

ANTICUERPOS DE CADENA ÚNICA DE ALPACA PARA LA DETECCIÓN DE ANTÍGENOS DE *Fasciola hepatica*

Teresa Barreto^{1,a}, Yenisey Alfonso^{1,b}, Pierre Lafaye^{2,c}, María del Pilar García Lazaro^{1,d}, L. Agueda Perez^{1,e}, Patricia Herrera-Velit^{1,f}, Jose R. Espinoza^{1,g}

RESUMEN

Objetivo. Producir anticuerpos recombinantes de cadena única de alpaca que se unan con alta afinidad y especificidad al antígeno excretado-secretado (ES) de *Fasciola hepatica* para el desarrollo de tecnologías nuevas de diagnóstico de fascioliasis humana y animal. **Materiales y métodos.** Se ha construido una genoteca de cADN de los dominios variables de anticuerpos de cadena única pesada, conocidos como VHH, a partir de células mononucleares de sangre periférica de una alpaca inmunizada con el antígeno ES de *F. hepatica*. La genoteca fue tamizada con el antígeno ES por despliegue diferencial de fagos (*phage display*), seleccionando diez VHH que se unen específicamente a ES. El VHH anti ES fue clonado en un vector de expresión, la proteína recombinante (VHH-ES1) de 15,3 kDa fue producida por fermentación en *E. coli* y purificada a homogeneidad por cromatografía de afinidad. La unión del VHH-ES1 al antígeno ES fue evaluada por ELISA usando VHH-ES1 como anticuerpo de captura, antisuero policlonal anti-ES de conejo y conjugado anti IgG de conejo con peroxidasa de rábano. **Resultados.** Se ha identificado y producido un VHH-ES1 recombinante que se une al antígeno ES (VHH-ES1) que correspondía a un anticuerpo de la subclase IgG2 de bisagra larga. La unión del anticuerpo VHH-ES1 al antígeno muestra linealidad respecto a la concentración de ES en el rango de 50-5000 ng/mL y el valor límite de detección del antígeno está en el rango de 30-170 ng/mL de ES ($R^2=0,99$). **Conclusión.** El VHH-ES1 se une con afinidad y especificidad al antígeno ES de *F. hepatica* y es un anticuerpo promisorio a evaluar para el desarrollo de nuevas tecnologías de diagnóstico de fascioliasis.

Palabras clave: Anticuerpos de Dominio Único; Fascioliasis; Anticuerpos; Camélidos del Nuevo Mundo; Perú (fuente DeCS BIREME).

SINGLE-CHAIN ANTIBODIES FROM ALPACA FOR THE DETECTION OF *Fasciola hepatica* ANTIGENS

ABSTRACT

Objectives. To produce recombinant single-chain antibodies from alpaca that will bind to the excreted-secreted (ES) *Fasciola hepatica* antigen with high affinity and specificity, so as to develop new diagnostic technologies of human and animal fascioliasis. **Materials and Methods.** A gene bank of DNA of the variable dominions of heavy single-chain antibodies (VHH) has been created, based on mononuclear cells of peripheral blood of an alpaca immunized with the ES antigen of *F. hepatica*. The gene bank was screened with the ES antigen by *differential phage display*, selecting ten VHH that bind specifically to ES. The anti-ES VHH was cloned in an expression vector, the recombinant protein (VHH-ES1) of 15.3 kDa was produced by fermentation in *E. coli* and purified to homogeneity by affinity chromatography. The binding of VHH-ES1 to the ES antigen was evaluated by ELISA using VHH-ES1 as capture antibody, policlonal anti-ES serum of rabbit and conjugated rabbit anti IgG with radish peroxidase. **Results.** A VHH that binds to the ES antigen (VHH-ES1) has been identified through differential phage display and produced by fermentation in *E. coli*; this corresponds to an antibody of the long-hinge IgG2 subclass. The binding of the VHH-ES1 antibody to the antigen shows linearity with respect to the concentration of ES in the 50-5,000 ng/mL range and the limit of detection value of the antigen is in the 30-170 ng/mL range of ES ($R^2=0,99$). **Conclusions.** The VHH-ES1 binds with affinity and specificity to the ES antigen of *F. hepatica* and is a promissory antibody to be assessed for the development of new fascioliasis diagnostic technologies.

Keywords: Single-Domain Antibodies; Fascioliasis; Antibodies; Camelids, New World; Peru (source MeSH NLM).

¹ Unidad de Biotecnología Molecular, Laboratorios de Investigación y Desarrollo, Universidad Peruana Cayetano Heredia. Lima, Perú.

² Plateforme d'Ingénierie des Anticorps, Institut Pasteur. Paris, Francia.

^a Bióloga, magister en Bioquímica; ^b bioquímica, doctor en Ciencias; ^c farmacéutico, PhD en Bioquímica; ^d bióloga; ^e bióloga; ^f bióloga, PhD en Inmunología; ^g biólogo, PhD en Genética molecular

Recibido: 04/09/2018 Aprobado: 28/11/2018 En línea: 21/12/2018

Citar como: Barreto T, Alfonso Y, Lafaye P, García MP, Perez LA, Herrera-Velit P, Espinoza JR. Anticuerpos de cadena única de alpaca para la detección de antígenos de *Fasciola hepatica*. Rev Peru Med Exp Salud Publica. 2018;35(4):573-80. doi:10.17843/rpmesp.2018.354.3101

INTRODUCCIÓN

A nivel mundial, se estima que existen entre 5-17 millones de personas con fascioliasis; la infección es endémica en las zonas rurales de países como Perú, Bolivia, Ecuador, Irán, Georgia, Vietnam, Egipto, entre otros ⁽¹⁾; donde, debido a las condiciones inadecuadas de provisión de agua, salubridad, educación y pobreza, el parásito no es contenido en su ciclo natural en animales herbívoros, logrando infectar a los humanos ⁽²⁾.

