



EVALUACIÓN DE LA INMUNOGENICIDAD DE MOLÉCULAS SINTÉTICAS, CANDIDATAS A UNA VACUNA CONTRA EL VIRUS DE LA ANEMIA INFECCIOSA EQUINA, EN RATONES BALB/c

Herzfeld Jael^{1,2}

¹Cátedra de Inmunología Básica, FBCB-UNL

²Laboratorio de Diagnóstico e Investigaciones Agropecuaria, Ministerio de la Producción de la Pcia. De Santa Fe.
UNL Director/a: Soutullo Adriana Codirector/a: Veaute Carolina

Área: Ciencias Biológicas

INTRODUCCIÓN

El Virus de la Anemia Infecciosa Equina (VAIE) es un Retrovirus del género Lentivirus, que afecta a la familia *Equidae*. Su genoma cuenta con dos moléculas de RNA simple hebra, en donde cada una de ellas contienen los genes *gag*, *pol* y *env* codificados en sentido 5´-3´. El gen Env codifica a las dos glicoproteínas de la envoltura, gp90 y gp45, formando un complejo oligomérico. La proteína de superficie gp90 es altamente glicosilada y presenta regiones conservadas alternadas con segmentos variables. Estos últimos sufren modificaciones asociadas a las sucesivas replicaciones del virus, conllevando a presentar diferencias significativas en su secuencia con respecto a la consenso. Por otro lado, la proteína de transmembrana gp45, a diferencia de la anterior, es menos glicosilada y más constante, por lo que las diferentes cuasiespecies virales existentes no presentan grandes diferencias con la secuencia consenso (Leroux y col., 2004; Soutullo, 2008).

A lo largo de los últimos 20 años se han observado diferentes desarrollos vacunales contra el VAIE basados en virus inactivado, en subunidades virales o recombinantes de la envoltura, en virus atenuados, entre otros (Craig y col., 2010). La primera y única vacuna atenuada contra el VAIE fue la desarrollada y aplicada en China hasta el año 2000, resultando ser protectora sólo contra las cepas de esa región. Hasta el momento no se ha desarrollado una vacuna efectiva que proteja contra todas las cuasiespecies virales existentes debido al alto grado de mutabilidad del virus (Montelaro y col., 1984).

En diversos estudios se ha observado la capacidad de las proteínas de superficie (gp90) y de transmembrana (gp45) de inducir una fuerte respuesta inmunológica. En el presente trabajo se buscará evaluar la inmunogenicidad de dos péptidos sintéticos, en especie murina, que representan regiones conservadas de estas glicoproteínas de modo de analizar su inclusión, a futuro, en una vacuna contra el VAIE.

OBJETIVOS

Caracterización de la respuesta inmune en ratones BALB/c inmunizados con péptidos sintéticos que imitan regiones conservadas de las glicoproteínas gp90 y gp45 del VAIE, gp90B y gp45B, respectivamente.

- Detección de anticuerpos anti gp90B/gp45B en suero murino.
- Evaluación de los índices de linfoproliferación.
- Detección de IL-12 en suero murino.

Título del proyecto: Diseño y Evaluación de una Vacuna Génica contra el Virus de la Anemia Infecciosa Equina, en ratones BALB/c.

Año convocatoria: 2018

Organismo financiador: Proyectos Capital Semilla de Valorización del Conocimiento, CETRI-UNL.

Partida especial para el Laboratorio de Diagnóstico e Investigaciones Agropecuarias, Ministerio de la Producción.

Director/a: Adriana Soutullo





RESULTADOS/CONCLUSIONES

Dos grupos de ratones ($n=7$) BALB/cCmedc, hembras de 2 meses de edad, fueron inoculados 7 veces, por vía subcutánea, cada 15 días con 100 ug de cada péptido sintético por animal, gp90B ó de gp45B, disueltos en medio RPMI y emulsionados en Adyuvante Completo de Freund (ACF), para la primera inoculación, y en Adyuvante Incompleto de Freund (AIF) para las restantes. El grupo control ($n=6$) se inoculó solo con RPMI y con ACF o AIF, según corresponda.

Se extrajeron muestras séricas a los días 0, 46, 62, 76 y al momento de sacrificio, día 84, en el cual además se obtuvieron las células mononucleares esplénicas.

Se evaluaron los niveles séricos de anticuerpos anti gp90B y gp45B, y se cuantificaron los valores de la citoquina IL-12, por ELISA y se realizaron ensayos de linfoproliferación con las células mononucleares esplénicas, mediante la detección de BrdU con el método ELISA.

Los niveles de anticuerpos fueron expresados como índices de positividad (PP), calculados con la ecuación (1), empleando como referencia del 100% un suero de un equino infectado.

$$\%PP = \frac{DO(muestra) - DO(suero preinmune)}{DO(SRP) - DO(SCN)} \times 100 \quad (1)$$

Donde SRP significa Suero de referencia positivo equino y SCN es el suero control negativo equino (Soutullo y col., 2001).

