus*), la IgM es el isotipo de inmunoglobulina más abundante. Velázquez y colaboradores (2021) produjeron y caracterizaron un AcM contra la cadena pesada de esta IgM utilizando una estrategia basada en péptidos. Los péptidos sintéticos se aplican ampliamente como antígenos para generar anticuerpos, como un enfoque ventajoso para evitar la reacción cruzada con otras inmunoglobulinas (Jirapongpairoj et al., 2017). En los teleósteos la IgT está más especializada para la inmunidad mucosal (Velázquez et al., 2021). Recientemente, Fu et al. (2021) desarrollaron un AcM contra la IgT de un pez perciforme, la corvina amarilla grande (*Larimichthys crocea*), utilizando como inmunógeno la región CH2 de la cadena pesada de IgT de este pez. El AcM anti-IgT murino obtenido reconoció específicamente la IgT en los tejidos de la mucosa. Sin embargo, en el caso de la tilapia del Nilo, no existen informes acerca de la generación de AcMs que reconozcan específicamente la IgT y que respalden el análisis de la respuesta inmunológica en esta especie.

En el presente trabajo se generó y purificó por primera vez un AcM que reconoce la IgT de la tilapia del Nilo. En este contexto se evaluó la especificidad del AcM generado frente a las formas recombinante y nativa de la IgT, y su capacidad de discriminar entre los isotipos IgM e IgT. La cromatografía de afinidad a proteína A se utilizó para purificar este nuevo anticuerpo, que será útil para estudiar el sistema inmunológico humoral de la tilapia y los efectos protectores de las vacunas en esta especie.

1. **DESARROLLO**

Para la realización de este trabajo se utilizaron los siguientes antígenos, suministrados por el Departamento de Biotecnología Animal del Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología de La Habana:

* Tres péptidos sintéticos e inmunogénicos (p62, p63 y p64) con secuencias de aminoácidos localizadas en el fragmento CH2 de la cadena pesada de tilapia del Nilo IgT. Los péptidos se usaron conjugados a KLH (Keyhole Limpet Hemocyanin) para la inmunización de ratones y a BSA (Albúmina de Suero Bovino) para el cribado de hibridomas mediante ELISA.
* Fragmento de IgT recombinante, producido como una proteína de fusión a una cola de seis Histidinas en la cepa de *Escherichia coli* BL21 (DE3) como sistema hospedero.
* IgT nativa, obtenida del moco epitelial de la tilapia del Nilo de forma similar a la descrita por Xu *et al.* (2013).
* IgM del suero de tilapia del Nilo, purificada según Velázquez *et al.* (2021).

El esquema de inmunización se aplicó en quince ratones BALB/c de siete semanas de edad con un peso corporal entre 20 y 25 g, proporcionados por el Centro Nacional de Producción de Animales de Laboratorio. Antes de iniciar el esquema se recogieron muestras de sangre de cada ratón para utilizarlas como sueros control pre-inmunizados.

Se utilizaron los péptidos sintéticos conjugados a KLH para tres inmunizaciones subcutáneas de los ratones (cinco ratones para cada péptido) con un intervalo de 28 días entre ellas. En la primera inmunización, se inyectaron 60µg de cada inmunógeno con adyuvante completo de Freund (Sigma-Aldrich), mientras que en la segunda y tercera inmunizaciones se utilizó adyuvante incompleto de Freund (Sigma-Aldrich) con 30µg de inmunógeno.

Cuatro semanas después de la tercera inmunización, se extrajo sangre a los ratones para la titulación sérica de anticuerpos específicos por ELISA, siguiendo el protocolo descrito por Pérez-Bernal *et al* (2021) con las siguientes modificaciones: las placas se recubrieron con tres antígenos diferentes: 10 µg/ml de cada péptido conjugado con BSA, 10µg/ml del fragmento de IgT recombinante o tres diluciones (1:2, 1:4 y 1:8) de moco epitelial con IgT nativa. Los sueros de los ratones inmunizados se diluyeron en serie de 1:250 a 1: 28000, con 2 como factor de dilución, excepto para el ELISA utilizando el moco epitelial como antígeno de recubrimiento, donde se aplicó una única dilución de suero de 1:50.