A pesar que la fascioliasis es un problema de salud pública y de sanidad animal ⁽³⁾, las innovaciones de nuevos agentes para el control y tratamiento de la infección son limitadas, lo cual contribuye a que la fascioliasis sea una enfermedad desatendida ⁽²⁾. El desarrollo de nuevas tecnologías de diagnóstico de la fascioliasis humana y animal requiere de la identificación de nuevas moléculas que se unan a antígenos marcadores de la infección para el desarrollo de tecnologías de diagnóstico sencillas de bajo costo y aplicables en las zonas rurales pobres que son endémicas para la infección.

Hasta el momento las moléculas usadas para la detección de antígenos de *Fasciola hepatica* en diferentes formatos de diagnóstico son los anticuerpos monoclonales de ratón; no obstante, los dominios variables de los anticuerpos de cadena única de la alpaca (VHH) tienen la capacidad de unirse a los antígenos de los patógenos ^(4,5), y son un recurso biotecnológico promisorio para la generación de nuevas moléculas para el diagnóstico de la fascioliasis ⁽⁶⁾; ya que pueden ser clonados y expresados en *E. coli* conservando la capacidad de unirse a los antígenos con alta afinidad, especificidad, estabilidad y rendimiento ⁽⁶⁾, características ventajosas para el desarrollo de tecnologías de diagnóstico de bajo costo y realizables en el campo.

Este estudio tiene como objetivo identificar y producir VHHs que se unan al antígeno de excretado-secretado (ES) de *F. hepatica* con alta afinidad y especificidad para el desarrollo de tecnologías nuevas de diagnóstico de la fascioliasis humana y animal.

MATERIALES Y MÉTODOS

ES-ELISA DE ALPACAS

Se añadió 300 μ l de ES, preparado ⁽⁷⁾, en buffer carbonato-bicarbonato pH 9,6 por pozo de microplacas (IMMULON 4 HBX Dynex Technologies, INC, USA) e incubó a 4 °C toda la noche. Las placas fueron lavadas cinco veces por cinco minutos con PBS-T (PBS 1X, 0,05% Tween 20), bloqueadas con 2% BSA por una hora a 37 °C y lavadas. Se añadió 100 μ L de suero diluido en PBS-T, 2% BSA, y se incubó a 37 °C por una hora. Luego de cinco lavados se añadió 100 μ L de proteína A peroxidasa en PBS-T, 2% BSA, y se incubó una hora a 37 °C. Se añadió 100 μ L de tetrametilbenzidina (TMB. KPL, USA) y se

MENSAJES CLAVE

Motivación para realizar el estudio. La fascioliasis es una zoonosis parasitaria de distribución mundial. La infección humana es un problema de salud pública porque es endémica en las zonas rurales pobres con prevalencias altas en niños. Se requiere de métodos de diagnóstico sensibles y específicos de la infección en el campo.

Principales hallazgos. Se ha identificado un anticuerpo de cadena única recombinante contra excretado-secretado denominado VHH-ES1 que se une al antígeno excretado-secretado del agente infeccioso causante de la fascioliasis y muestra características que ameritan su evaluación y desarrollo como una prueba diagnóstica de la infección humana.

Implicancias. La fascioliasis humana es considerada como una enfermedad desatendida, por lo que recibe muy poca atención en el desarrollo de mejoras en el diagnóstico de esta infección. El anticuerpo de alpaca VHH-ES1 puede ser una herramienta que permita el diagnóstico temprano de la fascioliasis en las zonas endémicas para proveer el tratamiento e implementar medidas de control.

incubó por diez minutos a temperatura ambiente. La reacción fue detenida con 50 μ L de 2M H₂SO₄. Se determinó A₄₅₀ en un lector de ELISA (Biotek, USA). El punto de corte de la prueba es A₄₅₀ = 0,165 ⁽⁷⁾.

INMUNIZACIÓN CON ES DE LA ALPACA

Una alpaca fue inmunizada con 400 μ g de ES con adyuvante completo de Freund en la primera inmunización y refuerzos con 500 μ g y 700 μ g de ES con adyuvante incompleto de Freund (Sigma-Aldrich, USA).

PREPARACIÓN DE ARN TOTAL DE CÉLULAS BLANCAS DE ALPACA

Se colectaron muestras de sangre de la alpaca inmunizada con ES en tubos Vacutainer con EDTA. Las células mononucleares de sangre periférica (PBMC, sigla del inglés *peripheral blood mononuclear cell*) fueron separadas por centrifugación en Histopaque-1077 (Sigma-Aldrich, USA) y lavadas con solución Hanks (Sigma-Aldrich, USA). El conteo celular se realizó en una cámara Neubauer. Las células (3 x 10⁶) fueron suspendidas en 0,75 ml Trizol LS (Invitrogen) y almacenadas a -80 °C. El ARN fue purificado con el kit Qiamp RNA blood, cuantificado por A₂₆₀ en NanoDrop 100 (ThermoScientific), y visualizado en electroforesis en geles 1% agarosa, 0,5 X TBE con bromuro de etidio.

CONSTRUCCIÓN DE LA BIBLIOTECA DE cADN

El ADN fue sintetizado a partir del ARN extraído de PBMC usando oligo(dT) como cebador de poly(A)+ ARN. La biblioteca de cADN de VHH fue construida amplificando los VHH a partir del cADN con el cebador común ALVHHBgl (5'-GAG-CCTAGCCGGCKCAGKTGCAGCTCGTGGAGTCTNGG-3'), específico para el FR1-bisagra corta; ALVHHR1Not

(5'-TTGCGGCCGCTGGGGTCTTCGCTGTGGTGCG-3') y específico para FR1-bisagra larga ALVHHR2Not (5'-TTGCGGCCGCTTGTGGTTTTGGTGTCTTGGG-3')⁽⁶⁾. 1,2 µg de pHEN2 fue digerido con 10 U de *NotI* (Fermentas) a 37 °C y con 10 U de *SfiI* (Fermentas) a 50 °C. El vector pHEN2/*NotI*/*SfiI* y los VHH amplificados fueron purificados en geles de 1,5% agarosa con el kit Qiaquick (Gel Extraction kit, Qiagen). Se digirió 400 ng de los productos VHH amplificado con 20 U de *NotI* y 20 U de *BglI* (Fermentas) a 37 °C O/N y purificado en geles de 1,5% agarosa. La ligación procedió con 80 ng de inserto y 40 ng pHEN2/*NotI*/*SfiI* en 20 µl buffer y 400 U de T4 ADN Ligasa a 16 °C durante 12 horas. Se electroporó *E. coli* TG1 en cubetas de 0,1 cm, pulso de 1,8 kV, 25 µF, 200 Ω, se suspendió en 250 µl 2xYT a 37 °C por una hora y fueron plaqueadas en 2xYTAG (ampicilina 100 µg/ml, 2% Glucosa) a 37 °C toda la noche.

