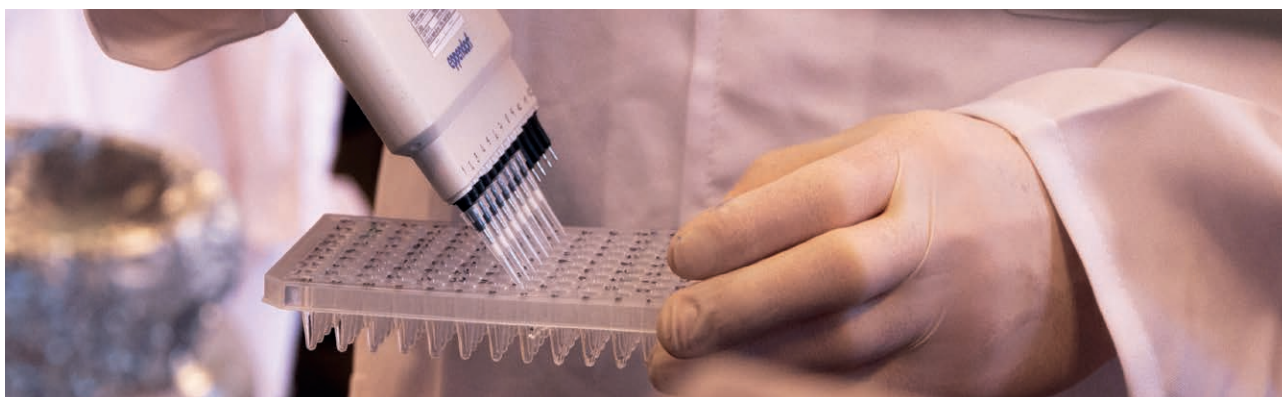


Anticuerpos monoclonales: qué son y cómo cambiaron el rumbo de la inmunología

Descubiertos hace más de 40 años, aún hoy siguen siendo uno de los hallazgos científicos más relevantes. Con aplicación en la clínica y el diagnóstico, así como en la investigación y el desarrollo, los anticuerpos monoclonales son un instrumento tecnológico para el trabajo en especies de interés agropecuario, tanto en salud animal como en protección vegetal. Utilizados en test diagnósticos y proyectos de investigación para tuberculosis bovina, fiebre aftosa, rabia y hasta el Mal de Río Cuarto en maíz, especialistas del INTA hacen un repaso por los principales desarrollos del Instituto que los utilizan.



POR CECILIE ESPERBENT

Con el objetivo de mejorar las herramientas disponibles para la detección y tratamiento de enfermedades, entre 1973 y 1975 el argentino César Milstein junto con el alemán George Köhler –quien era su becario posdoctoral en ese momento–, lograron desarrollar un sistema para producir en el laboratorio anticuerpos puros capaces de detectar y unirse específicamente a regiones discretas –denominadas epitopes– dentro de un determinado antígeno. Por este descubrimiento, que transformó la historia de la medicina moderna, ganaron el Premio Nobel de Medicina en 1984. Ahora, Presidencia de la Nación de la Argentina declaró al 2021 como año homenaje al premio Nobel de Medicina doctor César Milstein, en reconocimiento a su “profundo compromiso con la ciencia”.

Si bien los anticuerpos monoclonales (AcM o mAbs, por sus siglas en inglés, que significan ‘monoclonal antibodies’) se utilizan desde hace más de 40 años para el desarrollo de medicamentos innovadores y para el tratamiento y diagnóstico de diversas enfermedades, ahora –por la emergencia de la COVID-19– toman un nuevo impulso debido a que científicos de todo el mundo estudian su uso como terapéuticos contra esa enfermedad.

Sin embargo, el descubrimiento de Milstein y Köhler también es una tecnología muy utilizada en el ámbito agropecuario. De hecho, son utilizados tanto para el diagnóstico de algunas enfermedades de interés veterinario, como la fiebre aftosa, la tuberculosis bovina y la rabia –las dos últimas son, además,

zoonosis–, de interés agropecuario, como el Mal de Río Cuarto en maíz, y hasta para la investigación y el diseño de fármacos de nueva generación.