El ratón con los títulos séricos más altos se inyectó intraperitonealmente con 50µg del péptido correspondiente conjugado a KLH y disuelto en PBS estéril (NaCl 0,137M, KCl 2,7mM, Na2HPO4 10mM, KH2PO4 1,8mM, pH 7.4), 3 días antes de la esplenectomía.

Los hibridomas se obtuvieron mediante el método descrito por Kohler y Milstein (1975). Se usaron linfocitos del bazo del ratón y células de mieloma de ratón de la línea P3X63Ag8.653 en crecimiento exponencial, para realizar la fusión celular con una solución de polietilenglicol al 50% (p/v) (Sigma, Hybri-Max). Las células se distribuyeron en placas de cultivo de 96 pocillos, se resuspendieron en medio de selección RPMI-HAT (Sigma, Hybri-Max) con 20% de suero fetal bovino. Las placas se incubaron a 37°C en una atmósfera de CO2 al 5%. Después de 10 días, el sobrenadante de los pocillos con hibridomas en crecimiento se analizó mediante el ELISA descrito anteriormente utilizando 10µg/ml del péptido conjugado a BSA o 10µg/ml del fragmento de IgT recombinante, de IgT nativa del moco epitelial de tilapia o de IgM, adsorbidos a la fase sólida, para la detección de anticuerpos específicos anti-IgT de tilapia. Los pocillos con valores de absorbancia por encima de 1.000 se clonaron mediante el método de dilución limitante (Quiroz y Tsao, 2016) a razón de una célula por pocillo.

La clase (IgM, IgA o IgG) y la subclase de IgG (IgG1, IgG2a, IgG2b o IgG3) del AcM presente en el sobrenadante del cultivo del clon de hibridoma se identificaron con un kit comercial de isotipaje (Sigma-Aldrich), siguiendo las instrucciones del fabricante.

Para la producción a mayor escala y posterior purificación del AcM generado, las células de la hibridoma seleccionado se lavaron en medio RPMI-1640 (Sigma, Hybri-Max), se centrifugaron a 180 × g durante 10 min y se resuspendieron en medio RPMI-1640, hasta una concentración de 1x106 células/mL. La suspensión celular se inyectó por vía intraperitoneal a 20 ratones BALB/c, 1 ml por ratón. El peritoneo de los ratones se estimuló con aceite mineral parafínico diez días antes de la inyección. Siete días después, se extrajo el líquido ascítico mediante punción del peritoneo y se clarificó mediante centrifugación a 1125 × g durante 30 min.

La ascitis se filtró a través de lana de vidrio, se precipitó con 50% (p/v) de sulfato de amonio y se centrifugó durante 30 min a 6000 × g. Se resuspendió el sedimento en glicina 1,5M, NaCl 3M, pH 8,9 y se cargó en una matriz de flujo rápido de nProteína A Sefarosa empaquetada en una columna C10/10 con 8,5 cm de altura. La elución se llevó a cabo con tampón citrato pH 3,0. El perfil cromatográfico se comprobó midiendo la absorbancia a 280 nm. El eluato se neutralizó con Tris-HCl 2M y se dializó en Tris-HCl 20mM, NaCl 150mM, pH 7,0 durante 16 h, y luego se filtró a través de una membrana de 0,2µm. Se añadió una concentración final de 0,02% (v/v) de timerosal como conservante del AcM purificado. La purificación se chequeó mediante una electroforesis en un gel desnaturalizante de poliacrilamida al 12,5% con dodecilsulfato de sodio al 2% (SDS-PAGE).

Como muestra la figura 1, todos los ratones inmunizados alcanzaron títulos de anticuerpos en suero y no se detectaron en los sueros control pre-inmunizados. El mejor resultado del esquema de inmunización se obtuvo en los ratones inmunizados con P62-KLH. El suero del quinto ratón de este esquema mostró valores de absorbancia superiores a 1.000 en el rango de dilución entre 1: 250-1: 32000 (Figura 1A). Los ratones inmunizados con P63-KLH y P64-KLH mostraron valores de absorbancia inferiores a 1.000 desde la dilución 1:2000 en adelante (Figuras 1B, C).

