

## RESPUESTA INMUNE HUMORAL INDUCIDA POR LIPOSOMAS CATIÓNICOS FORMULADOS CON DIFERENTES INMUNOESTIMULANTES

Bartalini Laura<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratorio de Inmunología Experimental, Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas

Directora: Dra. Diana Müller

Codirectora: Bioq. Ma. Inés García

Área: Ciencias Biológicas

### INTRODUCCIÓN

Las nanopartículas basadas en lípidos catiónicos representan un vehículo accesible para ser empleado en vacunas a subunidades, ya que además de poder entrapar antígenos proteicos con gran eficiencia, presentan biodegradabilidad y la posibilidad de ser suplementados con moléculas inmunoestimulantes (Torchilin, 2005; Mahapatro y Singh Dinesh, 2011). Entre estas moléculas, se encuentran oligosacáridos de manosa hidrofobizados, anfífilos aminoacídicos y oligodesoxinucleótidos CpG no metilados (Vyas et al., 2010; Müller et al., 2011; Reidel et al., 2013; Peña et al., 2017), estas moléculas pueden ser reconocidas por receptores inmunitarios presentes en células presentadoras de antígeno, como células dendríticas y macrófagos (Taken et al., 2007; Shimizu et al., 2007), lo que permitiría incrementar el reconocimiento antigénico.

### OBJETIVOS

Evaluar la capacidad adyuvante de liposomas catiónicos (Lip) suplementados con oligosacáridos de manosa hidrofobizados, un oligodesoxinucleótido CpG (CpG) y un anfífilo aminoacídico, como inmunoestimulantes, para la inmunización con la proteína clumping factor de *Staphylococcus aureus* obtenida en forma recombinante.

### METODOLOGÍA

Para el desarrollo del presente trabajo se emplearon ratones hembras de la cepa BALB/c, que al inicio de los protocolos de inmunización presentaban de 5 a 7 semanas de edad. Los mismos fueron mantenidos en el Bioterio del Laboratorio de Inmunología Experimental, con un ciclo de luz-oscuridad de 12 horas, con suministro de agua y alimento *ad libitum*. Los animales fueron inoculados con la proteína recombinante clumping factor de *Staphylococcus aureus* (rClf) entrapada en liposomas catiónicos suplementados con diferentes inmunoestimulantes. Los grupos controles fueron inoculados con el vehículo correspondiente sin el inmunógeno. En todos los casos los ratones recibieron dos dosis por vía subcutánea (una cada tres semanas) y se les extrajo una muestra de sangre diez días después de cada inoculación para evaluar la presencia de anticuerpos específicos para el antígeno. Como control negativo se utilizó suero preinmune. Las formulaciones para cada uno de los grupos experimentales (n=6 por grupo) fueron:

Título del proyecto: Diseño y evaluación de compuestos biocompatibles para el *delivery* de ADN y proteínas, aplicables en terapia génica, inmunización a ADN y tratamiento de enfermedades.

Instrumento: CAI+D

Año convocatoria: 2016

Organismo financiador: UNL

Director: Dra. Carolina Veaute

Plan de inmunización empleando anfitrión aminoacídico (Gem). Grupos con inmunógeno: Lip+CpG+rClf, Lip+Gem+rClf y Lip+Gem+CpG+rClf. Grupos control sin inmunógeno: Lip+Gem y Lip+Gem+CpG.

Plan de inmunización empleando O-palmitoilmanano (Man). Grupos con inmunógeno: Lip+CpG+rClf, Lip+Man+rClf y Lip+Man+CpG+rClf. Grupos control sin inmunógeno: Lip+Man y Lip+Man+CpG.

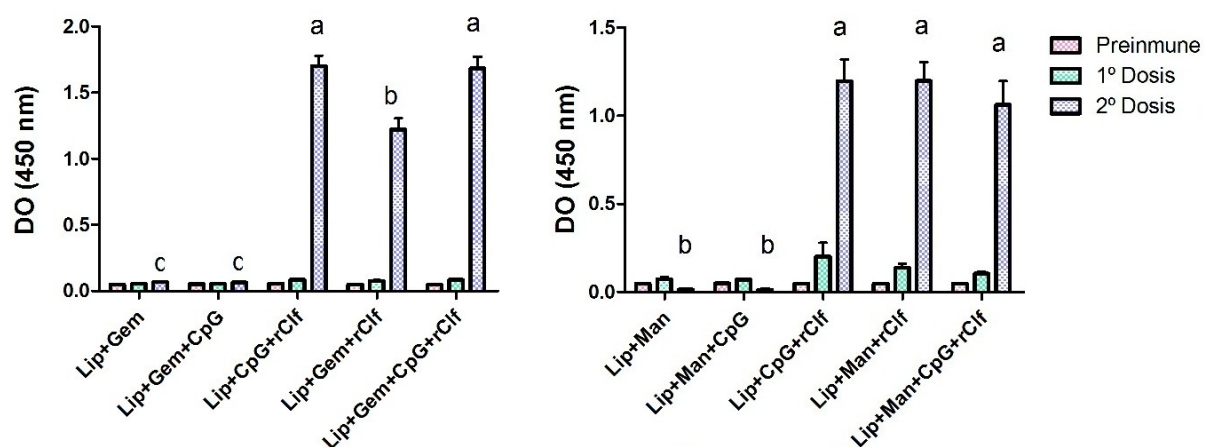
Las concentraciones finales para cada componente fueron: lípidos (liposomas preformados por inyección etanólica) 4mM en buffer acetato (BAC) 50 mM y rClf 100 ug/mL; anfitrión aminoacídico (Gem) 400 uM, O-palmitoilmanano (Man) 2 mg/mL y CpG-ODN (CpG) 7,5 nmol/mL, inoculándose 100 uL/dosis a cada animal por vía subcutánea.

