

INTERACCIÓN ENTRE LAS CÉLULAS B Y LAS CÉLULAS T CD8⁺ EN EL ESTABLECIMIENTO DE UNA RESPUESTA ANTI-IDIOTÍPICA CONTRA EL ANTICUERPO MONOCLONAL SINGÉNICO P3

ENTIDAD EJECUTORA PRINCIPAL DEL RESULTADO: Centro de Inmunología Molecular

AUTORES PRINCIPALES: Darel Martínez Bedoya y Ana María Hernández Vázquez

COLABORADORES DEL CIM: Teresa Rondón Corrales, Tania Griñán Ramirez, Nely Rodríguez Zhurbenko, Amaury Pupo Meriño, Lianet Cabrera López, Judith Raymond Pous, Ana María Vázquez Gallo, Rolando Pérez Rodríguez.

AUTOR PARA LA CORRESPONDENCIA

DrC. Darel Martínez Bedoya

Dirección Postal: Centro de Inmunología Molecular, Calle 216, esq 15, Atabey, Playa, Habana 11 600, Cuba.

Dirección de correo electrónico: darel@cim.sld.cu

Tel: 7 214 3162 *Fax:* (53-7) 272 0644

RESUMEN:

El AcM P3, generado en el Centro de Inmunología Molecular, reconoce a gangliósidos portadores de ácido siálico *N*-glicolilado, así como a glicolípidos sulfatados y antígenos expresados en tumores humanos de mama, pulmón y melanoma. Tiene la propiedad de generar una fuerte respuesta anti-idiotípica de isotipo IgG, en el modelo singénico BALB/c, incluso al ser administrado en ausencia de adyuvantes o proteínas transportadoras. El papel específico de las diferentes poblaciones de células B en la respuesta anti-idiotípica no está completamente establecido. La capacidad del AcM P3 de activar células T, a pesar de ser una molécula propia, puede ser fundamental para su inmunogenicidad y para comprender el establecimiento de respuestas anti-idiotípicas. Hasta el momento no se ha estudiado la participación de las células T CD8⁺ en la inducción de este tipo de respuesta humoral. Además, sería importante determinar si efectivamente el AcM P3 porta un idiopéptido regulatorio capaz de activar células T CD8⁺ con la capacidad de regular la respuesta contra este anticuerpo. El presente trabajo busca dilucidar si las células B participan junto a las células T CD8⁺ en la generación, en condiciones no inmunogénicas, de una respuesta humoral y celular contra un auto-anticuerpo que reconoce moléculas propias. En nuestro estudio demostramos que el AcM P3 es capaz de reconocer y activar a las

poblaciones de linfocitos B-1a y B-2. Se prueba la necesidad de la participación de las células T CD8⁺ en la generación de la respuesta inmune anti-idiotípica contra el AcM P3 y la capacidad de este anticuerpo, mediante las células B-1a o B-2, de activar *in vitro* células T CD8⁺ con fenotipo citotóxico. Por otra parte, demostramos que la inmunización con el AcM P3 fue capaz de recuperar *in vivo* la frecuencia de la población de linfocitos T CD8⁺ en ratones sometidos a diferentes regímenes inmunosupresores. Finalmente, probamos que el AcM P3 es capaz de generar *in vivo* una respuesta CTL específica por un idiopéptido exclusivo de este anticuerpo. Los resultados sugieren la posible existencia de un mecanismo alternativo para inducir la regulación de la respuesta inmune contra antígenos propios en condiciones fisiológicas, mediado por interacciones idiotípicas, en el que participan tanto células B como células T CD8⁺. Se demuestra por primera vez la capacidad de células B-1a y B-2 de activar *in vitro* células T CD8⁺ con fenotipo citotóxico y la necesidad de las células T CD8⁺ para la inducción de una respuesta anti-idiotípica en ausencia de adyuvantes y proteínas transportadoras. Nuestro trabajo pone de manifiesto las capacidades del AcM P3 de activar linfocitos T CD8⁺ citotóxicos, lo que pudiera tener potencialidades para su uso terapéutico en pacientes inmunosuprimidos tanto por el uso de terapias linfodepletantes como por la presencia de tumores. Los resultados de la presente investigación se encuentran publicados en tres artículos científicos, dos en revistas internacionales de alto impacto y otro en una revista nacional, en una tesis de Licenciatura en Bioquímica, una tesis de Maestría en Bioquímica y una tesis de Doctorado en Ciencias Biológicas. También han sido presentados en 1 evento nacional y 10 internacionales.