En términos generales, se sabe que el sistema inmune de los vertebrados superiores es capaz de responder ante la presencia de patógenos o sustancias extrañas al organismo mediante la producción de anticuerpos –proteínas que son capaces de unirse a ellos de forma tal de neutralizarlos o eliminarlos del individuo–. En este sentido, los anticuerpos monoclonales son una alternativa biotecnológica que deriva de este proceso natural.

“Los anticuerpos monoclonales son copias idénticas de un único tipo de anticuerpo producido por un linfocito B”, explicó Oscar Taboga, director del Instituto

de Agrobiotecnología y Biología Molecular (IABIMO) del Centro de Investigación en Ciencias Veterinarias y Agronómicas (CICVyA) del INTA, quien agregó: "Los hibridomas, productores de anticuerpos monoclonales, son copias de células quiméricas creadas en el laboratorio a partir de un clon de un plasmocito productor de un anticuerpo específico, indistinguibles de los anticuerpos que nuestro cuerpo produce de forma natural".

De todos modos, lo que Milstein hacía de manera artesanal, hoy, gracias al uso de la ingeniería genética, los científicos los crean en una fracción de tiempo. "Esas moléculas, producidas en el laboratorio, pueden actuar como anticuerpos 'de diseño' y permiten el desarrollo de diversos fármacos", señaló Taboga quien resaltó que "aparte de ser una herramienta natural de defensa, son un instrumento súper potente para hacer test diagnósticos".

Las aplicaciones pueden ser múltiples y no solo se limitan a detectar enfermedades en animales o en plantas, sino que también se pueden utilizar para identificar transgenes (genes foráneos) en cultivos –por ejemplo–. De hecho, en el Instituto de Biotecnología del INTA funciona el Laboratorio de detección de OGM (organismos genéticamente modificados), un servicio disponible para el sector privado de la producción agropecuaria y de la industria alimenticia a partir del análisis de granos, semillas, alimentos y materias primas. "Con un anticuerpo monoclonal, dirigido contra una enzima en particular, se puede determinar si una planta es transgénica o no", ejemplificó Taboga quien señaló que se pueden utilizar para un sinnúmero de objetivos y aplicaciones.

El laboratorio posee acreditación del Organismo Argentino de Acreditación (OAA). Esto significa que cumple con los requisitos planteados por la normativa internacional IRAM 301 (ISO IEC 17025) en materia de calidad.

**“Los anticuerpos monoclonales son copias idénticas de un único tipo de anticuerpo producido por un linfocito B”
(O. Taboga).**

Desde una perspectiva terapéutica, el uso de los anticuerpos monoclonales es similar al de la terapia con plasma de convalecientes. Sin embargo, mientras el plasma de convaleciente es heterogéneo y contiene una composición muy variable de anticuerpos, en los que unos pueden ser efectivos y otros no, los tratamientos basados en anticuerpos monoclonales constituyen una forma mucho más moderna y depurada, “de-

bido a que están hechos a partir de la selección de aquellos que, por ejemplo, tienen mayor capacidad de neutralizar a un determinado virus, son como una bala teledirigida”, afirmó Taboga.

TUBERCULOSIS BOVINA

En el ámbito veterinario, y gracias al uso de la ingeniería genética, un equipo de investigadores del Instituto de Agro-

Cómo funciona el sistema inmunitario

Conocido como una de las maquinarias biológicas más eficaces que existen, el sistema inmunitario humano está formado por millones de células altamente especializadas en localizar y destruir cualquier patógeno capaz de provocar una infección. Cuando este escudo natural reconoce bacterias, parásitos o virus activa la defensa y comienza una 'batalla' para defender al cuerpo de la enfermedad.

