

ESTUDIO DE COMPLEJOS INMUNOESTIMULANTES LIBRES DE ANTIGENO EN UN MODELO MURINO

SATLER, FLORENCIA

Laboratorio de Inmunología Experimental de la Universidad Nacional del Litoral

Director/a: Dra. Reidel, Ivana

Codirector/a: Dra. Veaute, Carolina

Área: Ciencias de la salud.

Palabras claves: Inmunoestimulante, *Gemini*, ODN-CpG.

INTRODUCCIÓN

La estimulación inespecífica del sistema inmune resulta una estrategia interesante para la profilaxis y el tratamiento precoz de infecciones en numerosas circunstancias. Este tipo de inmunización resulta particularmente útil frente a brotes de infecciones para las que no hay vacunas o cuando se necesita generar una protección rápida frente a una posible próxima exposición a agentes patógenos y no se dispone del tiempo necesario para que una vacuna genere inmunidad protectora.

Los inmunoestimulantes son un grupo heterogéneo de compuestos que inducen una activación inespecífica del sistema inmune. Estos compuestos pueden incrementar diferentes mecanismos efectores de la respuesta inmune como, por ejemplo: fagocitosis y muerte intracelular de microorganismos, presentación antigénica, actividad citotóxica y antiviral, producción de citoquinas y otros mediadores, y producción de anticuerpos (Sellon y Long, 2014).

Los inmunoestimulantes incluyen una amplia variedad de productos, que van desde mezclas complejas de lisados bacterianos, extractos semi purificados de productos bacterianos, animales o vegetales, hasta compuestos sintéticos (Puggioni et al., 2019). Un grupo numeroso está constituido por moléculas que se encuentran presentes en microorganismos (PAMPs, del inglés: Pathogen Associated Molecular Pattern) que son reconocidos por receptores presentes en células de la inmunidad innata, receptores de Reconocimiento de Patrones (RRP).

Un inmunoestimulante ampliamente descrito son los oligonucleótidos con motivos CpG no metilados (ODN-CpG), que actúan a través de la interacción con el receptor endosomal TLR9. Su capacidad inmunoestimulante está asociada a su semejanza con los dinucleótidos CG no metilados presentes con alta frecuencia en el ADN procarionta. Otro aspecto importante en la administración de inmunoestimulantes está relacionado con los vehículos empleados, el uso de carriers adecuados previene la degradación y aumenta la estabilidad, favorece la fagocitosis y puede mejorar el tránsito intracelular de las moléculas transportadas (Sahdev et al., 2014).

Nuestro grupo desarrolló un sistema de transporte constituido por lipopéptidos de tipo *Gemini*. Su estructura se genera por la unión de dos lipopéptidos monoméricos (AGn-Cm)₂, cada uno de ellos formado por una cabeza polar constituida por un péptido corto (AGn) y una cola hidrofóbica formada por un ácido graso (Cm, donde m es el número de carbonos), unida al extremo N-terminal del péptido. Una cisteína en el péptido puede formar un puente disulfuro con otro monómero y generar el lipopéptido *Gemini* por dimerización a pH fisiológico (Grippio, 2020).

En resumen, el uso de formulaciones compuestas por moléculas puras, reproducibles y de sencilla obtención resulta una propuesta atractiva para la estimulación de la respuesta inmune. La utilización de vehículos adecuados para su administración

Título del proyecto: Estudio de complejos inmunoestimulantes como potenciadores de la respuesta inmune natural contra infecciones. Instrumento: CAID.

Año convocatoria: 2020 Organismo financiador: UNL Directora: Carolina Veaute

podría mejorar su efectividad y reducir la cantidad de inmunoestimulante por dosis o el número de dosis.

OBJETIVOS

- Obtención y caracterización de formulaciones basadas en ODN-CpG y diferentes lipopéptidos de tipo *Gemini*.
- Evaluación de la capacidad de las formulaciones obtenidas de estimular células inmunes extraídas de bazo murino *in vitro*.