COMUNICACIÓN CORTA DEL RESULTADO

Antecedentes:

En el Centro de Inmunología Molecular (CIM) se generó un anticuerpo monoclonal (AcM) de isotipo IgM, el AcM P3, que reconoce a gangliósidos portadores de ácido siálico *N*-glicolilado, así como a glicolípidos sulfatados, pero no a glicolípidos neutros, ni a las formas acetiladas de los gangliósidos (1,2). También se reportó que este AcM reconoce antígenos expresados en tumores humanos de mama, pulmón y melanoma (1,3,4). El AcM P3 tiene la propiedad de generar una fuerte respuesta anti-idiotípica de isotipo IgG, en el modelo singénico BALB/c, incluso al ser administrado en ausencia de adyuvantes o proteínas transportadoras (1). El papel específico de las diferentes poblaciones de células B en la respuesta anti-idiotípica no está completamente establecido.

El AcM P3 pertenece a la familia génica VHQ52, previamente observada en auto-anticuerpos contra gangliósidos y frecuentemente utilizada por los linfocitos B-1. Pérez y cols. sugirieron que el AcM P3 cumplía con los tres criterios establecidos por Paul y Bona para definir un idiotopo regulatorio: ser inmunogénico en el modelo singénico, aparecer en anticuerpos con diferentes especificidades e inducir la activación de células T autólogas (5-7). La capacidad del AcM P3 de activar células T,

a pesar de ser una molécula propia, puede ser fundamental para su inmunogenicidad. Hasta el momento no se ha estudiado la participación de las células T CD8⁺ en la inducción de la respuesta humoral contra el AcM P3. Además, sería importante determinar si efectivamente el AcM P3 porta un idiopéptido regulatorio capaz de activar células T CD8⁺ con la capacidad de regular la respuesta contra este anticuerpo.

Los objetivos de este trabajo fueron, primeramente, evaluar la participación de los linfocitos B-1a, B-2 y T CD8⁺ en la generación de una respuesta anti-idiotípica de isotipo IgG contra el AcM P3 en el modelo BALB/c. También determinar la capacidad del AcM P3 para reconocer y activar, *in vitro* e *in vivo*, poblaciones de células B-1a peritoneales y B-2 esplénicas. Finalmente, evaluar la capacidad del AcM P3 de activar *in vitro* e *in vivo* a las células T CD8⁺ e identificar si el AcM P3 posee un idiopéptido capaz de activar una respuesta CTL.

Resultados:

Evaluación de la participación de los linfocitos T en la generación de la respuesta anti-idiotípica de isotipo IgG contra el AcM P3 en el modelo BALB /c.

En contraste con la respuesta inducida en ratones con las poblaciones T intactas, en los sueros hiperinmunes de los animales tratados con anticuerpos anti-CD4a y anti-CD8a no se detectó una respuesta de anticuerpos contra el AcM P3 cuando los ratones se trataron con los anticuerpos anti-CD8a o anti-CD4a antes de la primera dosis del AcM P3. Estos resultados sugieren que la presencia de las células T CD8⁺ y CD4⁺ es necesaria en el momento de inducción de la respuesta contra el AcM P3. Este es el primer informe que implica a las células T CD8⁺ en la inducción de una respuesta anti-idiotípica *in vivo* en condiciones no inmunogénicas. Este resultado abre nuevas posibilidades para la comprensión de la regulación y la activación natural de las redes idiotípicas de células B-T.

Capacidad del AcM P3 para reconocer y activar poblaciones de células B.

Se demostró que las células B-1a participan en la respuesta de anticuerpos contra el AcM P3, ya que a diferencia de los resultados observados en ratones BALB/c, no se detectó una respuesta anti-idiotípica después de cuatro dosis del AcM P3 en ratones BALB/Xid. Además el AcM P3 fue capaz de reconocer como promedio un 30% de las células B-1a peritoneales. Se observó un aumento en el porcentaje de células B-1a que expresaban los marcadores de activación CD25, CD69 y CD86, luego de ser activadas por la inmunización con el AcM P3. Adicionalmente, el AcM P3 también demostró poder activar *in vitro* las células B-1a vírgenes, obtenidas de ratones sin ninguna inmunización anterior. El cultivo de células B-1a peritoneales vírgenes con el

