Ensayos de hemaglutinación e inhibición de la hemaglutinación como métodos alternativos en la caracterización de partículas semejantes a virus del virus del papiloma humano

Hemagglutination assays and hemagglutination inhibition as alternative methods in the characterization of human papillomavirus-like particles

Danay González Acevedo-Forte^a, Susana Brito-Molina^{a,*}, Alina Falero-Morejón^a, Karen Marrero-Domínguez^a

^a Unidad de Productos Biológicos, Vice-dirección de Investigación-Desarrollo e Innovación, Centro Nacional de Investigaciones Científicas, Ave. 25 y 158, Cubanacán, Playa, La Habana, Cuba.

* susana.brito@cnic.edu.cu

Recibido: 22 de agosto de 2017; Aceptado: 23 de octubre de 2017

La infección con el virus del papiloma humano (VPH) es una enfermedad de transmisión sexual muy común entre hombres y mujeres sexualmente activos. Se han identificado más de 180 genotipos del VPH, encontrándose el 16 y 18 entre los más frecuentes, los que son responsables de casi el 70 % del cáncer cervical y junto con el genotipo 45 contribuyen al 94 % del adeno-carcinoma de cervix.¹ La cápsida del VPH está compuesta principalmente por la proteína L1, la cual está dispuesta en 72 pentámeros (o capsómeros) y tiene la propiedad de autoensamblarse en partículas semejantes a virus (VLPs, del inglés, *virus like particles*) que se asemejan a los viriones nativos en su forma y tamaño. Las VLPs, al presentar los epítopes conformacionales propios del virus, son altamente inmunogénicos e inducen altos títulos de anticuerpos,² por lo que han sido empleadas como el ingrediente activo de las vacunas comerciales contra la infección del VPH. Las VLPs pueden obtenerse mediante la expresión, la purificación y el ensamblaje de la proteína L1,³ conservando su conformación natural y actividad biológica como proteínas de la cápsida.⁴⁻⁶ La conservación de la estructura nativa de la proteína L1 del VPH es importante al conferirle estabilidad a la cápsida mediante el establecimiento de interacciones intra e intercapsoméricas; lo que asegura la integridad antigénica al contener los epítopes que inducen la respuesta inmune protectora.⁷

Existen tres vacunas profilácticas contra el VPH (Gardasil®, Gardasil9® y Cervarix®), todas basadas en VLPs de la proteína L1 obtenidas de forma recombinante en sistemas eucariotas. A pesar de que las vacunas contra el VPH han demostrado ser muy eficaces, su elevado costo ha limitado su implementación a escala global, sobre todo en los países de más bajos ingresos, donde es más necesaria.⁸ El elevado precio de las vacunas ha promovido el desarrollo de candidatos vacunales de segunda generación en países subdesarrollados.⁷ Para el desarrollo de estos candidatos vacunales es esencial implementar ensayos que permitan caracterizar las preparaciones obtenidas de las VLPs, con los que se verifique la presencia de epítopes conformacionales en la superficie de las partículas, una vez ensambladas. Estos ensayos se dificultan al no existir estándares internacionales ni reactivos de referencia para el control del contenido antigénico o potencia de las vacunas contra el VPH.⁹ Tradicionalmente, la antigenicidad de las VLPs se determina mediante el empleo de anticuerpos monoclonales neutralizantes, desarrollados por los productores de vacunas, que están inaccesibles o se encuentran a precios elevados. El empleo rutinario de anticuerpos monoclonales en técnicas inmunoquímicas implicaría un gasto considerable durante el

establecimiento de un proceso de purificación de la proteína L1, por lo que se hace necesario identificar ensayos más baratos.

Las pruebas de hemaglutinación (HA) e inhibición de la hemaglutinación (IHA) han sido empleadas desde los comienzos de la virología moderna, en la primera se aprovecha la propiedad de los virus de unirse a la membrana de los eritrocitos de ciertas especies mientras que su contraparte serológica se emplea como un índice de reactividad para la evaluación de los niveles de anticuerpos.^{10,11} Estas propiedades han sido explotadas para caracterizar e identificar receptores de la superficie celular para diferentes virus.¹²⁻¹⁴ En la actualidad, los ensayos de HA e IHA han sido útiles en la detección de antígenos; reemplazando las técnicas tradicionales y produciendo una mayor agilidad en la definición del diagnóstico.¹⁵ Se ha reportado el empleo de estos métodos en la caracterización de diferentes tipos de VLPs empleados como candidatos vacunales, por ejemplo, contra la gripe aviar¹⁶ y el VPH.¹⁷ Estos ensayos tienen la ventaja de ser rápidos y de fácil implementación, ya que el costo de los reactivos empleados es bajo y no requieren equipamiento sofisticado, aspectos que los convierten en una opción útil para evaluar la calidad de las VLPs de VPH. Teniendo en cuenta estos antecedentes, el presente comentario especializado informa sobre la validez de los ensayos HA e IHA para evaluar la antigenicidad de las preparaciones de VLPs durante el establecimiento de un proceso de purificación de la proteína L1 de VPH y como técnicas alternativas para determinar la actividad biológica de estas preparaciones.