PHAGE DISPLAY DE LA BIBLIOTECA DE ADN VHH ANTI ES

La biblioteca de cADN VHH anti-ES en pHEN2 (1x10⁷ ufc/ml)⁽⁹⁾ fue expandida fermentando 3x10⁸ bacterias en 100 mL de 2YTAG (100 µg/mL ampicilina, 1% glucosa) a 37 °C en agitación hasta alcanzar 1x10¹⁰ bacterias. El cultivo fue infectado con 100 µL de fago helper M13KO7 (New England Biolabs, 1x10¹³ fagos/mL) incubada 30 minutos en reposo y 30 minutos con agitación a 150 rpm a 37 °C; luego el cultivo fue centrifugado a 4500 rpm por diez minutos. El precipitado solubilizado en 100 mL de 2YTA, Kan (50 µg/mL), 1 mM IPTG y fermentó a 30 °C en agitación 150 rpm por 16 horas. El cultivo fue centrifugado a 8000 rpm a 4 °C, el sobrenadante disuelto en 20 mL 20% PEG 2,5M NaCl y mantenido en hielo por dos horas. Luego se centrifugó a 8000 rpm por diez minutos a 4 °C y el precipitado disuelto en 40 mL H₂O, se añadió 8 mL 20% PEG 2,5M NaCl y se centrifugó a 8000 rpm por diez minutos a 4 °C. Los fagos fueron suspendidos en 2 mL 1X PBS, centrifugados a 15 000 rpm por un minuto a 4 °C y el sobrenadante almacenado a 4 °C.

SELECCIÓN DE FAGOS VHH ANTI ES

Se inoculó una colonia en 25 mL de 2YT y se incubó a 150 rpm, 37 °C hasta A₆₀₀ 0,5. Se agregó 40 µg de ES en inmunotubo (Nunc Maxisorp, ThermoFisher Scientific, USA) e incubó a 4 °C por 16 horas. El inmunotubo se lavó seis veces con PBS-T, tres veces con PBS y se bloqueó con 2% leche descremada por 30 minutos a temperatura ambiente. La segunda ronda de selección se usó Odyssey-Licor (1/2 en PBS) y la tercera ronda se utilizó BSA 2%, descartando la solución bloqueadora. Se añadió 1 mL de fagos con agitación durante una hora a temperatura ambiente. La segunda selección se incubó 45 minutos y la tercera por 30 minutos. Los fagos se eluyeron con 1 mL de 100 mM trietanolamina por cinco minutos a temperatura

ambiente y se añadió 0,5 mL 1M Tris-HCl pH 7,5. Se añadió 10 mL de *E. coli* TG1 a 37 °C sin agitación y 30 minutos a 150 rpm. Se hicieron diluciones en 100 µL del cultivo, desde 10⁻¹ hasta 10⁻⁵ y se sembró en 2YTGA. El resto se centrifugó, se disolvió en 2 mL de medio 2YT, se sembró en una placa 24x24 con 2YTGA e incubó a 37 °C toda la noche. Las bacterias fueron cosechadas y colocadas en 5 mL 2YTA. Se colocó 30 µL en 100 mL de medio 2YTAG para proseguir con el rescate y el resto se criopreservó en DMSO al 8% a -80 °C.

EXPRESIÓN DE FAGOS VHH ANTI ES

Se picaron colonias al azar y se sembraron en placas de 96 pozos (Costar 3799) en 200 µL de 2YTAG, y se incubó a 37 °C toda la noche en agitación. Se tomó 3 µl de cada cultivo para sembrar en 200 µL 2YTAG, placas de 96 pozos de 2,2 mL (Abgene AB-0661). Las placas fueron incubadas a 37 °C hasta alcanzar la fase logarítmica. Se realizó la infección con 100 µl de fago helper M13KO7 (1x10¹¹ ufp/mL). Las células centrifugadas a 4500 rpm por cinco minutos y suspendidas en 500 µl de 2YTAK+IPTG 1mM por pozo. Las placas fueron incubadas a 30 °C a 150 rpm toda la noche, centrifugadas a 4500 rpm por cinco minutos a 4 °C y guardadas a 4 °C.

TAMIZAJE DE FAGOS VHH POR ELISA

Se fijaron placas Maxisorp con 100 µL ES (5 µg/mL) en PBS a 4 °C toda la noche. Las placas fueron lavadas cinco veces con PBS-T y bloqueadas con 100 µL de 0,5% gelatina en PBS-T (PBSTG) por una hora a 37 °C. Las placas fueron lavadas y se colocó 20 µL de sobrenadante de cultivo en 80 µL PBSTG, las placas fueron incubadas 1,5 h a 37 °C. Luego de cinco lavados con PBS-T, se adicionó 100 µL del anti MStgG-HRP (Abcam) 1/1000 en PBSTG e incubadas a 37 °C por una hora. Luego de lavados se adicionó 100 µl de anti M13 g8p 1/1000 en PBSTG e incubó a 37 °C por una hora; se volvió a lavar y se añadió 100 µL de TMB e incubó por diez minutos a temperatura ambiente. La reacción fue detenida con 50 µL de 3N H₂SO₄. Se realizó la lectura a A_{450nm} en el espectrofotómetro (Biotek, USA). Los clones reactivos a ES y poco reactivos al antígeno no relacionado fueron amplificados por PCR con los cebadores M13-40 y Myc-TAG y las secuencias fueron analizadas con Clustal W.