**Figura 1**. Resultados de la titulación por ELISA de sueros de ratones después de tres inmunizaciones con péptidos sintéticos de IgT conjugados a KLH. Las placas de ELISA se recubrieron con los péptidos: **(A)** P62-BSA; **(B)** P63-BSA; **(C)** P64-BSA. Se muestra la absorbancia promedio (492 nm) ± desviación estándar para muestras duplicadas.

Cuando el fragmento de IgT recombinante fue adsorbido a la fase sólida, el ELISA confirmó el reconocimiento de los anticuerpos presentes en sueros de ratones inmunizados con P62-KLH (Figura 2A), mayoritariamente en el ratón número cinco, lo que coincidió con los resultados anteriores de las titulaciones de suero utilizando P62-BSA como antígeno de recubrimiento. Se revelaron hallazgos similares cuando la placa ELISA se recubrió con tres diluciones de moco epitelial de tilapia que contenía IgT nativa: en el suero del ratón número cinco, incluido en el esquema de inmunización con P62-KLH, se encontraron los valores de absorbancia más altos (Figura 2B). Por tanto, el péptido P62 fue el más inmunogénico y se seleccionó el quinto ratón de este esquema como fuente de esplenocitos para obtener los hibridomas.

**Figura 2.** Reactividad de los sueros de ratones contra las formas recombinante y nativa de IgT de tilapia del Nilo. **(A)** La placa de ELISA se recubrió con un fragmento de IgT recombinante. **(B)** La placa de ELISA se recubrió con la IgT nativa del moco epitelial y se aplicaron sueros murinos diluidos 1:50.

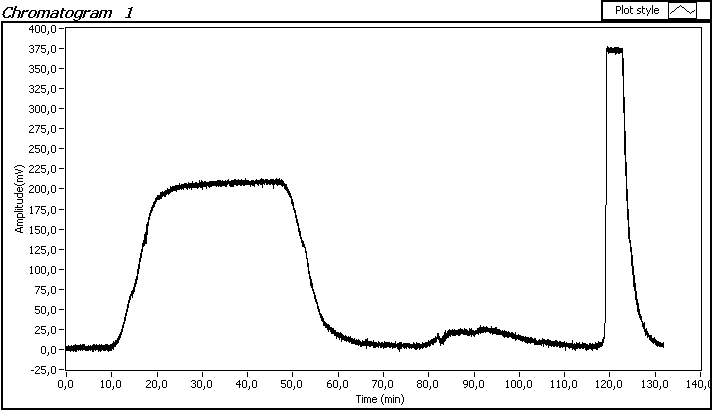
Al fusionar esplenocitos de ratón con células de mieloma, todos los hibridomas producidos pueden secretar AcM contra todo el repertorio que constituye la respuesta inmune del ratón (Machado, 2017); por tanto, la población de hibridomas obtenida tras la fusión fue heterogénea. En el presente trabajo, como consecuencia de la fusión celular, de 960 pozos sembrados, se observaron 361 pozos con crecimiento de las células fusionadas, para una eficiencia de fusión del 37,6%. Los porcentajes de eficiencia de fusión entre 35 y 60% se consideran satisfactorios (Amin et al., 2015).

El cribado ELISA inicial de los sobrenadantes del cultivo de hibridoma encontró 264 pocillos que reaccionaron solamente con P62-BSA, y de ellos 9 que reaccionaron con el fragmento de IgT recombinante y con la IgT nativa. Un ensayo ELISA posterior confirmó 8 pocillos que reaccionaron con los tres antígenos y ninguno reconoció la IgM, por lo que no se evidenció reactividad cruzada con este isotipo de inmunoglobulina. Estos pocillos fueron clonados y se volvieron a analizar mediante ELISA, hasta asegurar la monoclonalidad cuando todos fueran positivos al ensayo. El método de dilución limitante aplicado para el clonaje y el análisis microscópico del crecimiento celular, buscando los pocillos que contenían una sola colonia del hibridoma de interés, fueron las herramientas utilizadas para lograr la monoclonalidad. Está descrito que algunos hibridomas pierden su capacidad de producir anticuerpos o sus funciones básicas para la viabilidad celular, y pueden ser más eficientes metabólicamente y dominar el cultivo (Trejos y Castaño, 2012). Para evitar la multiplicación de estos híbridos no secretores, se realizó la clonación por dilución limitante inmediatamente después de evaluar los sobrenadantes de los hibridomas positivos. Después del clonaje, el hibridoma designado 4G9/1 se seleccionó como el clon secretor único que reaccionó fuerte y establemente con el P62-BSA, con el fragmento de IgT recombinante y con la IgT nativa, y no tuvo reactividad cruzada con la IgM.