Ensayos de hemaglutinación e inhibición de la hemaglutinación para caracterizar las VLPs derivadas de VPH

El empleo de los ensayos de HA e IHA para caracterizar a las VLPs derivadas del VPH se describió por vez primera por Roden y cols.¹⁸ Se demostró que las VLPs recombinantes provocaban la HA de eritrocitos de ratón cuando estaban correctamente plegadas, actividad que fue inhibida por anticuerpos conformacionales neutralizantes específicos. Los métodos descritos no han sufrido cambios significativos y se han empleado para caracterizar las preparaciones de VLPs purificadas a partir de diferentes hospederos, tales como células de insectos Sf-9,⁴ plantas de tabaco transgénicas,¹⁹ levadura (*Pichia pastoris*)²⁰ y bacterias (*Escherichia coli*).¹⁷

Una de las limitaciones del ensayo para el análisis cualitativo o semicuantitativo de las VLPs se relaciona con la concentración y pureza requeridas de las muestras. Las no purificadas pueden dar lugar a falsos positivos debido a proteínas libres y partículas contaminantes del sistema de producción usado, como se ha descrito para el caso de la cuantificación de VLPs de influenza.¹² Además, se pueden obtener falsos negativos si se emplea una concentración muy pequeña del antígeno. En general, se emplean preparaciones con más de un 90 % de pureza,^{4,20} aunque también se ha utilizado las VLPs del VPH16 presentes en el sobrenadante de cultivo de células de insecto, sin previa purificación,¹⁹ donde se confirmó la talla de las VLPs mediante microscopía electrónica (55 nm). Estos resultados demuestran la gran actividad hemaglutinante que poseen las VLPs de VPH16 ensambladas correctamente, a pesar de no contar con un alto grado de pureza.

Ensayos de hemaglutinación para caracterizar las VLPs derivadas de VPH

En general, para estos procedimientos se realizan diluciones seriadas dobles de la muestra. No obstante, para una determinación más precisa de las unidades hemaglutinantes, se deben

realizar una serie de diluciones en un intervalo más estrecho, p.ej. 1/3, 1/4, 1/5, 1/6. Para la estimación correcta de los títulos hemaglutinantes es importante conocer los patrones de HA, lo que permita obtener resultados reproducibles. Hay que tener en cuenta que la HA se considera completa cuando se observa una capa fina y bien distribuida en el pocillo, mientras que como no hemaglutinación se considera el sedimento de eritrocitos en forma de botón en el fondo del pocillo. Por otra parte, se considera una HA parcial a la formación de un anillo de células aglutinadas alrededor de un botón en el centro del pocillo y no se considera punto final de la HA.

En la realización de estos ensayos se ha empleado un intervalo de concentración de las VLPs purificadas desde 50 ng hasta 1 mg/mL, suficiente para obtener resultados satisfactorios.^{4,20} Es necesario utilizar controles negativos para demostrar que la HA no depende ni de la proteína L1 del VPH desnaturalizada o contaminantes, ni de reacciones con los componentes del tampón o de uniones inespecíficas de los eritrocitos. Para ello se emplean las VLPs desensambladas, el buffer en el que se encuentren las VLPs y la Solución Salina Amortiguadora por Fosfatos (PBS, por sus siglas en inglés, phosphate buffered saline) que contiene 1 mg/mL de albúmina de suero bovino. Además, como control positivo de referencia se debe emplear una preparación propia de VLPs preparada a partir de células de organismos superiores, según los procedimientos descritos (<https://home.ccr.cancer.gov/lco/pseudovirusproduction.htm>), que haya sido caracterizada extensivamente mediante métodos más sensibles.²¹

Una indicación de la especificidad de la HA puede estar dada por la evaluación de esta actividad en VLPs desensambladas. La prueba de HA, debido a sus desventajas, no proporciona un resultado definitivo, por tanto, una respuesta positiva no corresponderá necesariamente a un plegamiento correcto de las VLPs. Por esta razón, se debe emplear un ensayo adicional en el que se verifique la especificidad de la HA. Con este fin se puede emplear el ensayo de IHA. Esta prueba se basa en la unión de un anticuerpo específico para las VLPs de VPH que impida la formación de puentes con el receptor celular.