Integrado por un gran ejército, frente a un patógeno el sistema inmunitario despliega una respuesta inmediata y ordenada. Existen dos grandes momentos, en los que intervienen distintos 'soldados'. En la primera línea de respuesta se encuentran los macrófagos, los neutrófilos y las células NK (Natural Killer, por sus siglas en inglés); mientras que en una segunda instancia de respuesta actúan las células dendríticas y los linfocitos B y T.

Los macrófagos son células del sistema inmune innato que se encargan de 'comer' patógenos y degradarlos. Sin embargo, cuando los macrófagos actúan, pero no consiguen vencer al invasor, encienden las alarmas para que se activen los refuerzos. A la par, las células NK, o asesinas naturales, se encargan de localizar y destruir las células infectadas.

Cuando la primera respuesta del sistema inmune no es suficiente, aparecen en acción las células dendríticas que, como los macrófagos, fagocitan y degradan patógenos hasta dejarlos en pedacitos muy pequeños. Esos fragmentos –desperdicios– son los epitopes antigénicos y servirán para que otras células especiales, como los linfocitos T, puedan reconocerlos.

Asimismo, se liberan citoquinas que impulsan la proliferación de estos linfocitos T –viajan hasta llegar al lugar de la infección y destruyen a las células infectadas– y colaboran en la activación de los linfocitos B. Mientras, los linfocitos B se encuentran directamente con los antígenos del patógeno y, si la variante de su receptor coincide con la del patógeno, comienza el proceso para fabricar miles de copias de sí mismo para neutralizar la infección. Estas moléculas son los anticuerpos.

La respuesta inmune se completa con la producción de linfocitos de memoria que detectan la infección pasado mucho tiempo y tienen la capacidad de reiniciar la replicación –clones– para dar una respuesta inmune que neutralice al patógeno otra vez.

Lo destacado de los linfocitos B es que mediante un receptor pueden hacer contacto con infinidad de moléculas, como proteínas, ácidos nucleicos o lípidos, es decir, básicamente con cualquier cosa. Esta característica los hace únicos y le permitió a Milstein avanzar en una investigación que plantó las bases de la inmunología moderna.

Quién fue César Milstein

“César sabía preguntar y escuchaba hasta el final la respuesta, la analizaba y luego daba su punto de vista. Era un sabio generoso”, así lo definió Alberto Roseto, consultor científico sobre producción de anticuerpos monoclonales orientados al diagnóstico y las terapias.

“El alcance de la investigación de Milstein fue fabuloso”, expresó Roseto y agregó: “Gracias a los anticuerpos monoclonales pudimos identificar a fondo una proteína y conocer la estructura de lo normal y de lo patológico, es decir, si era buena o mala”.

“Lo paradigmático de la creación de Milstein fue que nunca antes un descubrimiento básico había pasado tan rápido a la aplicación práctica de la medicina. Sin dudas, fue el puntapié inicial de la biotecnología”, enfatizó Roseto quien añadió: “La invención de la técnica de los hibridomas de Köhler y Milstein fue una de las que más modificó las ciencias biológicas, debido a que los anticuerpos monoclonales sirvieron para el desarrollo de diferentes test aplicados en la práctica médica”.

Roseto arrancó su carrera como pediatra especialista en enfermedades infecciosas en el Hospital Posadas de la Argentina, donde descubrió el rotavirus en América. En la búsqueda por conocer el porqué de las enfermedades emigró a París –Francia– donde se dedicó a la investigación básica. En el Instituto Pasteur, se dedicó al estudio e investigación del rotavirus en los recién nacidos. Su afección por la investigación lo llevó, en 1975, a conocer a Milstein y trabajar con él en el laboratorio de Cambridge –Inglaterra–. Allí, aprendió la técnica de los hibridomas y, gracias a la generosidad de Milstein, fue uno de los primeros en desarrollar anticuerpos monoclonales contra el rotavirus en Francia*.

Entre sus principales logros se encuentra la producción del anticuerpo monoclonal E13 contra el antígeno precoz de Citomegalovirus (CMV), que luego sería utilizado para el diagnóstico de la viremia en las inmunodeficiencias en general. En la actualidad, Roseto es consultor científico sobre la producción de anticuerpos monoclonales orientados al diagnóstico y las terapias.