Estos resultados demostraron que el AcM secretado por el hibridoma 4G9/1 reconoció el epitopo correspondiente a la IgT de tilapia del Nilo en condiciones nativas, igualmente en su forma recombinante. Esto sugiere que la pérdida de la estructura tridimensional de los péptidos, que puede ocurrir en el contexto de la proteína y es la principal desventaja de la inmunización con péptidos sintéticos (Velázquez et al., 2021), no afectó la competencia del AcM para reconocer la IgT en su forma nativa. Además, como no se evidenció reactividad cruzada entre el AcM anti-IgT generado y la IgM de la tilapia del Nilo, se asume que este AcM puede discriminar entre IgT e IgM y podría ser un recurso útil para estudios diferenciales entre ambos isotipos de inmunoglobulina en esta especie de tilapia.

La clase y subclase de la inmunoglobulina producida por la línea celular de hibridoma 4G9/1 se determinó usando un kit de isotipaje de inmunoglobulina de ratón mediante ELISA, que reveló que el AcM es del isotipo IgG2b.

Una vez que se aisló el clon de hibridoma, la producción de AcM en ascitis de ratón fue simple, eficiente y reproducible y esa es la principal ventaja asociada a este proceso *in vivo* (Parray et al., 2020). En este trabajo, el hibridoma se incluyó en una producción y purificación de AcM a mayor escala para satisfacer las demandas de los próximos estudios inmunológicos que se realizarán en la tilapia del Nilo. El AcM generado se purificó a partir de ascitis de ratón mediante cromatografía de afinidad a proteína A, uno de los sistemas de purificación por afinidad más empleados. El eluato se obtuvo con 10 mg de IgG total (1,9 mg de IgG/ml de matriz de Proteína A). En el cromatograma se observó un pico de elución correspondiente a una fracción de alta pureza del AcM (Fig. 3A). La absorbancia de la fracción no absorbida reveló que la clarificación de la ascitis, su filtración a través de lana de vidrio de 0,45 µm y la posterior precipitación con sulfato de amonio fueron pasos que contribuyeron a la alta pureza del AcM eluido.

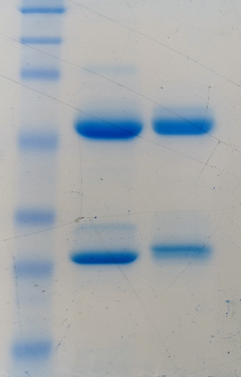


**NB**

**E**

**A)**

**B)**



**SMW 4G9/1 CBSSIL-2**

50 kDa

25 kDa

**Figura 3. (A)** Cromatograma de purificación por afinidad a proteína A del anticuerpo monoclonal anti- IgT de tilapia. NB: proteínas que no se adhieren a la matriz. E: elución del anticuerpo monoclonal a pH 3,0. **(B)** Electroforesis en un gel desnaturalizante de poliacrilamida al 12,5% con dodecilsulfato de sodio al 2%. SMW: Estándar de peso molecular de rango amplio (Biorad). 4G9/1: anticuerpo monoclonal anti- IgT purificado por cromatografía de afinidad a proteína A. CBSSIL-2: anticuerpo monoclonal anti-interleucina2 (control).

La purificación del AcM obtenido se evaluó mediante la SDS-PAGE que se muestra en la Figura 3B. Las cadenas pesada y ligera fueron claramente visibles a 50 y 25 kDa en el carril correspondiente al AcM 4G9/1, lo que indica la purificación de una molécula de anticuerpo. El tercer carril del gel mostró el anticuerpo usado como control con el mismo isotipo del AcM purificado y exhibió un perfil idéntico de cadenas pesadas y ligeras de IgG.