EXPRESIÓN DE VHH ANTI ES RECOMBINANTE EN pET22b+

1,2 µg del producto del VHH anti ES amplificada por PCR con cebadores VHH/*NcoI*-*NotI* de los fagémidos P3BC3 y P3BC12 y 2 µg plásmido pET22b+ fueron digeridos con *NcoI* y *NotI* (New England Biolabs) a 37 °C y purificado (Wizard SV PCR purification kit). La ligación procedió

con 200 ng pET22b+, 100 ng de inserto y 400 U de T4 ADN ligasa (NEB) a 16 °C por 17 horas. La reacción fue precipitada con etanol y solubilizada en 5 µL de H₂O. Se electroporó *E. coli* BL21 a 1.8KV en cubeta de 0,1 cm. Las transformantes seleccionadas en placas LB con ampicilina (100 µg/mL) y las colonias positivas cultivadas en 3 mL LB amp a 37 °C toda la noche. Luego centrifugadas a 5000 rpm por diez minutos, el precipitado suspendido en 1 mL de LB amp. 30 µL de cultivo se añadió a 3 mL de LB amp por dos horas a 37 °C e inducida con 1mM IPTG por dos horas a 37 °C. Las células fueron centrifugadas a 7650 g por 30 minutos a 4 °C. El sobrenadante fue analizado por SDS-15% PAGE y los VHH anti ES recombinantes purificados por cromatografía de afinidad Ni-Agarosa.

VHH ANTI-ES ELISA INDIRECTO

500 ng ES en PBS fue fijado en placas Maxisorp a 4 °C toda la noche, luego lavadas cinco veces con PBS-T y bloqueadas con 2% BSA en PBS-T por una hora a 37 °C. Se realizó cinco lavados con PBS-T. Se añadió 1-2 µg de VHH-ES1 en 100 µL PBS 2% BSA e incubadas una hora a 37 °C. Luego de lavados con PBS-T, se añadió 100 µL (1/2000) Penta His HRP conjugate (Qiagen, USA), 2% BSA e incubadas una hora a 37 °C, lavadas con PBS-T. Se añadió 100 µL de TMB e incubó por diez minutos a temperatura ambiente en oscuridad. La reacción fue detenida con 50 µL de 2M H₂SO₄. A₄₅₀ se determinaron en un lector de ELISA (Biotek, USA).

VHH ELISA CAPTURA DE ANTÍGENO ES

Se añadió 100 µL del anticuerpo de captura VHH-ES1 (10 µg/mL) a microplacas Maxisorp e incubó toda la noche a 4 °C en buffer carbonato-bicarbonato. Se realizó cinco lavados con 200 µL del buffer de lavado (PBS-Tween 0,05%) y cinco minutos de incubación en cada lavado. Se añadió 200 µL del buffer de bloqueo (PBS-Tween 0,05%-BSA 5%), e incubó a 37 °C por una hora y se lavó como fue descrito. Se agregó 100 µL de ES en concentraciones de 0, 50, 200, 1000 y 5000 ng/mL por pozo, se incubó a 37 °C por una hora, y se lavó cinco veces con 30 segundos de incubación cada paso. Se añadió 100 µL del anticuerpo de policlonal de conejo anti-ES (10 µg/mL) incubando por una hora a 37 °C y luego se lavó cinco veces con 30 segundos de incubación. Se añadió 100 µL (1/30 000) del conjugado anti-rabbit-HRP (KPL, USA) e incubó a 37 °C por una hora. Se lavó cinco veces con 30 segundos de incubación. Se añadió 100 µL de TMB e incubó cinco minutos en oscuridad, Se agregó 50 µL de 3N H₂SO₄ para detener la reacción. Los valores de A₄₅₀ se estimaron en un lector de ELISA (Biotek, USA).

ANÁLISIS DE DATOS

Microsoft Excel® se usó para analizar datos de ELISA, las secuencias de ADN fueron alineadas con el software Clustal W, analizadas con el programa NCBI/Blast y la estructura secundaria de VHH modelada con SwissModel.

CONSIDERACIONES ÉTICAS

El presente estudio (código 61578) fue aprobado por el Comité Institucional de Ética de la Universidad Peruana Cayetano Heredia. Las alpacas estuvieron bajo seguimiento de un médico veterinario.

RESULTADOS

Los niveles de IgG circulantes anti-ES basales fueron de A₄₅₀ de 0,112 y 0,063 para la alpaca control e inmunizada respectivamente. Niveles crecientes de IgG anti-ES se observaron a partir de la segunda semana posinmunización, elevándose A₄₅₀ 0,455 después del segundo refuerzo. En la alpaca control se mantuvieron negativos durante el periodo de inmunización (Figura 1). Después del segundo refuerzo se colectaron 5x10⁷ células blancas, de las que se obtuvo 41 µg de ARN total (ratio A260/280 de 2); el ARN no presentó degradación y mostraba las bandas características ARN total (Figura 2A). A partir del ARN se sintetizó ADN resultando en productos de amplificación de 400 bp característico de los VHH (Figura 2B).

El ADN de los VHH fue amplificado y clonado en el vector pHEN2 y transformados en *E. coli* TG1 obteniéndose 1,2x10⁶ colonias transformantes, los auto-ligados representaban el 0,06% de los transformantes. Se realizó transformaciones seriadas para escalar la biblioteca de ADN a 5x10⁷ transformantes.