La evaluación de la linfoproliferación, incubando los linfocitos esplénicos de cada ratón con cada antígeno peptídico, se determinó mediante la incorporación de BrdU en las células en proliferación específica utilizando el kit Cell Proliferation ELISA BrdU (colorimetric) Roche, siguiendo el protocolo del fabricante. Los índices de proliferación fueron calculados según la ecuación (2).

$$IP = \frac{DO(muestra) - DO(blanco)}{DO(basal)} \quad (2)$$

Para la determinación de IL-12 en suero se utilizó el Set Mouse IL-12(p70) ELISA de BD Biosciences, siguiendo las instrucciones del fabricante. La concentración de esta citoquina fue obtenida por extrapolación de sus densidades ópticas, según curva de calibrado.

Para evaluar diferencias estadísticamente significativas entre los grupos inoculados con los péptidos sintéticos gp90B o gp45B y el control, se aplicaron los métodos no paramétricos de Mann-Whitney y Kruskal-Wallis, según corresponda.

En efecto, ambos grupos inoculados con gp90B o gp45B desencadenaron niveles de anticuerpos significativamente superiores al control, siendo el péptido gp45B más inmunógeno que el péptido gp90B, igualándose en el día 84 (Fig.1).

Diferencias significativas también se evidenciaron al analizar los índices de proliferación (Fig. 2). Por otra parte, 4/5 animales del grupo gp90B y 5/7 del grupo gp45B, dieron índices mayores a 2.

Al comparar las concentraciones de la citoquina IL-12 (día 84), la única diferencia estadísticamente significativa encontrada fue al compararse con los obtenidos en sueros pre-inmunes, no así de cualquiera de los grupos estimulados con el control (Fig. 3).

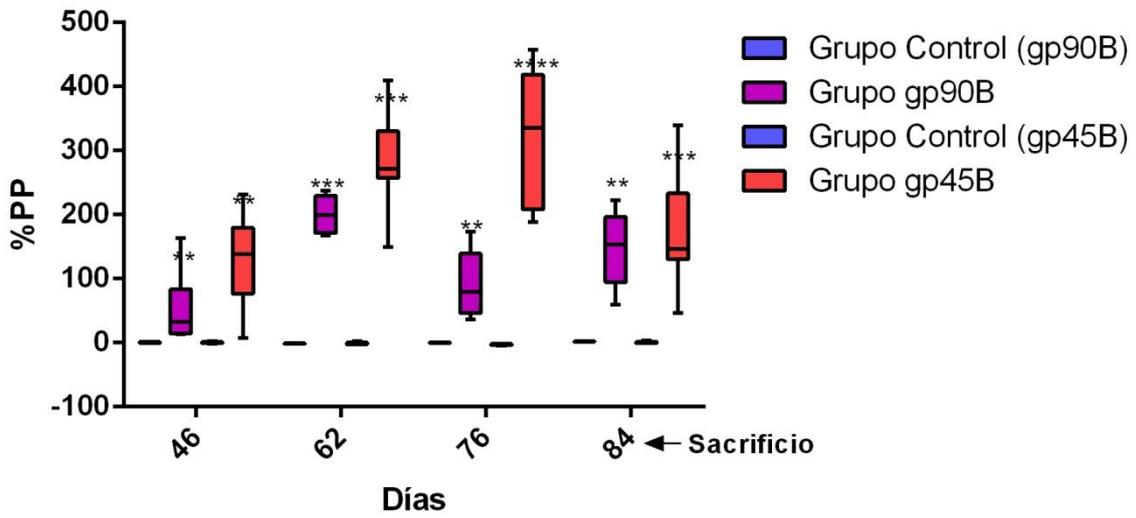


Fig. 1: Respuesta humoral de ratones inoculados con gp90B y gp45B versus ratones control. Las muestras analizadas corresponden a los días 46, 62, 76 y 86 del plan de inmunización.