METODOLOGÍA

Se estudió en particular cuatro lipopéptidos de tipo *Gemini*: AG2-C16, AG2-C18, AG10-C16 y AG10-C18, los cuales están formados por un sector polar compuesto por un péptido catiónico, de 4 a 7 aminoácidos, con al menos un residuo de cisteína, y un sector no polar compuesto por una cadena hidrofóbica de 16 carbonos saturada (palmítica) o 18 carbonos insaturada (oleica). Estos lipopéptidos fueron diseñados y sintetizado por el grupo de investigación del Laboratorio de Química Aplicada (LaQuimAp), de la FBCB, UNL. Se utilizó un ODN-CpG específico para murinos, con secuencia 5'-tccatgacgttctctgacgtt-3', que fue sintetizado con enlaces naturales de tipo fosfodiéster por Invitrogen (Waltham, MA, USA).

Para la preparación de las formulaciones se utilizó el ODN-CpG a una concentración final de 3,75 nmol/mL, que se mezcló volumen a volumen con los distintos lipopéptidos monoméricos. Se evaluaron distintas concentraciones de *Gemini*, según la relación N/P que se quiso obtener en la formulación, siendo N la cantidad de nitrógeno que aporta el *Gemini* y P la cantidad de fósforo que brinda el ODN-CpG. Las formulaciones se prepararon en Buffer Fosfato Salino (PBS).

Se evaluó la encapsulación del ODN-CpG por electroforesis en gel de agarosa 2%, considerando que la formación del complejo reduce la migración y fluorescencia del oligonucleótido. A partir de este análisis, se obtuvieron las relaciones óptimas para lograr encapsulación con cada *Gemini* (Tabla 1). Las relaciones óptimas se definieron como las dos relaciones menores en las que se observó encapsulación del ODN-CpG. Estas relaciones fueron estudiadas posteriormente *in vitro*. De esta manera se logró minimizar la concentración de lipopéptido requerida, lo que representa un menor riesgo de citotoxicidad, beneficios para escalar el producto y menor costo de la formulación. Como se observa en la Tabla 1, todos los lipopéptidos estudiados, a excepción del *Gemini* AG10-C18, lograron encapsular al ODN-CpG en las relaciones estudiadas.

Tabla 1: Formulaciones que se estudiaron *in vitro*

Formulación	<i>Gemini</i>	N/P
I	AG2-C16	5
II	AG2-C16	10
III	AG2-C18	5
IV	AG2-C18	10
V	AG10-C16	15
VI	AG10-C16	20

Para analizar la capacidad de estas formulaciones de activar células inmunes *in vitro*, se obtuvieron las células totales de bazo de ratón hembra BALB/c (sin tratamiento previo) que fueron sometidas a tratamiento con buffer de lisis para glóbulos rojos (ACK 1X). Las células obtenidas fueron sembradas en una densidad de 1.10^6 cél/mL de medio RPMI completo en placas de 6 pocillos. Cada pocillo fue estimulado alternativamente con las formulaciones detalladas en la Tabla 1, así como con sus

componentes individuales, a 37°C en atmósfera con 5% de CO₂ durante 2 horas. Como control positivo de estimulación se utilizó el mitógeno pokeweed (PWM) y como control negativo el medio de cultivo (basal).

Finalizado el cultivo, se recuperaron las células y se procedió a la extracción de ARN mediante purificación con Trizol™, seguida de transcripción reversa utilizando la enzima MMLV y hexanucleótidos al azar. A partir del ADNc obtenido se realizó una cuantificación relativa de los niveles de expresión de 4 genes de interés: IFN-γ, TNF-α, IL-6 y CD-80 por PCR en tiempo real (qPCR), utilizando oligonucleótidos específicos de diseño propio, para cada una de estas secuencias. El producto se detectó mediante el colorante intercalante EvaGreen. Las muestras se normalizaron a la expresión del gen control (housekeeping, HK), GAPDH y se informaron en relación a las muestras basales (sin estimular) según el método $\Delta\Delta CT$: $2^{-\Delta\Delta CT} = 2^{-(\Delta CT_{muestra} - \Delta CT_{basal})}$, donde $\Delta CT = CT_{gen\ de\ interés} - CT_{HK}$ para cada condición evaluada. En la Figura 1 se presentan los valores de $2^{-\Delta\Delta CT}$ obtenidos para cada gen de interés, por cada formulación *Gemini*+ODN-CpG y los componentes individuales de las mismas. Los resultados se expresaron como mediana \pm rango intercuartil (RI), debido a no se ajustan a una distribución normal. Se considera que la expresión de un gen está aumentada respecto a la condición basal cuando $2^{-\Delta\Delta CT} \geq 2$, este valor de corte se encuentra indicado con una línea roja en cada gráfico.