La capacidad de las formulaciones de inducir la producción de anticuerpos específicos para rClf se evaluó mediante ensayo inmunoenzimático indirecto (ELISA). Para la detección se emplearon anticuerpos anti-IgG totales murinas, anti-IgG1 murina y anti-IgG2a murina, todos ellos conjugados con peroxidasa. Se evaluaron los niveles de IgG totales (IgGT) a lo largo de los protocolos de inmunización y los títulos de IgGT, IgG1 e IgG2a al finalizar los mismos.

## RESULTADOS

### Cinética de la respuesta inmune humoral mediante cuantificación de los niveles de IgGT

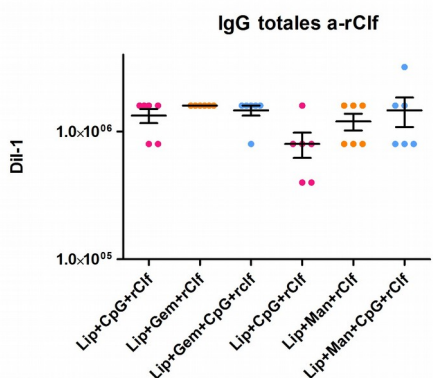
Como se observa en la figura 1., ambas moléculas aumentaron los niveles de IgGT en forma notable luego de la segunda dosis.



**Figura 1:** Cinética de la respuesta de IgGT en cada plan de inmunización. Las barras representan la media más el error estándar de la media (EEM+) de los niveles de IgGT, expresados como DO a una dilución 1/15000 para el anfitrión aminoacídico y 1/20000 para O-palmitoilmanano. Sueros preinmunes se utilizaron como control negativo. Las letras distintas sobre las barras representan diferencia significativa entre los niveles de IgGT entre los grupos ( $p < 0,05$ , prueba de Mann Whitney).

### Evaluación de la respuesta inmune humoral mediante cuantificación de los niveles de IgGT

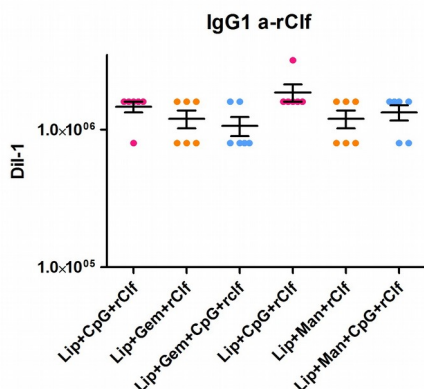
Luego del análisis de los resultados presentados en la figura 2., se puede decir que los adyuvantes Gem y Man estimulan la producción de IgGT en el mismo orden, independientemente de la combinación con CpG-ODN y sin diferencias significativas entre los grupos. Se puede observar una mayor dispersión en los grupos que tenían CpG-ODN. Todos los títulos superaron 1/800000.



**Figura 2:** Títulos de IgGT al finalizar cada protocolo de inmunización. Las líneas representan la media  $\pm$ EEM de los títulos de IgGT generados por cada formulación luego de la segunda dosis. Las letras distintas sobre las barras representan diferencia significativa entre los títulos de IgGT entre los grupos ( $p < 0,05$ ; prueba de Mann Whitney o test de Wilcoxon en el caso del grupo Lip+Gem+rC1f). No se incluyeron los grupos sin rC1f ya que no presentaron respuesta.

### Evaluación de la respuesta inmune humoral mediante cuantificación de los niveles de IgG1

Podemos observar en la figura 3. que la producción de anticuerpos IgG subtipo IgG1 se ve estimulada por ambos adyuvantes, Gem y Man, en la misma medida, independientemente de la presencia de CpG-ODN. Todos los títulos superan el orden de 1/1000000 y no presentan diferencias significativas entre los grupos.