Ensayos de inhibición de la hemaglutinación para caracterizar las VLPs derivadas de VPH

Una vez determinado el título hemaglutinante de una preparación de VLPs, se procede a realizar el ensayo de IHA. En este caso se emplea una concentración constante del antígeno que se pone en contacto con concentraciones variables de los anticuerpos monoclonales neutralizantes o sueros específicos antes de adicionar la suspensión de eritrocitos. Para la mayor precisión de los resultados se deben utilizar los anticuerpos neutralizantes recomendados por los fabricantes de vacunas, pero como se mencionó antes, el acceso a estos constituye una limitante en los laboratorios de bajos recursos a la hora de implementar estos ensayos. En el caso de la caracterización de las VLPs del VPH16 o 18, se pudiera emplear alternativamente los sueros humanos de referencia de la Organización Mundial de la Salud contra el VPH16 (http://www.nibsc.org/products/brm_product_catalogue/detail_page.aspx?catid=05/134) y (http://www.nibsc.org/products/brm_product_catalogue/detail_page.aspx?catid=10/140) contra el VPH18, desarrollados por el NIBSC (del inglés, *National Institute for Biological Standards and Control*) del Reino Unido. Se puede utilizar en este caso un control de glóbulos rojos de ratón para detectar aglutinación inespecífica de las células en ausencia de anticuerpo y antígeno, un control de anticuerpo negativo al antígeno utilizado para verificar que la IHA no ocurre en presencia de otro anticuerpo, el control de las unidades hemaglutinantes del

antígeno para verificar la HA completa en ausencia de anticuerpo y, por último, un control de PBS.

Comparado con otros ensayos de detección de anticuerpos virales, ha quedado demostrado que los ensayos de HA e IHA son menos sensibles.¹⁸ Sin embargo, Roden y col. demostraron que la protección contra la infección del VPH se correlacionaba mejor con los títulos de IHA que con los determinados mediante un ELISA, a pesar de ser este último método 100 veces más sensible. En este caso, el ensayo de IHA posterior a uno de HA fue capaz de eliminar falsos positivos generados en el ensayo de ELISA por proteína desnaturalizada en las preparaciones de VLPs. Se demostró así la ventaja que poseen estos ensayos en cuanto a la dependencia conformacional de las VLPs. También se conoce que el ensayo de IHA representa un ensayo sustituto riguroso para la neutralización viral, porque solo detecta aquellos anticuerpos que previenen la unión de los papilomavirus a las células, aunque la neutralización de los virus del papiloma puede ocurrir luego de que el virus se ha unido a la célula. Estos ensayos también pueden emplearse para evaluar los títulos de anticuerpos protectores luego de una inmunización con las VLPs purificadas.

