

# Lípidos liposomales como inmunoadyuvantes del factor de crecimiento epidérmico humano recombinante y de los alérgenos principales del ácaro *Dermatophagoides siboney*

✉ María del C Luzardo<sup>1</sup>, Lesly Calderón<sup>1</sup>, Yohanka Martínez<sup>1</sup>, Alexis Labrada<sup>2</sup>, Elisa Facenda<sup>2</sup>, Carlos M Álvarez<sup>1</sup>, Isabel F Pazos<sup>1</sup>, Joel de León<sup>3</sup>, María E Alonso<sup>1</sup>, María E Lanio<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Centro de Estudio de Proteínas (CEP), Facultad de Biología, Universidad de La Habana  
Calle 25 # 455, e/ J e I, Vedado, Habana 4, Ciudad de La Habana, CP 10 400  
E-mail: mcluzardo@fbio.uh.cu

<sup>2</sup>Centro Nacional de Biopreparados (BIOCEN)

<sup>3</sup>Centro de Inmunología Molecular (CIM)

## RESUMEN

En esta investigación se estudió la influencia de la composición lipídica en la capacidad inmunomoduladora de las vesículas liposomales. Para ello se emplearon liposomas de fosfatidilcolina (PC), de diferente naturaleza, y colesterol, como adyuvantes del factor de crecimiento epidérmico humano recombinante (EGFhr), conjugado o no a la proteína transportadora P64k de *Neisseria meningitidis*, y liposomas de dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC), que contenían o no colesterol para encapsular alérgenos (maDer s) y *sticholisina* II (StII), una proteína formadora de poros de *Stichodactyla helianthus*. Al estudiar la respuesta inmune anti-EGFhr, se evidenció la inducción de títulos de anticuerpos elevados, la promoción de IgG2a e IgG2b, las respuestas de hipersensibilidad retardada y la linfoproliferación, así como un incremento en la supervivencia frente al tumor ascítico de Ehrlich de los ratones inmunizados, aun en ausencia de la P64k. Esta respuesta fue superior para los liposomas constituidos por fosfatidilcolinas saturadas, en comparación con una insaturada (soya: sPC) y con la alúmina. También se demostró que la respuesta humoral alérgeno-específica dependió de la composición lipídica liposomal y de la presencia de StII. En los ratones inmunizados con los liposomas que contenían colesterol no se observó respuesta alérgica. Estas preparaciones indujeron elevadas relaciones IgG2a/IgG1, lo que sugiere un patrón Th1. Esta constituye la primera evidencia del efecto inmunomodulador de StII.

## Introducción

La capacidad inmunopotenciadora de los liposomas fue descubierta por Allison y Gregoriadis en 1974, y posteriormente ha sido confirmada para una amplia variedad de antígenos de bacterias, virus, protozoos, tumores y otras fuentes [1]. Sin embargo, no existe un consenso en cuanto a la formulación liposomal con "capacidad adyuvante óptima", debido a que ella está influida por las características físico-químicas de la vesícula (composición lipídica, tamaño, presencia o ausencia de carga superficial), el empleo de adyuvantes adicionales o moléculas coestimuladoras e, incluso, por el esquema de inmunización empleado [2]. Como resultado, se ha sugerido la necesidad del estudio del potencial de los liposomas como adyuvante inmunológico para cada antígeno en particular. En relación con la función de los lípidos liposomales en la capacidad adyuvante de estas vesículas poco se ha informado en la literatura especializada hasta este momento, y los resultados son contradictorios, de manera que constituye un aspecto muy interesante que se debe estudiar.

El factor de crecimiento epidérmico humano recombinante (EGFhr) es un polipéptido que presenta una elevada homología estructural (70%) con la molécula homóloga murina, por lo que resulta un débil inmunógeno para el ratón. Como antecedente de esta investigación [3-6], se detectaron anticuerpos anti-EGFhr en diferentes modelos animales y en humanos, mediante la inmunización con el EGFhr conjugado con toxoide tetánico o con P64k de *Neisseria meningitidis*. Los resultados de estos investigadores permitieron disponer de una amplia caracterización de la respuesta inmune contra este

antígeno, y el diseño de una vacuna terapéutica para el tratamiento de tumores que dependen del sistema EGF/R-EGF. Esta formulación contiene EGFhr conjugado a P64k y montanide ISA 51 o Al(OH)<sub>3</sub> (alúmina) como adyuvante [7]. Las vesículas liposomales pueden constituir una variante muy favorable para la presentación de antígenos poco inmunogénicos o "propios" al sistema inmune. Utilizar un antígeno con estas características, del que además, se ha estudiado la respuesta inmune inducida por él bajo diversas condiciones experimentales, permitió profundizar en la capacidad adyuvante de las vesículas liposomales. En esta dirección, el EGFhr resultó un antígeno modelo atractivo para estudiar las propiedades inmunoestimuladoras de los liposomas, lo cual no se había investigado antes.