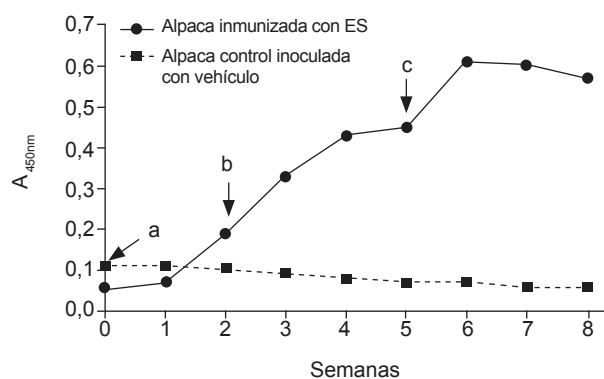


Figura 1. Respuesta inmune humoral de la alpaca inoculada con excretado-secretado (ES).

La producción de anticuerpos de tipo IgG fue monitoreada mediante ES-ELISA. a) Primera inmunización con ES y adyuvante completo de Freund, b) Inoculación del primer refuerzo de ES con adyuvante incompleto de Freund (AIF), c) Inoculación del segundo refuerzo de ES con AIF.

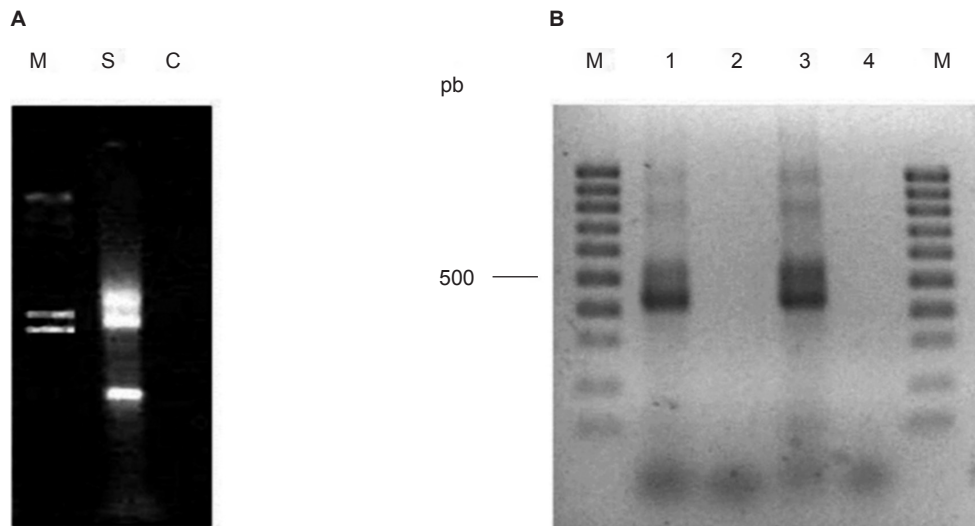


Figura 2. Amplificación de las secuencias de los anticuerpos de cadena única: A. Extracción de ARN total de PBMC, alpaca inmunizada con excretado-secretado. ARN total de muestras de sangre de la alpaca inmunizada (S) y del control (C), Marcador λ /Hind III (M). B. Carriles uno y tres, productos de PCR VHH FR1-Hinge corto (AIVHHBgII, y AIVHH-R1 NotI) y FR1-Hinge largo (AIVHHBgII y AIVHH-R2 NotI). Carriles dos y cuatro controles negativos.

La selección de VHH anti ES de la biblioteca se realizó por despliegue diferencial de fagos con ES (Tabla 1). Los fagos obtenidos en cada ciclo de selección disminuyeron ligeramente en el P2 y luego aumentó en P3 y P4. Completados los ciclos P2, P3 se analizaron 384 clones por ES-ELISA indirecto, seleccionando 37 positivos que unen ES, los cuales fueron nuevamente analizados con ES-ELISA, obteniéndose diez clones positivos que no mostraban reacción cruzada con un antígeno no relacionado: P3AC2, P3AF7, P3AH7, P3AH10, P3BA12, P3BC3, P3BC12, P3BE7, P3BE9, P3BF, los cuales fueron amplificados por PCR y secuenciados, resultando que los diez clones eran VHH idénticos, derivados de un anticuerpo de las subclase IgG2 de bisagra larga y mostraban las regiones FR1, FR2 FR3, CDR1, CDR2 y CDR3 características de los VHHs de camélidos (Figura

3A). La regiones de reconocimiento al epítipo del antígenos CDR1 tiene ocho aminoácidos, CDR2 ocho aminoácidos y CDR3 20 aminoácidos en una estructura secundaria con la correspondiente tres horquillas de las regiones de reconocimiento del antígeno y las regiones andamio FR1, FR2, FR3 (Figura 3B).

El ADN del VHH anti-ES fue subclonado en el vector de expresión pET22b+ y la proteína recombinante VHH-ES1 (PM 15,3 kDa) fue producida en *E. coli* BL21 y purificada por cromatografía de afinidad (Figura 4). Ensayos de ELISA indirecto mostraron que la unión del VHH-ES1 a ES es de alta afinidad detectándose los valores de A_{450} de $0,311 \pm 0,08$ y $0,726 \pm 0,027$ para uno y dos μ g de ES respectivamente, mientras que el control A_{450} de $0,175 \pm 0,08$; y específica ya que era desplazada por competencia con un policlonal anti-ES de conejo (datos no mostrados).

Tabla 1. Ciclos de selección con antígeno excretado-secretado de Anticuerpo de cadena única de la alpaca anti ES por despliegue diferencial de fagos (*phage display*).

Ciclo	Agente bloqueante	Tiempo de incubación con el antígeno	Número de lavados con PBS-T / tiempo	Cantidad de fagos (material de partida)*	Cantidad de fagos (selección específica)
P1	Leche 2%	1 h	10x / 1 min	3×10^{11}	$1,5 \times 10^7$
P2	Licor 1/4	45 min	6x, 2x / 15 min	$1,25 \times 10^{11}$	8×10^6
P3	BSA 2%	30 min	6x, 1x / 1 h	ND	$1,96 \times 10^7$
P4	Gelatina 0,5%	30 min	6x, 1x / 1 h	ND	3×10^9

*Determinado por espectrofotometría $1 \text{ OD}_{268\text{nm}} = 5 \times 10^{12} \text{ (1)}$
 h: hora; min: minuto; ND: no determinado.