“Cuando el mundo científico (en 1974) hablaba de clonar un gen, César buscaba gamaglobulinas para replicarlas y que sean siempre las mismas”, recordó Roseto y pronunció: “César fue un adelantado a su época, tenía claro lo que quería y lo buscaba”.

**Extraído de la autobiografía publicada en la revista online “Ciencia e Investigación” de la Asociación Argentina para el Progreso de las Ciencias (AAPC).*

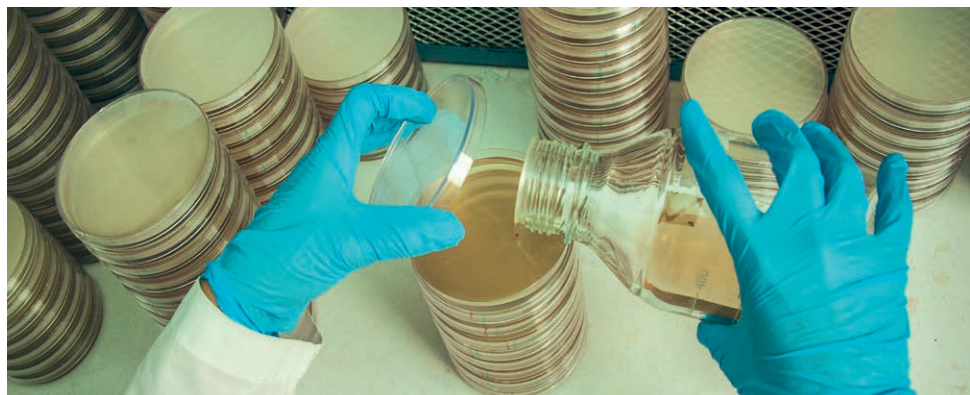
**Fotos históricas que forman parte del archivo personal de Alberto Roseto.*

biotecnología y Biología Molecular (IA-BIMO) del Centro de Investigación en Ciencias Veterinarias y Agronómicas (CICVyA) del INTA, liderado por Fabiana Bigi, se enfocó en la producción de anticuerpos monoclonales para construir un test diagnóstico que detecte tuberculosis y paratuberculosis bovinas basado en la detección y cuantificación *in vitro* del interferón-gamma –IFN- γ – producido por linfocitos-T sensibilizados en respuesta al contacto con antígenos específicos.

El interferón-gamma tiene un importante papel en la inmunidad innata y en la estimulación de la inmunidad adaptativa. Esta citoquina estimula y modula el sistema inmune y colabora en la lucha contra algunas bacterias y, además, promueve la activación de los linfocitos para desarrollar respuestas específicas contra virus u otros patógenos.

En la Argentina, la tuberculosis bovina (TBB) es una enfermedad de alta prevalencia en rodeos ganaderos y en animales silvestres. Como afecta principalmente al ganado bovino, se trata de una enfermedad que puede provocar grandes pérdidas económicas, como resultado del bajo peso de los animales, mala calidad de la leche y el consecuente decomiso en frigoríficos y en mataderos. Además, debido a que el agente causal –la bacteria *Mycobacterium bovis*– se transmite a los seres humanos, constituye un importante problema de salud pública.

“En la actualidad, el diagnóstico de animales infectados se realiza mediante la prueba de la tuberculina o intradermoreacción que es el método oficial aprobado por los organismos internacionales”, expresó Bigi y agregó: “Nuestro objetivo es desarrollar una prueba alternativa que ayude a mejorar el diagnóstico”.



El uso de los anticuerpos monoclonales es múltiple y no solo se limita a detectar enfermedades en animales o en plantas, sino que también se pueden utilizar para identificar transgenes (genes foráneos) en cultivos.

“Esas moléculas, producidas en el laboratorio, pueden actuar como anticuerpos ‘de diseño’ y permiten el desarrollo de diversos fármacos” (O. Taboga).