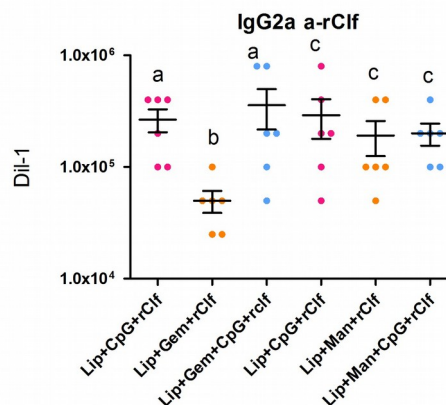


**Figura 3:** Títulos de IgG1 al finalizar cada protocolo de inmunización. Las líneas representan la media  $\pm$ EEM de los títulos de IgG1 generados por cada formulación luego de la segunda dosis. Las letras distintas sobre las barras representan diferencia significativa entre los títulos de IgG1 entre los grupos ( $p < 0,05$ ; prueba de Mann Whitney). No se incluyeron los grupos sin rC1f ya que no presentaron respuesta.

### Evaluación de la respuesta inmune humoral mediante cuantificación de los niveles de IgG2a

En la figura 4. se observa que ambos adyuvantes inducen buena respuesta por sí solos; la combinación de anfífilo aminoacídico con CpG-ODN induce la mayor respuesta para este subtipo, seguido por las formulaciones con O-palmitoilmanano con y sin CpG-ODN. Todos los títulos superan el orden de 1/400000.

**Figura 4:** Títulos de IgG2a al finalizar cada protocolo de inmunización. Las líneas representan la media  $\pm$ EEM de los títulos de IgG2a generados por cada formulación luego de la segunda dosis. Las letras distintas sobre las barras representan diferencia significativa entre los títulos de IgG2a entre los grupos ( $p < 0,05$ ; prueba de Mann Whitney).



## CONCLUSIONES

Los dos adyuvantes evaluados, Gem y Man, han mostrado gran efectividad en la generación de una respuesta inmune humoral protectora al ser empleados con liposomas catiónicos y el antígeno de interés. Las formulaciones que contenían CpG-ODN evidenciaron respuestas algo mayores en el caso del protocolo de inmunización con Gem, aunque la acción de este anfífilo como único adyuvante incorporado en liposomas catiónicos es igualmente destacable. En el caso de O-palmitoilmanano; la presencia de CpG-ODN no produjo cambios en la respuesta propia del oligosacárido de manosa para IgGT ni en ninguno de los subtipos. Las tres moléculas, Gem, Man y CpG indujeron altos títulos de anticuerpos, utilizadas individualmente con liposomas y rClf o combinadas entre sí. Esto posibilitaría la utilización de liposomas catiónicos combinados con moléculas de este tipo en vacunas a subunidades proteicas en el futuro.

## BIBLIOGRAFÍA BÁSICA

- Mahapatro, A.; Singh Dinesh, K.**, 2011. Biodegradable nanoparticles are excellent vehicles for site directed in-vivo delivery of drugs and vaccines. *Journal of Nanobiotechnology*, 9, 55.
- Müller, D.M., Ingaramo, M.C., Arganara, M.F. and Murguía, M.C.**, 2011. Síntesis y actividad biológica de nuevos surfactantes peptídicos tipo gemini. *CIT*, 22, 11-20.
- Peña, L.C.; Argarañá, M.F.; De Zan, M.M.; Giorello, A.; Antuña, S.; Prieto, C.C.; Veute, C.M.I.; Müller, D.M.**, 2017. New amphiphilic amino acid derivatives for efficient DNA transfection in vitro". *Journal Advances in Chemical Engineering and Science (ACES)*. 2017, 7, 191-205.
- Reidel, I.; Gennaro, A.; Veute, C.**, 2013. Diseño y evaluación de adyuvantes de última generación destinados a la formulación de una vacuna para el control de la mastitis bovina. *Encuentro de Jóvenes Investigadores 2013: trabajos completos de becarios y estudiantes de posgrados* (Hynes, H.; Comba, D.; Ramajo, D.), Colección Ciencia y Técnica de la UNL. Editorial UNL. Santa Fe, Santa Fe, Argentina. ISBN 978-987-657-955-1.
- Shimizu, Y.; Takagi, H.; Nakayama, T.; Yamakami, K.; Tadakuma, T.; Yokoyama, N.; Kojima, N.**, 2007. Intraperitoneal immunization with oligomannose-coated liposome-entrapped soluble leishmanial antigen induces antigen-specific T-helper type immune response in BALB/c mice through uptake by peritoneal macrophages. *Parasite Immunology*, 29, 229-239.
- Taken, P.J.; Vries, I.J.M. de; Torensma, R.; Figdor, C.G.**, 2007. Dendritic-cell immunotherapy: from ex vivo loading to in vivo targeting. *Nature Review Immunology*, 7, 790-799.
- Torchilin, V.P.**, 2005. Recent advances with liposome as pharmaceutical carriers. *Nat Rec Drug Discov.*, 4(2):145-160.
- Trovato, M.; De Berardinis, P.**, 2015. Novel antigen delivery systems. *World J Virol*, 4(3),156-168.
- Vyas, S.P.; Goyal, A.K.; Khatri K.**, 2010. Mannosylated liposomes for targeted vaccines delivery Liposomes. *Methods and Protocols*. V. Weissig. New York, Humana Press. 1.