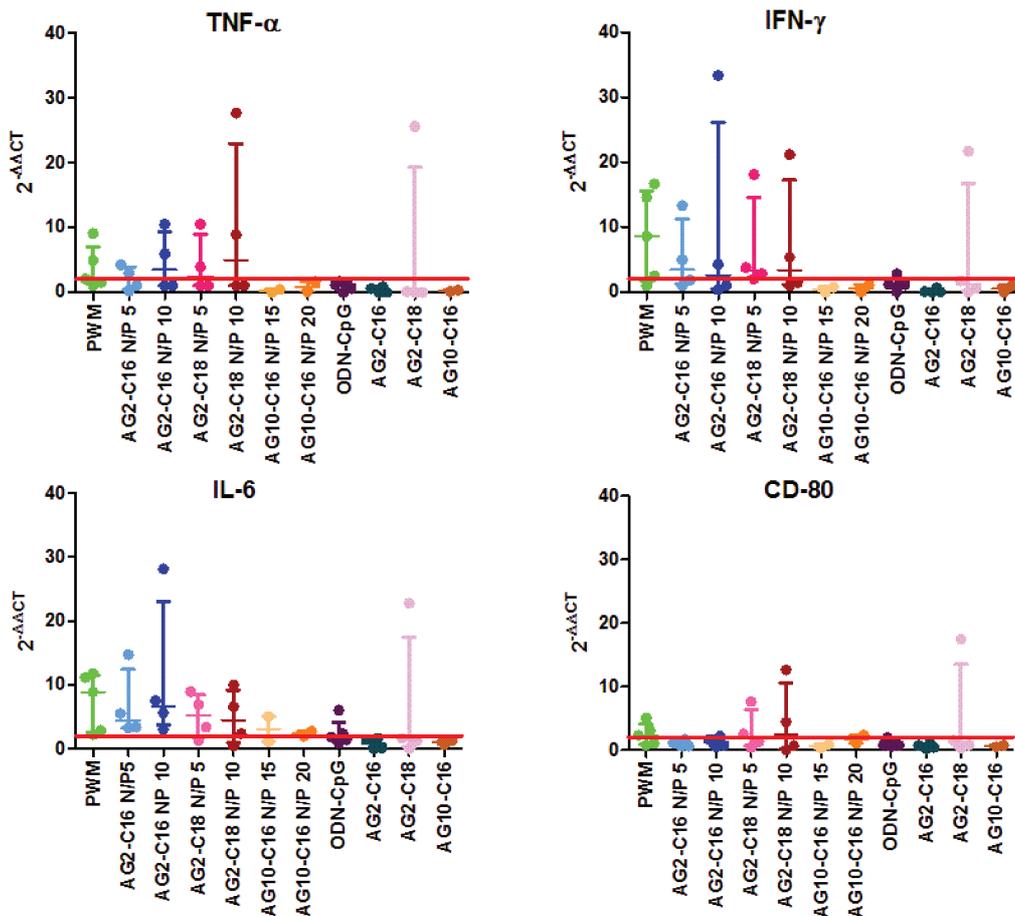


Figura 1: Expresión de TNF-α, IFN-γ, IL-6 y CD-80 *in vitro*



Tanto la expresión de TNF- α como la de IFN- γ se ven aumentadas en las formulaciones de ODN-CpG con los *Gemini* AG2-C16 en relación N/P 10 y AG2-C18 en ambas relaciones, siendo mayor para este último lipopeptido. El *Gemini* AG2-C16 N/P 5 presenta aumento de la expresión de IFN- γ . Además, se observa que a mayor relación N/P para cada uno de estos lipopéptidos, mayor sería la expresión de estas citoquinas. Por otro lado, las formulaciones ODN-CpG+AG10-C16 no evidenciaron un aumento en la expresión de TNF- α e IFN- γ , al igual que los componentes individuales de todas las formulaciones (los *Gemini* libres y ODN-CpG libre).