El incremento progresivo de las enfermedades alérgicas en la población mundial y principalmente en los países desarrollados, constituye un punto de atención de la comunidad científica. Los ácaros son los principales agentes causales de las enfermedades alérgicas y los del género *Dermatophagoides* son la fuente principal de alérgenos del polvo doméstico. El ácaro *D. siboney*, endémico del Caribe, se encontró en el 85% de las muestras de polvo colectadas en las casas de pacientes asmáticos cubanos. Adicionalmente, los alérgenos principales de este ácaro (maDer s) son reconocidos por el 80 al 90% de los sueros de pacientes alérgicos sensibles a él [8].

A inicios de los años 90 del siglo XX, se realizaron los primeros estudios de encapsulación de alérgenos en vesículas liposomales, con el propósito de potenciar

1. Alving CR, Koulchin Y, Glenn GM, Rao M. Liposomes as carriers of peptide antigens: induction of antibodies and cytotoxic T lymphocytes to conjugated and unconjugated peptides. *Immunol Rev* 1995;145:5-31.

2. Gregoriadis G, Gursel I, Gursel M, McCormack B. Liposomes as immunological adjuvants and vaccine carriers. *J Control Release* 1996;41:49-56.

3. González G, Sánchez B, Suárez E, Beausoleil I, Pérez O, Lastre M, et al. Induction of immune recognition of self epidermal growth factor (EGF): effect on EGF-biodistribution and tumor growth. *Vaccine Res* 1996;5(Suppl 4):233-44.

4. González G, Pardo OL, Sánchez B, García JL, Beausoleil I, Marinello P, et al. Induction of immune recognition of self-epidermal growth factor II: characterization of the antibody response and the use of a fusion protein. *Vaccine Res* 1997;6(Suppl 2):91-100.

5. González G, Crombet T, Catalá M, Mirabal V, Hernández JC, González Y, et al. A novel cancer vaccine composed of human-recombinant epidermal growth factor linked to a carrier protein: Report of a pilot clinical trial. *Annals Oncol* 1998;9:431-5.

6. González G, Crombet T, Torres F, Catalá M, Alfonso L, Osorio M, et al. Epidermal growth factor-based cancer vaccine for non-small-cell lung cancer therapy. *Ann Oncol* 2003;14:461-6.

7. Lage A, González G, Sánchez B, Suárez E, Beausoleil I, Núñez G (inventores). Composición vacunal del factor de crecimiento epidérmico autógeno con actividad antitumoral. Patente Cuba; 1997:22 477.

la inmunoterapia alérgico-específica, la cual constituye el tratamiento más efectivo contra las enfermedades alérgicas. Estas afecciones se caracterizan por una superproducción de citoquinas típicas de la respuesta mediada por linfocitos T CD4<sup>+</sup> cooperadores tipo 2 (Th2). Las estrategias inmunoterapéuticas que favorecen las respuestas mediadas por linfocitos Th1 (adyuvantes promotores de respuesta Th1 junto a los alérgenos) resultan las más beneficiosas para el tratamiento de estas enfermedades [9]. Los liposomas son vehículos seguros y eficaces para este tipo de terapia, ya que posibilitan la incorporación, junto al antígeno, de otras moléculas inmunomoduladoras como algunas citolisinas de microorganismos para el desvío de la respuesta inmune a un patrón Th1 o mediada por células [10]. La Sticholisina II (StII) es una citolisina aislada de la anémona de mar *Stichodactyla helianthus*, la cual se ha estudiado en nuestro laboratorio, y presenta una gran homología funcional con las proteínas formadoras de poros de bacterias. De manera que resulta interesante su inclusión en liposomas de conjunto con los alérgenos (maDer s) para estudiar la posible capacidad moduladora de las vesículas que la contienen.