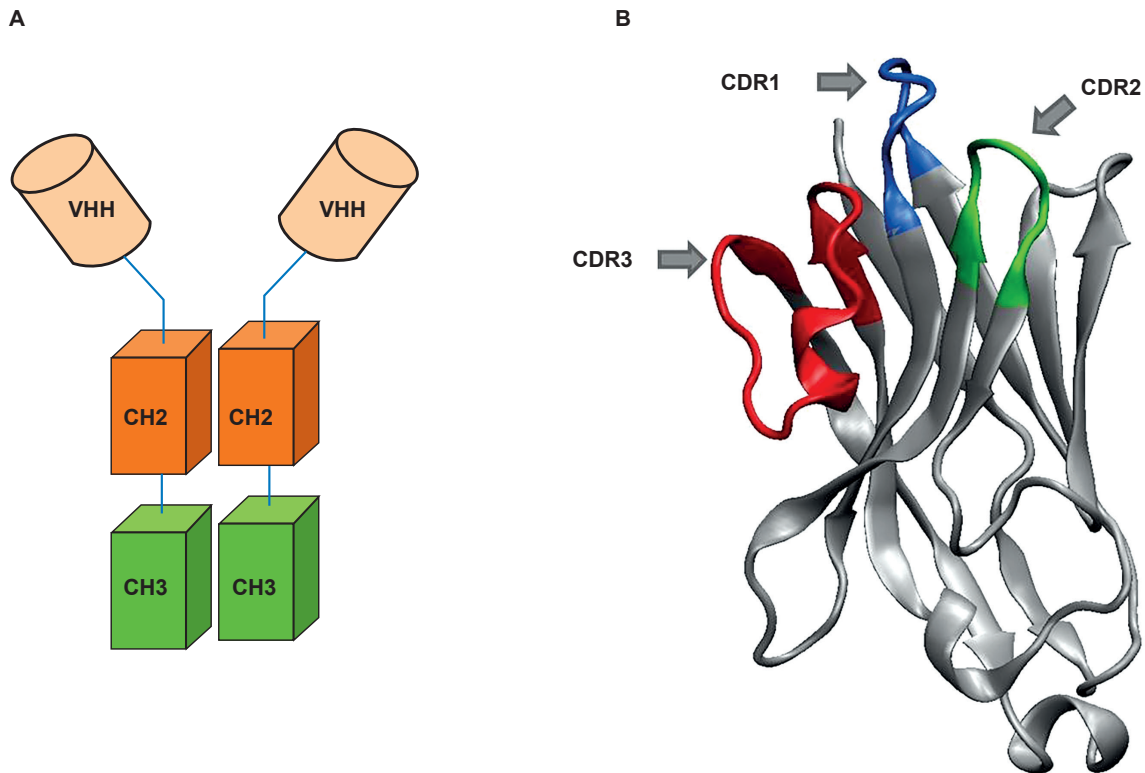


Figura 3. Modelamiento de los dominios variables de los anticuerpos de cadena única de la alpaca (VHH) - antígeno excretado secretado 1 (ES1): A. Esquema de regiones de los anticuerpos de cadena única pesada de la alpaca con la región constante con los dominios CH2, CH3, bisagra y los dominios variables VHH. B. Modelamiento de la proteína recombinante VHH-ES1, mostrando las regiones CDR1, CDR2 y CDR3.

Los ensayos de ELISA de captura se realizaron usando VHH-ES1 como anticuerpo de captura, un policlonal anti-ES de conejo como antígeno secundario y con diferentes concentraciones de ES (0, 50, 200, 1000 y 5000 ng/mL) en PBS y en un grupo de sueros humanos control. La

inmunoreactividad determinada por A_{450} se ajustaba a linealidad en el rango de concentraciones de 50-5000 ng/mL de ES ($R^2=0,99$). El límite de detección de ES en PBS fue de 31,11 ng/mL y en el grupo de sueros el valor fue 171,92 ng/mL (Tabla 2, Figura 5A, Figura 5B).

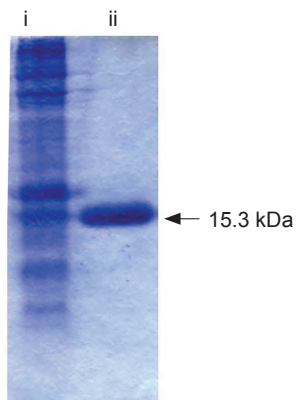


Figura 4. Anticuerpo de cadena única de la alpaca (VHH) - antígeno excretado secretado 1 (ES1) purificado por cromatografía de afinidad en columnas de Ni-agarosa: i) Lisado crudo de *E. coli*; ii) VHH-ES1. SDS- 15% geles de poliacrilamida, tinción azul de Coomassie

Tabla 2. Dominios variables de los anticuerpos de cadena única mediante ELISA de captura del antígeno excretado-secretado en PBS y grupo de sueros.

Antígeno excretado-secretado 1 (ng/ml)	PBS *OD ₄₅₀ (DE)	Grupo de sueros *OD ₄₅₀ (DE)
0	0,077 (0,001)	0,106 (0,009)
50	0,079 (0,004)	0,122 (0,008)
200	0,105 (0,001)	0,139 (0,023)
1000	0,217 (0,018)	0,164 (0,005)
5000	0,828 (0,018)	0,306 (0,018)

*Valor promedio de absorbancia determinado por espectrofotometría a 450 nm (OD₄₅₀)
 DE: desviación estándar
 PBS: Tampón fosfato salino