El test diagnóstico que está desarrollando Bigi con su equipo estará destinado al diagnóstico de ambas enfermedades basado en la detección y cuantificación *in vitro* del interferón gamma –IFN-γ–. “Entre otros aspectos positivos, este desarrollo contribuirá al control de la TBB y PTB con un producto de desarrollo nacional, innovador y de un costo accesible”, puntualizó la investigadora del INTA quien destacó que “este desarrollo local permitirá sustituir la importación de los test utilizados en la actualidad”.

La TBB es una enfermedad endémica y su control es una tarea urgente, permanente y ardua. En la Argentina, el Senasa impulsa el plan nacional de erradicación de la tuberculosis bovina con el objetivo de lograr el mayor número posible de rodeos libres de TBB, mediante un saneamiento exhaustivo de los campos y aspira a un nivel de excelencia internacional en lo que a enfermedades infecciosas respecta.

Además de su utilidad como método diagnóstico, con esta herramienta Bigi y su equipo realizan investigaciones que buscan desentrañar cuáles son los mecanismos de replicación que utiliza la bacteria que provoca la tuberculosis para saber qué genes se pueden seleccionar para atenuar la patogenia. “A futuro, nuestro objetivo es poder hacer una vacuna para colaborar con las campañas de erradicación de la tuberculosis y paratuberculosis bovina”, destacó la investigadora del INTA.

TEST DE ELISA PARA EL DIAGNÓSTICO DE LA RABIA

Más de cuatro décadas después de su hallazgo, el descubrimiento de Milstein aún tiene por delante mucho potencial. De hecho, Alejandra Capozzo, especialista en Inmunología veterinaria aplicada e investigadora del Conicet en el Instituto de Virología e Innovaciones Tecnológicas (IVIT) del INTA, trabaja en el desarrollo de un test ELISA y otro de inmunofluorescencia para detectar la rabia en animales. “Nuestro trabajo se basa en la creación de una proteína –fragmento variable monocatenario (scFv)– para reconocer la glicoproteína del virus rábico”.

Entre las principales ventajas del desarrollo, Capozzo destacó que “se pueden producir en diferentes sistemas recombinantes, incluso en bacterias, por lo que son muy económicos, accesibles y poseen alto rendimiento y pureza”. Gracias

a esta forma de producción, “nuestro objetivo es reemplazar a los monoclonales tradicionales para el diagnóstico de la rabia”, aseguró.

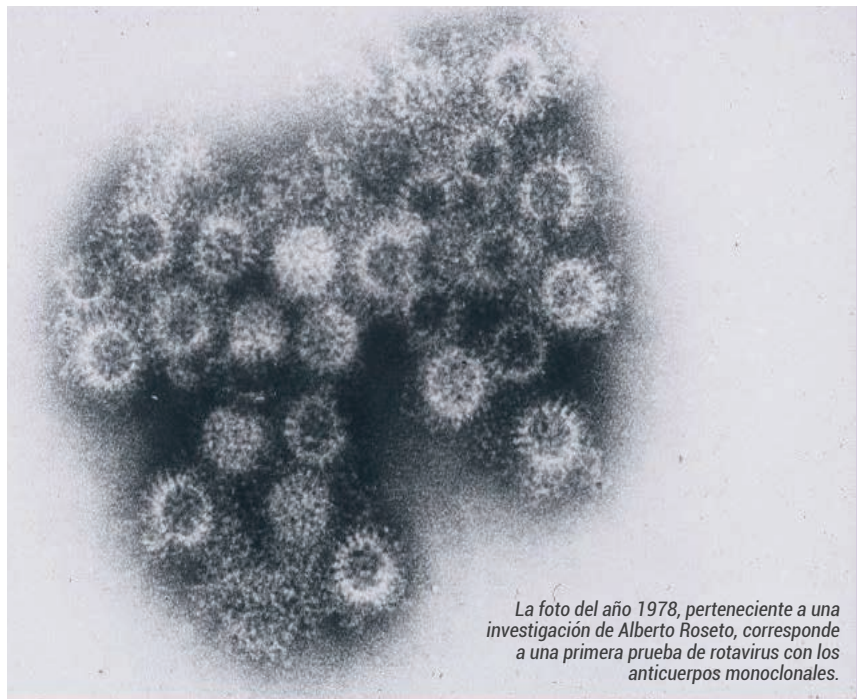
Los svFv pueden reemplazar por completo a los anticuerpos monoclonales tradicionales, se pueden conjugar a fluoróforos o enzimas y usarse, por ejemplo, en inmunofluorescencia y en citometría de flujo, entre otros.