Tomando en consideración estos antecedentes, se pusieron como objetivos:

1. Evaluar la encapsulación y la retención del EGFhr conjugado o no a la proteína transportadora P64k, en liposomas constituidos por fosfatidilcolina de diferente naturaleza y obtenidos a partir de varios procedimientos, así como estudiar la respuesta inmune anti-EGFhr inducida en ratones, comparándola con la obtenida con el adyuvante convencional Al(OH)<sub>3</sub>.

2. Estudiar la capacidad inmunomoduladora de liposomas que contienen o no colesterol y StII, y encapsulan los alérgenos principales (maDer s) de *D. siboney*.

## Materiales y métodos

El EGFhr y la proteína recombinante P64k de *Neisseria meningitidis* se obtuvieron en el Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología (CIGB) [11, 12]. El extracto del ácaro *D. siboney* (referencia interna DSB 7031) y los alérgenos (maDer s) parcialmente purificados a partir de su extracto, se produjeron en el Departamento de Alérgenos, del Centro Nacional de Biopreparados (BIOCEN). La concentración de Der s I en ambos preparatos alérgicos, se determinó mediante un ELISA cuantitativo tipo sándwich, usando anticuerpos monoclonales anti-Der s I [13]. Sticholisina II (StII) se aisló y purificó a partir de la anémona de mar *Stichodactyla helianthus* en el Centro de Estudios de Proteínas (CEP), de la Facultad de Biología [14].

### Obtención de los liposomas

Mediante el procedimiento de deshidratación-rehidratación (DRVs) [15], se prepararon liposomas de dimiristoilfosfatidilcolina (DMPC), dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC), diestearoilfosfatidilcolina (DSPC), fosfatidilcolina de soya (sPC) o fosfatidilcolina de yema de huevo (ePC) y colesterol (Cho) (relación molar fosfolípido:Cho de 1:1). Las proteínas se adicionaron en las siguientes proporciones: fosfolípido: EGFhr de 32 μmol: 300 μg (para los liposomas que contenían EGFhr o EGFhr-P64k), fosfolípido: P64k de 32 μmol:

30 μg, fosfolípido: maDer s de 16 μmol: 36 μg (para liposomas de DPPC) o de 16 μmol: 80 μg (para liposomas de DPPC y DPPC:Cho). Las vesículas de DPPC y DPPC:Cho que contenían StII, se prepararon según la relación fosfolípido: maDer s: StII de 16 μmol: 80 μg: 10 μg. Para obtener las vesículas unilaminares grandes (LUV), los DRV de DPPC:Cho sin purificar se extruyeron 5 veces por membranas de policarbonato de 400 nm a más de 45 °C.

También se prepararon MLV con 16 μmoles de ePC y de Cho y 0.025 μmoles de EGFhr. A las vesículas sonicadas en baño ultrasónico con intervalos de 2 minutos de sonicación y 1 minuto de descanso, se les añadió trealosa, sacarosa, maltosa o glucosa en una relación masa: masa azúcar: fosfolípido de 0.5:1, y luego se deshidrataron a vacío por 24 horas. Su hidratación se realizó con PBS.

Se obtuvieron también liposomas FATMLV de DPPC:Cho (relación molar 1:1) mediante congelación-descongelación [16], con el empleo de 5 ciclos de congelación en nitrógeno líquido y descongelación a más de 45 °C. Los lípidos se hidrataron durante 1 hora a T > 45 °C con EGFhr, P64k, o EGFhr-P64k en PBS. El material no encapsulado en los liposomas se separó mediante ultracentrifugación. Se realizaron dos lavados adicionales con PBS, y finalmente, se resuspendieron en esa misma solución tampón.

### Marcaje de las proteínas con <sup>125</sup>I

Por el método de la cloramina T, se yodaron EGFhr, P64k, maDer s y StII [17].

### Conjugación del EGFhr a la proteína P64k

Se empleó glutaraldehído (concentración final de 0.05% en una relación vol/vol) [3]. La mezcla de reacción se purificó mediante filtración en gel de Sephadex G-50 medio, a 12 mL/h, en una columna de 60 x 1 cm, equilibrada con PBS. Para los estudios se escogieron las fracciones de mayor radiactividad del primer pico. Para los experimentos de inmunización, el conjugado se preparó en ausencia del radiotrazador y, una vez concluida la reacción, se dializó contra PBS durante 24 horas.