CONCLUSIONES

La implementación de los ensayos de HA e IHA puede ser de gran utilidad durante el desarrollo y monitoreo de un proceso de purificación de las VLPs, en laboratorios que no posean grandes recursos ni modernos equipamientos. Posteriormente, deben emplearse ensayos más sensibles y específicos para la caracterización final de las VLPs.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Wheeler CM. The natural history of cervical human papillomavirus infections and cervical cancer: gaps in knowledge and future horizons. *Obstet Gynecol Clin North Am.* 2013;40(2):165-76.
2. Lai WB, Middelberg AP. The production of human papillomavirus type 16 L1 vaccine product from *Escherichia coli* inclusion bodies. *Bioprocess and biosystems engineering.* 2002;25(2):121-128.
3. Sharma CH, Dey B, Wahiduzzaman M, Singh N. Human papillomavirus 16 L1-E7 chimeric virus like particles show prophylactic and therapeutic efficacy in murine model of cervical cancer. *Vaccine.* 2012;30(36):5417-24.
4. Zheng HE, Ma J, Yang XF, Liu HL, Cheng HW, Si LS, Wang YL. Highly Efficient and Economical Baculovirus Expression System for Preparing Human Papillomavirus Type16 Virus-like Particle. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica.*2004;36(8):548-552.
5. Pan D, Zha X, Yu X, Wu Y. Enhanced expression of soluble human papillomavirus L1 through coexpression of molecular chaperonin in *Escherichia coli*. *Protein Expression and Purification.* 2016; 120:92-98.
6. Chen Y, Liu Y, Zhang G, Wang A, Dong Z, Qi Y, *et al.* Human papillomavirus L1 protein expressed in *Escherichia coli* self-assembles into virus-like particles that are highly immunogenic. *Virus Research.* 2016; 220:97-103.
7. Pimienta ET, Marrero K, y Calzada RF. Candidatos vacunales profilácticos de segunda y tercera generación contra el virus del papiloma humano. *Revista CENIC Ciencias Biológicas.* 2016;48(2):21-32.
8. Hu YM, Huang SJ, Chu K, Wu T, Wang ZZ, Yang CL, *et al.* Safety of an *Escherichia coli*-expressed bivalent human papillomavirus (types 16 and 18) L1 virus-like particle vaccine: an open-label phase I clinical trial. *Human vaccines & immunotherapeutics.* 2014; 10(2):469-75.
9. Human papillomavirus vaccines: WHO position paper, May 2017. *Weekly epidemiological record.* 2017;92(17):241-268 <http://www.who.int/wer>
10. Dorig RE, Marcil A, Chopra A, Richardson CD. The human CD46 molecule is a receptor for measles virus (Ed-monston strain). *Cell.* 1993;75(2):295-305.
11. Crespo MP, Bact, M.Sc. El diagnóstico viral por el laboratorio. *Colombia Médica.* 2000;31(3):135-150.
12. Thompson ChM, Petiot E, Lennaertz A, Henry O, Kamen AA. Analytical technologies for influenza virus-like particle candidate vaccines: challenges and emerging approaches. *Virology Journal.* 2013; 10:141-155.

13. Palacios R, Montoya E, Torres I, Ortiz AC. Utilización de hematíes de primates sudamericanos en la prueba inhibición de hemaglutinación para el diagnóstico del Virus del Sarampión. Rev Perú Med Exp. Salud pública [online]. 1997;14(2):7-12.
14. Auletia A, Gitnick GL, Whitmire CE, Sever JL. An Improved Diluent for Rubella Hemagglutination and Hemagglutination-Inhibition Tests. Applied Microbiology. 1968; 16(5):691-694.
15. Alvarez Y, Lares M, Vietri M, Aguilar CM, Herrera L, Ferrer E. Estandarización de la técnica de aglutinación directa para el inmunodiagnóstico de la enfermedad de Chagas. Biomédica. 2014;34(2):308-17.
16. Che-Ming JH, Chu-Yang Ch, Ming-Tsan L, Zih-Syun F, Sui-Yuan Ch, Rong-HuayJ, *et al.* Multi-antigen avian influenza A (H7N9) virus-like particles: particulate characterizations and immunogenicity evaluation in murine and avian models. BMC Biotechnology. 2017;17(2):2-12.
17. Min Li, Xin Wang, Lu Cao, Zhijie Lin, Minxi Wei, Mujin Fang, *et al.* Quantitative and epitope-specific antigenicity analysis of the human papillomavirus 6 capsid protein in aqueous solution or when adsorbed on particulate adjuvants. Vaccine. 2016;34(37):4422-8.
18. Roden RB, Hubbert NL, Kirnbauer R, Breitburd F, Lowy DR, Schiller JT. Papillomavirus L1 capsids agglutinate mouse erythrocytes through a proteinaceous receptor. J Virol. 1995;69(8):5147-51.
19. Liu H-L, Li W-S, Lei T, Zheng J, Zhang Z, Yan X-F, *et al.* Expression of Human Papillomavirus Type 16 L1 Protein in Transgenic Tobacco Plants. Acta Biochimica et Biophysica Sinica. 2005;37(3):153-8.
20. BoschiBazan S, Muniz AA, Araujo K, Marques A, Garcea RL, Lee P. Expression and characterization of VPH-16 L1 capsid protein in *Pichia pastoris*. Arch Virol. 2009; 154:1609–1617.
21. Zhao Q1, Li S, Yu H, Xia N, Modis Y. Virus-like particle-based human vaccines: quality assessment based on structural and functional properties. Trends Biotechnol. 2013;31(11):654-63.