Se trata de un avance tecnológico que mejorará la detección del antígeno rábico en animales. Este invento abarata los costos de producción y los hace más competitivos, en comparación con los test ELISA tradicionales y, además, es una plataforma innovadora.

El invento corresponde a una plataforma para capturar proteínas recombinantes en ELISA. Este desarrollo abre una nueva perspectiva para los ELISA basados en proteínas recombinantes, ya sea que se emplea para un anticuerpo o un antígeno.

“El ELISA para la detección del antígeno rábico que estamos desarrollando utiliza un fragmento variable monocatenario (scFv) derivado de un anticuerpo monoclonal que es producido en bacterias”, señaló Capozzo y agregó: “La proteína scFv conserva la especificidad de la inmunoglobulina original, por lo que es usada como captura y revelador, conjugado a peroxidasa, en un sistema llamado comúnmente, ELISA en sándwich”.

“Este desarrollo abre una nueva perspectiva para los ELISA basados en pro-



La foto del año 1978, perteneciente a una investigación de Alberto Roseto, corresponde a una primera prueba de rotavirus con los anticuerpos monoclonales.

teínas recombinantes. Con este invento se facilitará su producción, a costos competitivos", puntualizó Capozzo.

Test ELISA o "ensayo por inmunoadsorción ligado a enzimas" es una técnica de laboratorio que permite detectar proteínas en una placa que pueden ser antígenos derivados de patógenos, presentes en tejidos o en sangre, o bien anticuerpos que se encuentran en la sangre cuando ya se produjo una reacción inmune a un virus o patógeno en el organismo.

ra, especialista del Instituto de Virología e Innovaciones Tecnológicas del CICVyA del INTA, y agregó: "Mientras que los animales que están vacunados no tienen anticuerpos contra esas proteínas, ya que las vacunas tienen el virus inactivado y por lo tanto no se replica en el animal".

El virus de la fiebre aftosa (VFA o FMDV, según sus siglas en inglés) pertenece al género *Aphthovirus*, dentro de la familia *Picornaviridae*. Todos los virus de esta familia están formados por cápsides proteicas – cubiertas que sirven para proteger el material genético y le dan resistencia – con estructura icosaédrica – poliedros de 20 caras –, en cuyo interior está contenido el material genético. El virus está clasificado en siete serotipos (A, O, C, Asia1, SAT-1, SAT-2, SAT-3), cuya presencia en el mundo varía según la región geográfica. Dentro de cada serotipo existen diferentes cepas y la inmunidad contra una determinada cepa puede no ser eficaz contra cepas de otros serotipos, y aun para cepas dentro del mismo serotipo.



Desde una perspectiva terapéutica, el uso de los anticuerpos monoclonales es similar al de la terapia con plasma de convalecientes.

FIEBRE AFTOSA: USOS EN EL DIAGNÓSTICO Y ESTUDIO DE LA INMUNIDAD

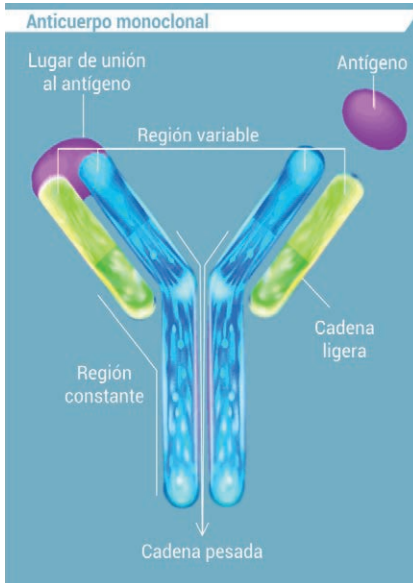
En la actualidad, la Argentina es un país libre de fiebre aftosa reconocido por la Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE, según la sigla en inglés). Sin embargo, las investigaciones vinculadas al desarrollo de vacunas y de test diagnósticos para la detección de diversas cepas o la diferenciación de animales infectados de vacunados, continúa.