AcM P3 durante tres días indujo un incremento en el porcentaje de células que expresaban los marcadores de activación CD25, CD69 y CD86; provocó un aumento significativo en el número de puntos de IgM producidos por las células B-1a en un ensayo de ELISPOT, lo que indica que un mayor número de células secretan IgM en respuesta a la estimulación con el anticuerpo y aumentó el porcentaje de las células B-1a productoras de las citocinas ensayadas: IFN- γ , IL-4 e IL-10. Se necesitó la transferencia combinada de poblaciones B-1 y B-2 a los ratones BALB/Xid para generar una respuesta idiotípica contra el AcM P3. De manera similar a lo reportado para las células B-1a, el AcM P3 fue capaz de reconocer específicamente a células B-2 obtenidas del bazo de ratones vírgenes, aunque el porcentaje de células reconocidas fue inferior al obtenido con las células B-1a. A diferencia de lo que ocurre con las células B-1a, en el caso de las células B-2 no se observó un incremento en el porcentaje de células que expresaban los marcadores de activación CD25, CD69 y CD86. La incubación con el AcM P3 provocó un aumento de los marcadores de activación CD25, CD69 y CD86 y produjo un incremento significativo del porcentaje de células capaces de producir IFN- γ e IL-4 pero no IL-10.

Evaluación de la capacidad del AcM P3 para activar *in vitro* e *in vivo* a las células T CD8⁺.

La incubación de células T CD8⁺ con células B-2 esplénicas de ratones inmunizados con el AcM P3, sin la adición del AcM P3 al cultivo, en general no indujo un aumento significativo de los marcadores de activación. Sin embargo, al adicionar el AcM P3 al cultivo, la re-estimulación *in vitro* sí aumentó significativamente el porcentaje de células T CD8⁺ que expresaron los marcadores de activación CD25 y CD69 y los marcadores funcionales de CTL CD107a y granzima B, así como la producción de IFN- γ . Sorprendentemente, la adición del AcM P3 al cultivo de células T CD8⁺ con las células B-2 de ratones inmunizados con el anticuerpo control también mostró un efecto estimulador para CD107a y CD69. Estos resultados sugieren que el AcM P3 tiene la capacidad de habilitar a las células B-2 vírgenes para provocar cierto nivel de activación de las células T CD8⁺ vírgenes, una propiedad que generalmente se considera limitada a las DC. Las células B-1a de ratones inmunizados con el AcM P3 provocaron un aumento significativo del porcentaje de células T CD8⁺ que expresaban CD25 y CD107a o que producían IFN- γ . En contraste con los resultados obtenidos con las células B-2, la adición del AcM P3 al cultivo tuvo poco efecto, comparada con la adición del anticuerpo control, sobre la activación de las células T CD8⁺. En el caso de las células B-1a obtenidas a partir de ratones inmunizados con el anticuerpo control de isotipo no se indujo una activación de las células T CD8⁺ cuando se añadió el AcM P3 al cultivo. Estos resultados sugieren que los niveles de activación alcanzados por las células B-1a *in vivo*, junto con el alto porcentaje de células B-1a reconocidas por el AcM P3, son suficientes para activar las células T CD8⁺ *in vitro*.

Primeramente, se produjo un aumento significativo en el porcentaje de linfocitos T CD8⁺ en ratones BALB/c suprimidos e inmunizados con el AcM P3, con respecto a los animales controles. A continuación el AcM P3 fue capaz de inducir una recuperación significativa de las subpoblaciones de linfocitos T CD8⁺ y T CD4⁺, pero no de la población de linfocitos B en un modelo de linfopenia inducida mediante ciclofosfamida. Una rápida reconstitución de la inmunidad dependiente de células T, como la observada con el AcM P3, resulta crítica para los pacientes con regímenes linfo-supresores. Para evaluar la funcionalidad de la población de linfocitos T generada luego del tratamiento con el AcM P3 se utilizó un modelo *in vivo* en el cual los ratones se inmunosuprimen por el establecimiento de un tumor singénico. En ratones BALB/c inmunosuprimidos por el tumor singénico F3II y tratados con el AcM P3 se observó una disminución significativa en la frecuencia de prendimiento del tumor alogénico B16-F10 respecto a la mostrada por el grupo control sin inmunizar. Se identificó, usando herramientas bioinformáticas, un péptido en la VH del AcM P3 con la secuencia MYYCARSGV, que se une específicamente a los alelos de MHC clase I de la cepa de ratones BALB/c. El idiopéptido identificado es exclusivo del AcM P3, ya que ningún otro anticuerpo reportado en la base de datos Abysis posee esa secuencia exacta. Este péptido es capaz de unirse al menos a ocho alelos de clase I del HLA, los cuales están presentes en más de un tercio de la población de Cuba o los EUA. La inmunización con el AcM P3 fue capaz de generar una respuesta específica de CTL capaz de lisar significativamente sólo las células esplénicas transferidas cargadas con el péptido específico de la región variable del AcM P3.