Por su lado, la expresión de IL-6 se ve aumentada en las formulaciones de ODN-CpG con los tres *Gemini* estudiados. Mientras que la expresión de CD-80 se vio aumentada sólo en las formulaciones de ODN-CpG+AG2-C18.

Asimismo, se debe resaltar que el ODN-CpG libre no fue capaz de inducir la expresión de los genes evaluados, sin embargo, se observa estimulación cuando es combinado con los *Gemini*. Esto podría deberse a que los enlaces fosfodiéster son susceptibles a la acción de ADNsas o que el ADN libre no es capaz de ingresar eficientemente a las células.

Por último, se debe aclarar que la dispersión observada en los resultados puede deberse a que el ARN, molécula estudiada, es inestable y no se acumula en la célula, por lo que el tiempo de estimulación resulta crítico. Además, la presencia de contaminantes como proteínas, polisacáridos y ADN genómico pueden desafiar su purificación e interferir con la qPCR (Fainboim y Geffner, 2011; Erikçi et al., 2011).

CONCLUSIONES

Los *Gemini* AG2-C16, AG2-C18 y AG10-C16 encapsularon al ODN-CpG en las relaciones N/P estudiadas, sirviendo como vehículo para transportar la secuencia de oligonucleótidos. Por el contrario, AG10-C18 no logro encapsular el ODN-CpG.

Los resultados de los cultivos *in vitro*, pese a la alta variabilidad entre los mismos, demostraron que las formulaciones ODN-CpG+*Gemini*, principalmente de los lipopéptidos AG2-C18 y AG2-C16, indujeron la expresión de las citoquinas IFN- γ , TNF- α e IL-6, indicando que las mismas son capaces de estimular esplenocitos. La respuesta celular inducida por las formulaciones ODN-CpG+*Gemini* presentó un aumento progresivo conforme se incrementa la relación N/P en estudio.

En conjunto, estos resultados representan una primera evidencia de que el uso de formulaciones basada en dos moléculas puras, lipopéptidos *Gemini* y ODN-CpG, podrían ser capaces de inducir una estimulación inespecífica del sistema inmune.

BIBLIOGRAFÍA BÁSICA

Fainboim, L., Geffner, J., 2011. Introducción a la inmunología humana, 6ta ed. Médica Panamericana. Buenos Aires, Argentina.

Grippo, L.D., Reidel, I.G., García, M.I., Streu, A., Müller, D.M., Veaute, C.M., 2020. *Gemini* lipopeptides as vaccine adjuvants: a new role for these versatile carriers. 9(2):159-163.

Erikçi, E., Gursel, M., Gürsel, I., 2011. Differential immune activation following encapsulation of immunostimulatory CpG oligodeoxynucleotide in nanoliposomes. *Biomaterials*; 32(6):1715-1723

Puggioni, F., Alves-Correia, M., Mohamed, M.F., Stomeo, N., Mager, R., Marinoni, M., Racca, F., Paoletti, G., Varricchi, G., Giorgis, V., Melioli, G., Canonica, G.W., Heffler, E., 2019. Immunostimulants in respiratory diseases: focus on Pidotimod. *Multidiscip Respir Med.*; 4; 14:31.

Sahdev, P., Ochyl, L.J., Moon, J.J., 2014. Biomaterials for nanoparticle vaccine delivery systems. *Pharm Res*; 31(10):2563-82.

Sellon, D., Long. M. T., 2014. *Equine Infectious Diseases (Second Edition)*. Elsevier. Missouri.