### Determinación de la eficiencia de encapsulación de las proteínas en liposomas

Para determinar el porcentaje de encapsulación en DRV, FATMLV y LUV se utilizaron como radiotrazadores: EGFhr-<sup>125</sup>I, P64k-<sup>125</sup>I, EGFhr-<sup>125</sup>I-P64k, maDer s-<sup>125</sup>I y StII-<sup>125</sup>I, en una dosis de 100 000 cpm, según correspondía. La radiactividad de las vesículas se registró antes y después de su separación por centrifugación. El porcentaje o rendimiento de encapsulación se determinó a partir de la radiactividad total de los sobrenadantes y del precipitado final.

### Determinación de la capacidad de retención del contenido de los liposomas

Las vesículas se almacenaron a 4 °C, y a las 24 horas o semanalmente durante un mes se evaluó la cantidad de proteína retenida. En cada ocasión se tomaron alícuotas de las suspensiones para registrar la radiactividad total y luego se ultracentrifugaron para el registro de la radiactividad de los sobrenadantes.

8. Ferrándiz R, Casas R, Dreborg S, Einarsson R, Bonachea I, Chapman M. Characterization of allergenic components from house dust mite *Dermatophagoides siboney*. Purification of Der s1 and Der s2 allergens. *Clin Exp Allergy* 1995;25:929-34.

9. Grönlund H, Vrtala S, Wiedemann U, Dekan G, Kraft D, Valenta R, et al. Carbohydrate-based particles: a new adjuvant for allergen-specific immunotherapy. *Immunology* 2002;107:523-9.

10. Dietrich G, Vireta JF, Gentschev I. Haemolysin A and listeriolysin - two vaccine delivery tools for the induction of cell-mediated immunity. *Int J Parasitol* 2003;33:495-505.

11. Cinza AM, Quintana M, Lombardero J, Poutou R, Pérez E, Pérez LC, et al. Establecimiento de un cultivo discontinuo para la producción del factor de crecimiento epidérmico humano en levaduras, caracterización del producto. *Biotech Apl* 1991;8:166-73.

12. Guillén G, Silva R, Álvarez A, Coizeau E, Novoa L, Selman M, et al. Cloning and expression of a high molecular weight protein (PM-6) from the *Neisseria meningitidis* strain B:4:P1.15. Evaluation of the immunogenicity and bactericidal activity of antibodies raised against the recombinant protein. In: Conde CJ, et al., editors. *Pathology and Immunobiology of Neisseriaceae*. México: INSP, 1994:834-40.

13. Sewer M, Uyema K, Labrada M, González M, Coca M. Monoclonal antibodies against Der s 1, a major allergen of *Dermatophagoides siboney*. *Int Arch Allergy Immunol* 2000;123:242-8.

14. Lanio ME, Morera V, Álvarez C, Tejuca M, Gómez T, Pazos F, et al. Purification and characterization of two hemolysins from *Stichodactyla helianthus*. *Toxicol* 2001;39:187-94.

15. Kirby C, Gregoriadis G. Dehydration-rehydration vesicles (DRV): A new method for high yield drug entrapment in liposomes. *Biotechnology* 1984;2:979-84.

16. Mayer LD, Hope MJ, Cullis PR, Janoff AS. Solute distributions and trapping efficiencies observed in freeze-thawed multilamellar vesicles. *Biochim Biophys Acta* 1985;817(Suppl 1):193-6.

17. Hunter WM, Greenwood F. Preparation of iodine-131 labeled human growth hormone of high specific activity. *Nature* 1962;191:495-8.

### Liberación del EGFhr encapsulado en liposomas en presencia de plasma

Se encapsularon 80 mM de carboxifluoresceína (CF) en DRV de ePC:Cho (26  $\mu$ moles de lípidos totales, relación molar 1:1) que contenían o no 0.02  $\mu$ moles de EGFhr. A los liposomas se les adicionó plasma fresco de ratón o PBS (control) en una relación liposoma: plasma/PBS de 1:5 (vol/vol). En un espectrofluorímetro Shimadzu RF-540 ( $\lambda_{exc} = 490$  nm,  $\lambda_{em} = 520$  nm), se estimó la liberación de CF.

### Determinación del tamaño de los liposomas

Las preparaciones liposomales se analizaron mediante espectroscopía de correlación fotónica, con el empleo de un equipo Malvern Autosizer 2C, con un láser de helio/neón de 5 mW.