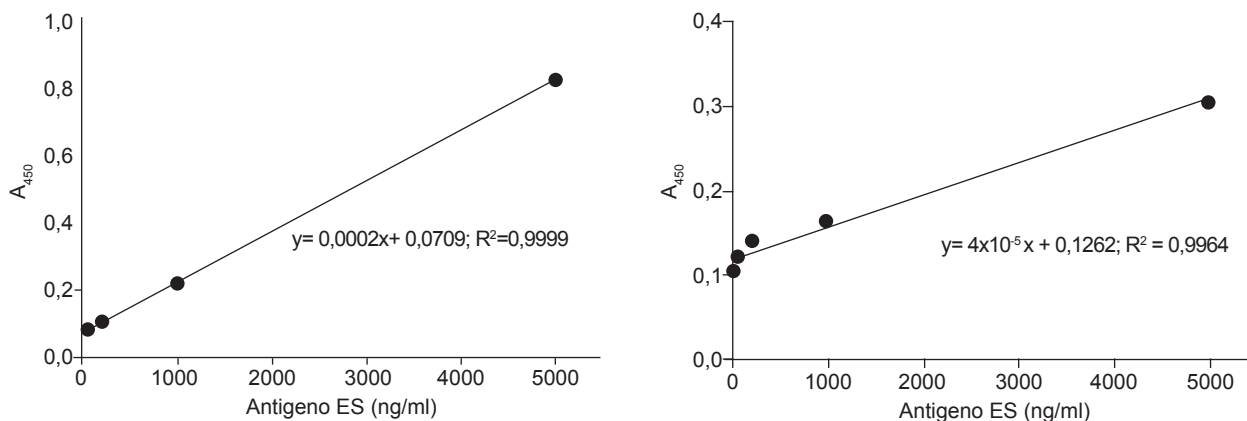


Figura 5. Correlación lineal de los valores de A_{450} y la concentración del antígeno excretado-secretado, medido por ELISA de captura con los dominios variables de los anticuerpos de cadena única de la alpaca (VHH) y antígeno excretado-secretado 1 (ES1): A) ES en PBS, B) ES en un grupo de sueros. Los valores experimentales fueron ajustados por regresión lineal ($R^2=0,99$).

DISCUSIÓN

Con el objetivo de contar con nuevas moléculas para el desarrollo de pruebas de diagnóstico de fascioliasis usando anticuerpos de cadena única de alpacas, se han sintetizado genotecas de cADN de VHH (1×10^7 clones) para seleccionar VHH que se unen específicamente al antígeno ES de *F. hepatica* por despliegue diferencial de fagos. Esta estrategia se ha aplicado en otros agentes infecciosos^(10,11,12). La genoteca de cADN de VHH tiene una alta representación de los anticuerpos de cadena única de los grupos IgG2 e IgG3 (5×10^7 clones) derivados del ARN de células blancas de una alpaca inmunizada con ES. Sin embargo, el tamizaje por despliegue diferencial de fagos con ES rescató 10 VHH de secuencias idénticas de la clase de anticuerpos IgG2 de bisagra larga. Lo que sugiere que el VHH reconoce un epítipo de una proteína antigénica componente de ES. La estructura secundaria modelada de la secuencia VHH-ES1 (Figura 3) revela que tiene un alto grado de homología con los VHH de alpaca⁽¹³⁾.

El principal hallazgo del estudio es el anticuerpo VHH-ES1 que se une al antígeno ES con alta afinidad y especificidad. Los resultados del ELISA indirecto muestran que VHH-ES1 se une al antígeno en relación lineal con la concentración de ES. Ensayos de ELISA de captura con VHH-ES1 muestra que los valores de límite de detección están en el rango de 30-170 ng/ml de ES, lo que sugiere su uso potencial en la detección del antígeno en muestras biológicas. El ELISA de captura es el formato idóneo para el desarrollo y validación de tecnologías de detección de coproantígenos o antígenos circulantes en pacientes infectados con *F. hepatica* como se aplican los monoclonales ES70⁽¹⁴⁾ y MM3⁽¹⁵⁾ en la detección de coproantígenos para el diagnóstico de fascioliasis.

Los valores límites de detección de VHH-ES1 son menores a los reportados para los mAbs anti-ES ES70^(14,16) y

MM3^(15,16) (5-15 ng/mL)^(14,15), que podría considerarse una limitación a ser resuelta en el desarrollo de la tecnología de diagnóstico. Hay que tener en cuenta que ES es un antígeno de composición compleja que tiene al menos 60 diferentes polipéptidos^(18,19) del parásito y del hospedero que perturban los ensayos de la determinación de la sensibilidad y especificidad de unión al antígeno; no se conoce el antígeno al que se une VHH-ES1, pero se puede identificar con técnicas de purificación por afinidad y secuenciamiento del antígeno purificado.

Los VHH son más estables y tienen menores costos de producción que los mAbs⁽¹⁷⁾, constituyen una alternativa ventajosa para el desarrollo de métodos de diagnóstico⁽⁶⁾ de aplicación en zonas endémicas de fascioliasis, ya que las técnicas de diagnóstico que usan mAbs son costosas y tienen baja estabilidad por ser muy lábiles⁽¹⁷⁾.

En conclusión, se ha generado un fragmento recombinante de un anticuerpo de cadena única de alpaca IgG2 denominado VHH-ES1, que es una proteína recombinante de 15,3 kDa que se une con alta afinidad al antígeno ES de *F. hepatica*. VHH-ES1 es una nueva biomolécula promisoriosa para el desarrollo de nuevos métodos de diagnóstico de fascioliasis basado en la detección de coproantígenos o antígenos circulantes en humanos y animales infectados con *F. hepatica*.

Agradecimientos: Dr. J. Rodriguez, E. Gushiken por el modelamiento del VHH-ES1. El vector pHEN2 fue donado por el Dr. D. Baty y Dr. D. Kastelic (Protein Biotechnology Group, Babraham Bioscience Technologies, UK). TB realizó una estadía en el Instituto Pasteur, Francia bajo la supervisión del Dr. P. Lafaye.

Contribuciones de los autores: JRE ha concebido el presente estudio, ha participado en el diseño experimental, el análisis, la interpretación de datos, ha preparado el manuscrito, realizado la revisión crítica del manuscrito y la aprobación de su versión final.

TB, YA, MPGL, PL, LAP realizaron los experimentos, interpretaron los resultados, participaron en la revisión crítica del manuscrito y aprobación de la versión final. PHV ha realizado la revisión crítica de resultados, participado en la redacción del manuscrito y aprobación de la versión final.