En este sentido, un equipo de investigadores de los Institutos de Virología y de Biotecnología del INTA desarrollaron un anticuerpo monoclonal contra una proteína no estructural del virus de la aftosa. Entre otros usos, este monoclonal es un elemento clave dentro de un test diagnóstico capaz de diferenciar animales vacunados de animales infectados.

"Esta estrategia se basa en el hecho de que solo los animales que están infectados desarrollan anticuerpos contra las proteínas no estructurales del virus, las cuales se producen exclusivamente cuando el virus está replicando y es infectivo", expresó Mariano Pérez Filgueira,

"El virus de la aftosa es muy variable, por lo que es importante saber qué cepa está circulando y cuáles se utilizan para diseñar una vacuna", explicó Pérez Filgueira quien coordina el proyecto de Inmunidad y Patogenia en Salud Animal del INTA, integra el Consejo Directivo de la Sociedad Argentina de Virología (SAV) y es el Presidente del XIII Congreso Argentino de Virología 2021.

Asimismo, los anticuerpos monoclonales pueden también servir para diferenciar las diversas cepas del virus que existen e identificar, por ejemplo, las que circulan en el campo. "Gracias a los avances tecnológicos y a la colaboración del doctor José La Torre y su equipo, en el Centro de Virología Animal (CEVAN) del Conicet se pudo construir una colección de más de 80 anticuerpos monoclonales diferentes que sirven para identificar distintas cepas virales", puntualizó Pérez Filgueira y añadió: "Entre otras cosas, estos anticuerpos permiten controlar las cepas del virus con las cuales se formulan las vacunas comerciales, identificar aquellas que pudieran ser aisladas a campo y, además, son componentes críticos de los ensayos de ELISA que usa el Senasa para verificar, a nivel poblacional,



la eficacia de las campañas de vacunación anti-aftosa en nuestro país”.

“Actualmente en investigación se dispone de una batería de anticuerpos monoclonales específicos contra determinados tipos celulares o moléculas del sistema inmune que nos permiten caracterizar con detalle los tipos de respuesta inmune que se generan”, indicó el coordinador del INTA quien detalló que se utilizan anticuerpos monoclonales cuando se busca identificar células del sistema inmune involucradas en determinadas respuestas o células que se generan frente a una inmunización, incluso se puede identificar en qué estadios del desarrollo o de activación están.

De hecho, el grupo de trabajo de Pérez Filgueira en el IVIT desarrolló una técnica basada en un anticuerpo monoclonal contra el IFN- γ bovino para medir la respuesta inmune contra el VFA en los animales vacunados y evaluar distintas formulaciones: “El ensayo se basa en el mismo principio que los que se usan para diagnosticar tuberculosis bovina, solo que en este caso la detección del interferón gamma en las muestras de sangre bovina incubadas *in vitro* con virus de la fiebre aftosa inactivado nos sirve para cuantificar la inmunidad celular desarrollada contra el virus en los animales, luego de la vacunación”.

“Los anticuerpos monoclonales son considerados uno de los descubrimientos que cambiaron el destino de la inmunología y de las aplicaciones clínicas y terapéuticas”, enfatizó Pérez Filgueira y ponderó: “No se me ocurren muchos otros desarrollos que hayan tenido semejante impacto. Los anticuerpos monoclo-

nales se utilizan en animales, en plantas y en humanos; el abanico es inmenso”.

PARA IDENTIFICAR AL MAL DE RÍO CUARTO

En la Argentina, el Mal de Río Cuarto (MRC) es la enfermedad viral más importante del maíz (*Zea mays* L.) porque ocasiona importantes pérdidas económicas, ya sea por la disminución de la producción de granos o por la reducción de la biomasa para ensilaje o diferidos.