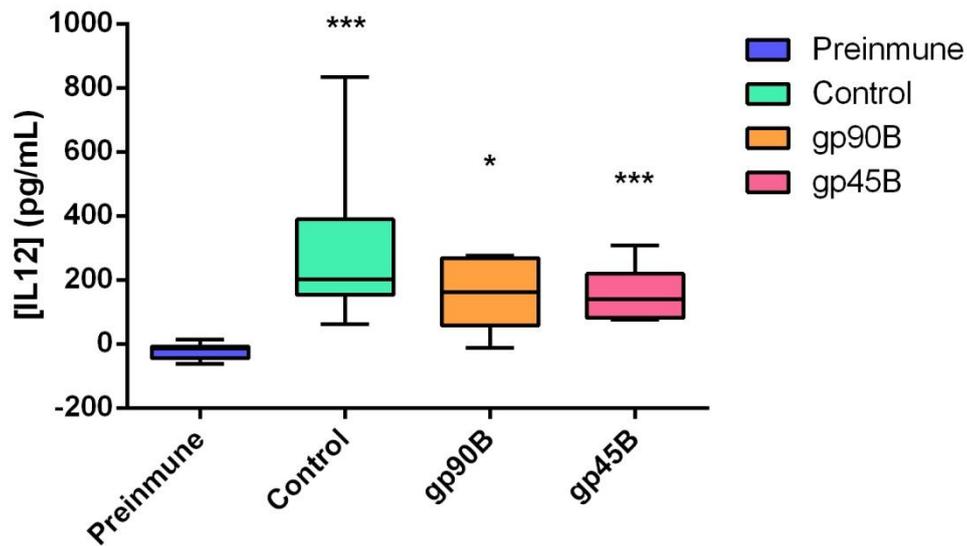


Fig. 2: Índices medios de proliferación de los tres grupos ensayados.

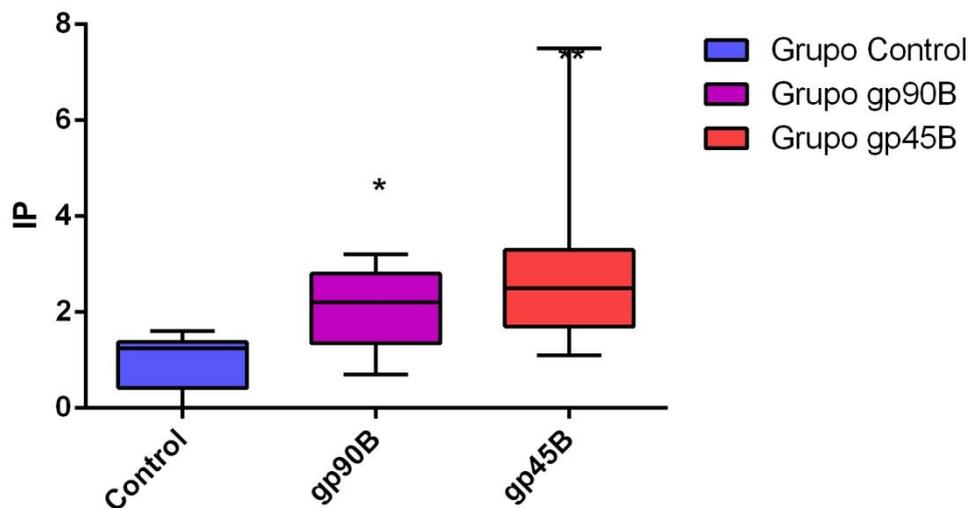


Fig. 3: Concentración de IL-12 (pg/mL) en suero murino muestreado el día 84 del plan de inmunización.

Si bien podemos confirmar el carácter inmunogénico de ambos péptidos, no tenemos certeza que la respuesta inmune celular pueda estar asociada a la producción de IL-12. En efecto, la mayor producción de IL-12 respecto de los valores encontrados en los sueros pre inmunes puede estar asociada tanto al adyuvante como a los péptidos inoculados. A partir del presente trabajo se ha demostrado que ambos péptidos sintéticos, gp90B y gp45B, son inmunogénicos en especie murina, pudiendo ser potenciales candidatos vacunales. Estudios complementarios permitirán analizar la capacidad de estos péptidos de inducir una respuesta citotóxica asociada al perfil Th1.

BIBLIOGRAFÍA BÁSICA

Craig J.K., Barnes S., Cook S.J., Issel C.J. y Montelaro R.C., 2010. Divergence, not diversity of an attenuated equine lentivirus vaccine strain correlates with protection from disease. *Vaccine*. Nov 29;28(51):8095-104.

Leroux C., Cadoré J.L., Montelaro R.C., 2004. Equine Infectious Anemia Virus (EIAV): what has HIV's country cousin got to tell us?. *Vet Res*. Jul-Aug; 35(4):485-512.

Montelaro R.C., Parekh B., Orregoll A., Issel C.J., 1984. Antigenic Variation during Persistent Infection Anemia Virus, a Retrovirus. *J Biol Chem*. Aug 25;259(16):10539-44.

Soutullo A., 2008. Tesis Doctoral: Estudio de la capacidad antigénica e inmunogénica de péptidos sintéticos correspondientes a epitopes conservados de las proteínas estructurales del Virus de la Anemia Infecciosa Equina. Ministerio de la Producción de Santa Fe-UNL.

Soutullo A., Verwimp V., Riveros M., Pauli R., Tonarelli G., 2001. Design and validation of an ELISA for equine infectious anemia (EIA) diagnosis using synthetic peptides. *Vet Microbiol*. Mar 20;79(2):111-21.

Nombre del archivo: Resumen_Herzfeld_Ciencias_Biológicas.