Los resultados de este trabajo permiten postular un modelo que no solo explicaría los resultados obtenidos en la tesis a la luz de un mecanismo fisiológico de regulación de la respuesta inmune contra antígenos propios de origen glicolipídico, sino que también aportaría las bases moleculares y celulares para confirmar la existencia en el AcM P3 de un idiotopo regulatorio. Pérez y cols. sugirieron que el AcM P3 cumplía con los tres criterios establecidos por Paul y Bona para definir un idiotopo regulatorio: ser inmunogénico en el modelo singénico, aparecer en anticuerpos con diferentes especificidades e inducir la activación de células T autólogas (5-7). Nuestro trabajo aporta un nuevo elemento, o cuarto criterio, para definir un idiotopo regulatorio, que sería la existencia de células T CD8⁺ citotóxicas específicas por un péptido del idiotopo, que desempeñen una función reguladora. Por otra parte, la existencia de péptidos con la capacidad de unirse a las moléculas del MHC I y generar una respuesta CTL *in vivo* permiten una operacionalización del concepto de idiotopo regulatorio, lo que podría facilitar su identificación en otros anticuerpos y su potencial empleo con el fin de modular diferentes respuestas inmunes.

Además del aporte teórico, el presente trabajo tiene potencial importancia práctica e impacto social. Primeramente contribuye a la comprensión de los mecanismos de acción de vacunas idiotípicas como la vacuna Vaxira del CIM, actualmente registrada para el uso en pacientes de cáncer de pulmón. Por otra parte, permitiría un mejor diseño de nuevas vacunas o anticuerpos anti-idiotípicos al permitir modular su inmunogenicidad y capacidad de interacción con células del sistema inmune. Los conocimientos derivados de este trabajo pueden traducirse en el diseño de

tratamientos más eficaces no solo para el cáncer, sino también para otras enfermedades de alta incidencia, como enfermedades autoinmunes y la aterosclerosis.

ESTOS RESULTADOS FUERON PUBLICADOS EN:

Martínez, D., Rodríguez, N., Griñán, T., Rondón, T., Vázquez, A. M., Pérez, R., y otros (2012). P3 mAb: An Immunogenic Anti-NeuGcGM3 Antibody with Unusual Immunoregulatory Properties. *Front. Immunol.* 3 (APR):94. (Índice de impacto: 6,429)

Martínez, D., Cabrera, L., y Hernández, A. M. (2016) P3, a monoclonal antibody capable to activate B-1a cells. *Biotechnología Aplicada* 33(2): 2211-2216.

Martínez, D., Pupo, A., Cabrera, L., Raymond, J., Holodick, N. E., y Hernández, A. M. (2017). B-CD8+ T cell interactions in the anti-idiotypic response against a self-antibody. *J. Immunol. Research.* 2017:2860867. (Índice de impacto: 3,276)

REFERENCIAS:

1. Vázquez, A. M., Alfonso, M., Lanne, B., Karlsson, K. A., Carr, A., Barroso, O., y otros (1995). Generation of a murine monoclonal antibody specific for N-glycolylneuraminic acid-containing gangliosides that also recognizes sulfated glycolipids. *Hybridoma* 14, 551-556.
2. Moreno, E., Lanne, B., Vazquez, A. M., Kawashima, I., Tai, T., Fernandez, L. E., y otros (1998). Delineation of the epitope recognized by an antibody specific for N-glycolylneuraminic acid-containing gangliosides. *Glycobiology* 8, 695-705.
3. Alfonso, M., Diaz, A., Hernandez, A. M., Perez, A., Rodriguez, E., Bitton, R., y otros (2002). An anti-idiotypic vaccine elicits a specific response to N-glycolyl sialic acid residues of glycoconjugates in melanoma patients. *J Immunol* 168, 2523-2529.
4. Neningen, E., Diaz, R. M., de la Torre, A., Rives, R., Diaz, A., Saurez, G., y otros (2007). Active immunotherapy with 1E10 anti-idiotypic vaccine in patients with small cell lung cancer: report of a phase I trial. *Cancer Biol Ther* 6, 145-150.
5. Paul, W. E., y Bona, C. (1982). Regulatory idiotopes and immune networks: a hypothesis. *Immunol. Today* 3, 230-4.
6. Bona, C. A. (1992). «Idiotypic, internal image.», en *Encyclopedia of Immunology* Vol 2, eds. I. M. Roitt y P. J. Delves (London: Academic Press), 726-728.
7. Pérez, A., Mier, E. S., Vispo, N. S., Vazquez, A. M., y Perez Rodriguez, R. (2002). A monoclonal antibody against NeuGc-containing gangliosides contains a regulatory idiotope involved in the interaction with B and T cells. *Mol Immunol* 39, 103-112.