### Análisis de la transición de fase de los liposomas mediante calorimetría diferencial de barrido de elevada sensibilidad

Se prepararon DRV de DPPC y DSPC con EGFhr encapsulado. Se utilizaron vesículas iguales que no contenían EGFhr como control. Se pesaron 100 mg de cada preparación y se determinó la Tc y la variación de entalpía ( $\Delta H$ ) de la transición de fase, con un microcalorímetro diferencial de barrido de elevada sensibilidad Micro-DSC III SETARAM.

### Evaluación de las respuestas inmunes anti-EGFhr y anti-alergeno inducidas con el empleo de liposomas como adyuvantes

Se emplearon preparaciones liposomales recién obtenidas. Se inmunizaron ratones Balb/c y NMRI hembras, obtenidos en el CENPALAB, de 6 a 8 semanas de nacidos y con un peso promedio entre 18 y 20 g, por las vías intramuscular (i.m.) o intraperitoneal (i.p.), en un esquema de dos dosis: 0 y 28 días con el EGFhr, y 0 y 14 días con maDer s. La sangre se extrajo del plexo de la cavidad retrorbital o por punción cardíaca.

### Influencia del esquema de inmunización en la respuesta inmune anti-EGFhr

Se emplearon ratones Balb/c (6 animales/grupo). Se prepararon liposomas DRV de DPPC:Cho, que encapsulaban EGFhr o EGFhr-P64k. En los animales inmunizados con Al(OH)<sub>3</sub> se utilizaron 2 mg de este adyuvante por dosis. Para la preparación del inmunógeno se mezclaron, mediante agitación continua durante 30 minutos, 533  $\mu$ L de Al(OH)<sub>3</sub> 30 mg/mL con 0.013  $\mu$ moles de EGFhr (Al(OH)<sub>3</sub>/EGFhr) o un volumen de conjugado equivalente a 0.013  $\mu$ moles de EGFhr (Al(OH)<sub>3</sub>/EGFhr-P64k). Se determinaron los títulos de anticuerpos anti-EGFhr (IgG) en los plasmas de los animales a los 14, 40 y 90 días y las subclases de IgG a los 40 días.

### Respuesta inmune anti-EGFhr inducida con liposomas DRV de distinta composición fosfolipídica

Se inmunizaron ratones NMRI (7 animales/grupo) con 10  $\mu$ g de EGFhr-P64k en DRV de DPPC:Cho, DSPC:Cho y sPC:Cho. Como control se utilizó Al(OH)<sub>3</sub>/EGFhr-P64k, y para su preparación se mezclaron 933  $\mu$ L de Al(OH)<sub>3</sub> 30 mg/mL con un volumen de conjugado equivalente a 0.023  $\mu$ moles

de EGFhr. A los 40 días se determinaron las subclases de IgG. Además, se estudió la capacidad de los anticuerpos de inhibir la unión del EGFhr a su receptor (R-EGF) en membranas de placenta humana, a los 90 días.

### Respuesta inmune anti-maDer s inducida con liposomas de DPPC que contienen o no colesterol y StII

Se inmunizaron ratones Balb/c (6 animales/grupo) por vía i.p., con una cantidad de maDer s que contenía 5  $\mu$ g de Der s 1, adsorbida en Al(OH)<sub>3</sub> (600  $\mu$ g/dosis) o encapsulada en liposomas de DPPC o de DPPC:Cho. Se determinaron los niveles de IgG total, IgG1, IgG2a e IgE maDer s-específicos a los 0, 14 y 28 días.

En otro experimento, ratones Balb/c (4 animales/grupo), inmunizados de forma similar, se sometieron a desafíos alérgicos repetidos, durante 21 días después de la primera dosis. Para ello, los animales se colocaron en una cámara (18 x 12 x 21 cm) y expuestos 30 minutos durante 6 días, a aerosoles de una solución de extracto alérgico de *D. siboney* de concentración de Der s 1 de 100  $\mu$ g/mL. Veinticuatro horas posteriores al último reto, los animales se desangraron para la estimación del número de eosinófilos en sangre periférica y extraídos sus pulmones para análisis histopatológico.