Mariana del Vas, bióloga, especialista en virología y biotecnología vegetal del Instituto de Agrobiotecnología y Biología Molecular del INTA, busca entender las bases moleculares, bioquímicas y celulares de la replicación viral para luego diseñar estrategias biotecnológicas de manejo de la enfermedad. Para eso, su equipo de trabajo obtuvo y seleccionó un tipo particular de anticuerpos monoclonales, denominados nanoanticuerpos, que presentan una altísima afinidad por proteínas no estructurales del virus que son necesarias para la replicación viral.

“Debido a que están hechos a partir de la selección de aquellos que, por ejemplo, tienen mayor capacidad de neutralizar a un determinado virus, son como una bala teledirigida” (O. Taboga).

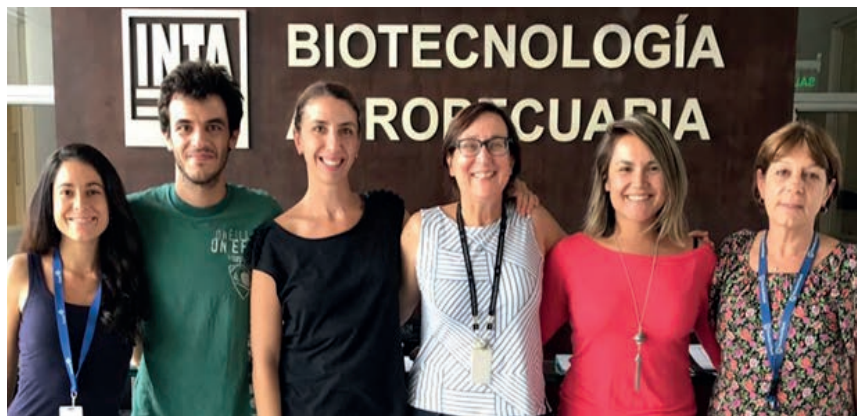
Los nanoanticuerpos, también llamados VHH o ‘nanobodies’ (en inglés) son los dominios variables derivados de un tipo de anticuerpo que carece de cadena liviana presente en camélidos (camellos, llamas, alpacas, guanacos y vicuñas), y son 10 veces más pequeños que los anticuerpos convencionales de mamíferos.

“En colaboración con Viviana Parreño –coordinadora científica de la plataforma Incuinta– y Serge Muyldermans –de la Universidad Libre de Bruselas– hemos obtenido y seleccionado nanoanticuerpos dirigidos contra el virus del Mal de Río Cuarto (MRCV) y los utilizamos para desarrollar un kit de ELISA para diagnosticar la presencia del virus, tanto en plantas de maíz como en el insecto que lo transmite”, señaló Del Vas y explicó: “Además, en un futuro esperamos expresar estos nanoanticuerpos en plantas transgénicas para interferir con la replicación viral y lograr resistencia. Las propiedades de los nanoanticuerpos (pequeño tamaño, alta afinidad y estabilidad) los hacen instrumentos ideales para este propósito”.

De acuerdo con un informe del Senasa, en el área endémica (departamento Río Cuarto, provincia de Córdoba), la enfermedad se presenta en forma recurrente todos los años con distintos grados de severidad, según sea la densidad poblacional de su insecto-vector (*Delphacodes kuscheli*) conocido vulgarmente como ‘chicharrita’.

Más información:

Oscar Taboga oscaralberto@inta.gov.ar;
Fabiana Bigi bigi.fabiana@inta.gov.ar; Alejandra Capozzo caipozzo.alejandra@inta.gov.ar; Mariano Pérez Filgueira perez.mariano@inta.gov.ar;
Mariana Del Vas delvas.mariana@inta.gov.ar



Mariana Del Vas (cuarta de izq. a der.) junto al equipo de investigación del Instituto de Agrobiotecnología y Biología Molecular del INTA.