Según el análisis SDS-PAGE, el AcM 4G9/1 se obtuvo con una pureza superior al 95%, resultado similar al obtenido por Pérez-Bernal et al. (2021) en la purificación de AcM generados contra el péptido antimicrobiano Oreoch-2, donde también se aplicó la precipitación con sulfato de amonio de la ascitis clarificada. Este es uno de los pasos más importantes para mejorar el procedimiento de purificación, ya que los anticuerpos pierden su solubilidad en la ascitis a través de un proceso de salado y los contaminantes, como la albúmina y la transferrina, permanecen en la fracción soluble y se reduce su interacción con la matriz de proteína A que se emplea en la purificación. El sulfato de amonio es especialmente útil como precipitante porque es altamente soluble, estabiliza la estructura de la proteína, tiene una baja densidad, está fácilmente disponible y es relativamente económico.

1. **Conclusiones**
2. Este trabajo informa la generación por vez primera de un AcM que reconoce específicamente las formas recombinante y nativa de la IgT de la tilapia del Nilo.
3. El AcM generado no presenta reactividad cruzada con la IgM, lo que significa que es capaz de discriminar entre los isotipos IgM e IgT.
4. Este anticuerpo fue purificado exitosamente y podrá aplicarse en la evaluación de los efectos protectores de las vacunas contra patógenos que afectan el cultivo de la tilapia.
5. **REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

Amin, N., Reyes, N., Camacho, F., Otero, O., Cuello, M., y otros. (2015). Generation of a murine monoclonal antibody to capsular polysaccharide Vi from *Salmonella Typhi*. *VacciMonitor, 24*, 57-63.

Flajnik, M. (2018). A cold-blooded view of adaptive immunity. *Nature Reviews Immunology, 18*, 438–453.

Fu, Q., Wei, Z., Chen, Y., Xie, J., Zhang, X., y otros. (2021). Development of monoclonal antibody against IgT of a perciform fish, large yellow croaker (*Larimichthys crocea*) and characterization of IgT + B cells. *Developmental and Comparative Immunology, 119*, 104027.

Holzlöhner, P., Hanack, K. (2017). Generation of murine monoclonal antibodies by hybridoma technology. *Journal of Visualized Experiments, 119*, e54832.

Jirapongpairoj, W., Hirono, I., Kondo, H. (2017). Development and evaluation of polyclonal antisera for detection of the IgM heavy chain of multiple fish species. *Journal of Immunological Methods, 449*, 71–75.

Kohler, G., Milstein, C. (1975). Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature, 256*, 495–497.

Machado, Y. (2017). Characterization of functional and specific monoclonal antibodies against ADAM-17, Memory to qualify for the Degree of Doctor, Complutense University of Madrid, pp.85.

Mohanty, S., Makesh, M., Rajendran, K., Suresh Babu, P., Anand, D., y otros. (2020). Production and characterization of monoclonal antibodies against immunoglobulins of *Cirrhinus mrigala* (Hamilton 1822). *Indian Journal of Fisheries, 67*, 55-61.

Parray, H.A., Shukla, S., Samal, S., Shrivastava, T., Ahmed, S., y otros. (2020). Hybridoma technology a versatile method for isolation of monoclonal antibodies, its applicability across species, limitations, advancement and future perspectives. *International Immunopharmacology, 85*, 106639.

Pérez-Bernal, M., Valdivia, O., Blanco, R., Pérez, J., Domínguez, A., y otros. (2021). Murine monoclonal antibodies against the antimicrobial peptide Oreoch-2 from tilapia (*Oreochromis niloticus*). *International Journal of Scientific Research in Biological Sciences, 8*, 32-35.

Quiroz, J., Tsao, Y.S. (2016). Statistical analysis of data from limiting dilution cloning to assess monoclonality in generating manufacturing cell lines*. Biotechnology Progress, 32*, 1061–1068.

Trejos, J., Castaño, J. (2012). Production of monoclonal antibodies against cysteine protease 5 of *Entamoeba histolytica*. *Revista MVZ Córdoba, 17*, 3014-3023.

Velázquez, J., Rodríguez, A., Aragón, H., Haidar, A., González, M., y otros. (2021). Monoclonal antibody against Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) IgM heavy chain: A valuable tool for detection and quantification of IgM and IgM+ cells. *Fish and Shellfish Immunology, 110*, 44–54.

Xu, Z., Parra, D., Gómez, D., Salinas, I., Zhang, Y.A., y otros. (2013). Teleost skin, an ancient mucosal surface that elicits gut-like immune responses. *Proceedings of the National Academy of Sciences, 110*, 13097-13102.