Fuentes de financiamiento: El trabajo fue financiado por el Programa Nacional de Innovación para la Competitividad y Productividad (Innóvate Perú), contrato 123-FINCYT-IA-2013,

«Generación de anticuerpos de dominio-único de alpacas para el diagnóstico y tratamiento de enfermedades hepáticas». YA recibió financiamiento por el proyecto Postdoctoral FONDECYT «Generación de Anticuerpos de dominio único de alpacas para el diagnóstico y tratamiento de enfermedades hepáticas», EF-015-2013

Conflictos de interés: Los autores declaran no tener conflicto de interés en la publicación del presente trabajo.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Mas Coma S, Valero MA, Bargues MD. Fasciola, lymnaeids and human fascioliasis, with a global overview on disease transmission, epidemiology, evolutionary genetics, molecular epidemiology and control. *Adv Parasitol.* 2009;69:41-146. doi: 10.1016/S0065-308X(09)69002-3.
- Hotez PJ, Bottazzi ME, Franco-Paredes C, Ault SK, Periago MR. The Neglected Tropical Diseases of Latin America and the Caribbean: A Review of Disease Burden and Distribution and a Roadmap for Control and Elimination. *PLoS Negl Trop Dis.* 2008;2(9):e300. doi: 10.1371/journal.pntd.0000300.
- Espinoza JR, Terashima A, Herrera-Veliz P, Marcos LA. Fasciolosis humana y animal en el Perú: impacto en la economía de las zonas endémicas. *Rev Peru Med Exp Salud Publica.* 2010;27(4):604-12. doi: http://dx.doi.org/10.17843/rpmesp.2010.274.1535.
- Hamers-Casterman C, Atarhouch T, Muyldermans S, Robinson G, Hammers C, Bajyana E, et al. Naturally occurring antibodies devoid of light chains. *Nature.* 1993;363(6428):446-8.
- Nguyen VK, Desmyter A, Muyldermans S. Functional heavy-chain antibodies in Camelidae. *Adv Immunol.* 2001;79:261-96.
- Muyldermans S. Nanobodies: natural single-domain antibodies. *Annu Rev Biochem.* 2013;82:775-97. doi: 10.1146/annurev-biochem-063011-092449.
- Neyra V, Chavarry, Espinoza JR. Cysteine proteinases Fas1 and Fas2 are diagnostic markers for *Fasciola hepatica* infection in alpacas (*Lama pacos*). *Vet Parasitol.* 2002;105(1):21-32.
- Maass DR, Sepulveda J, Pernthaner A, Shoemaker CB. Alpaca (*Lama pacos*) as a convenient source of recombinant camelid heavy chain antibodies (VHHs). *J Immunol Methods.* 2007;324(1-2):13-25. doi: 10.1016/j.jim.2007.04.008.
- Kastelic D, Frkovic-Grazio S, Baty D, Truan G, Komel R, Pompon D. A single-step procedure of recombinant library construction for the selection of efficiently produced llama VH binders directed against cancer markers. *J Immunol Methods.* 2009;350(1-2):54-62. doi: 10.1016/j.jim.2009.08.016.
- Deckers N, Saerens D, Kanobana K, Conrath K, Victor B, Wernery U et al. Nanobodies, a promising tool for species-specific diagnosis of *Taenia solium* cysticercosis. *International journal for parasitology.* 2009;39(5):625-33.
- Sallam MA. Anti-Schistosoma single-domain antibody-nanoparticles conjugate: A novel tool for diagnostic and therapeutic applications [Tesis Doctoral]. El Cairo: School of Sciences and Engineering, The American University in Cairo; 2012.
- Fernandes CF, Pereira SDS, Luiz MB, Zuliani JP, Furtado GP, Stabeli RG. Camelid Single-Domain Antibodies as an Alternative to Overcome Challenges Related to the Prevention, Detection, and Control of Neglected Tropical Diseases. *Front Immunol.* 2017;8:653. doi: 10.3389/fimmu.2017.00653.
- Vu KB, Ghahroudi MA, Wyns L, Muyldermans S. Comparison of llama VH sequences from conventional and heavy chain antibodies. *Mol Immunol.* 1997;34(16-17):1121-31.
- Espino AM, Finlay CM. Sandwich enzyme-linked immunosorbent assay for detection of excretory secretory antigens in humans with fascioliasis. *J Clin Microbiol.* 1994;32(1):190-3.
- Ubeira FM, Muiño L, Valero MA, Periago MV, Pérez-Crespo I, Mezo M, et al. MM3-ELISA detection of *Fasciola hepatica* coproantigens in preserved human stool samples. *Am J Trop Med Hyg.* 2009;81(1):156-62.
- Mas-Coma S, Bargues MD, Valero MA. Diagnosis of human fascioliasis by stool and blood techniques: update for the present global scenario. *Parasitology.* 2014;141(14):1918-46. doi: 10.1017/S0031182014000869.
- Van der Linden RHJ, Frenken LGJ, De Geus B, Harmsen MM, Ruuls RC, Stok W, et al. Comparison of physical chemical properties of llama VHH antibody fragments and mouse monoclonal antibodies. *Biochim Biophys Acta.* 1999;1431(1):37-46.
- Jefferies JR, Campbell AM, van Rossum AJ, Barrett J, Brophy PM. Proteomic analysis of *Fasciola hepatica* excretory-secretory products. *Proteomics.* 2001;1(9):1128-32.
- Cordova M, Herrera P, Guerra H, Espinoza JR. *Fasciola hepatica* cysteine proteinases: immunodominant antigens in human fasciolosis. *Am J Trop Med Hyg.* 1997;57(6):660-6.

Correspondencia: Dr. Jose R. Espinoza
Laboratorios de Investigación y Desarrollo,
Universidad Peruana Cayetano Heredia.
Dirección: Av. Honorio Delgado 430, San
Martín de Porres, Lima 31, Perú.
Email: jose.espinoza@upch.pe