Para la evaluación de la respuesta humoral anti-maDer s en presencia de StII, se inmunizaron ratones Balb/c (6 animales/grupo) de forma similar con maDer s que contenía 5  $\mu$ g de Der s 1, encapsulada junto a la StII en liposomas de DPPC y DPPC:Cho. La dosis de StII que recibieron fue de 1.4 y 1.3  $\mu$ g, respectivamente. A los 28 días de la primera inmunización, se desangraron los animales y se obtuvieron los sueros para la determinación de IgG total, IgG1 e IgG2a alérgeno-específicas.

### Ensayo de hipersensibilidad retardada (HR)

Para el ensayo de hipersensibilidad retardada (HR), se utilizaron tres grupos de ratones NMRI (n = 10), que se inmunizaron con 10  $\mu$ g de EGFhr o de EGFhr-P64k en DRV de DPPC:Cho o en Al(OH)<sub>3</sub>. Para estudiar la respuesta de HR, se retaron los animales en el cojinete de la pata izquierda, con 5  $\mu$ g de EGFhr en PBS (vol = 50  $\mu$ L), a los 7 días de la segunda dosis. Cuatro animales de cada grupo (control) se retaron con 5  $\mu$ g de albúmina de suero bovino (BSA) en PBS. La inflamación se midió a 0 y 48 h después del reto, con un pletismómetro 7150 UGO BASILE, y se calculó como la diferencia entre ambas lecturas. Para el análisis histopatológico se empleó la técnica de doble tinción con hematoxilina-eosina.

### Ensayo de proliferación celular *in vitro* de linfocitos aislados de ratón

Para el ensayo de proliferación celular *in vitro* de linfocitos aislados de ratón se inmunizaron ratones Balb/c, con 10  $\mu$ g de EGFhr o de EGFhr-P64k, en Al(OH)<sub>3</sub> (2 mg/dosis) o en DRV de DPPC:Cho (1:1). Las preparaciones que contenían Al(OH)<sub>3</sub> se obtuvieron con 0.015  $\mu$ mol de EGFhr o de EGFhr-P64k y 900  $\mu$ L de Al(OH)<sub>3</sub> (30 mg/mL). A los 12 días de la segunda inmunización, se extrajeron y perfundieron los ganglios inguinales de tres ratones

de cada grupo. En pozos triplicados de placas Costar de 96 pozos de fondo plano, se añadieron  $3 \times 10^5$  células/pozo (100  $\mu$ L) en medio de cultivo RPMI 1640 suplementado con suero fetal de ternera (SFT) 10% (Gibco). Las células se estimularon con 9, 18, 37 y 75  $\mu$ g/mL de EGFhr y se cultivaron 96 h a 37 °C en atmósfera de CO<sub>2</sub> al 5%. Se añadió 1  $\mu$ Ci de timidina-<sup>3</sup>H (Amersham), 18 horas antes de finalizar el cultivo. Como control del crecimiento celular basal, se determinó la proliferación inducida por el medio de cultivo en ausencia de antígeno y mitógeno.

#### Ensayo de actividad antitumoral

Semanalmente, durante un mes, se inmunizaron ratones Balb/c (12 animales/grupo) con 50  $\mu$ g de EGFhr en Al(OH)<sub>3</sub> o con 5  $\mu$ g de EGFhr en DRV de DPPC:Cho por la vía intraperitoneal (i.p.). Los grupos control recibieron sólo el adyuvante correspondiente. El reto se realizó con  $2 \times 10^5$  células de tumor ascítico de Ehrlich, 3 días después de la última dosis. Se determinó el incremento de la extensión de vida como la relación del tiempo de supervivencia de los animales inmunizados con respecto al de los animales control.

#### Ensayo de inhibición de la unión EGF/R-EGF por los anticuerpos del suero de ratones inmunizados

A una suspensión de membrana de placenta humana que contenía 400  $\mu$ g de proteínas, se le adicionó 100 000 cpm de EGFhr-<sup>125</sup>I. Luego de incubar durante 1 h a temperatura ambiente con sueros de animales inmunizados o sueros de ratones no inmunizados (control), diluidos 1:5, la reacción se detuvo con 1 mL de PBS y se centrifugó a 3 000 g durante 15 min. Como control positivo se consideró la inhibición de la unión provocada por un exceso de EGFhr no radiactivo (1  $\mu$ g/mL).

#### Estimación del número de eosinófilos en sangre periférica y análisis histopatológico de los pulmones

Veinticuatro horas después del último tratamiento, a los animales desafiados con aerosoles del extracto de *D. siboney*, se les extrajo 10  $\mu$ L de sangre por el plexo retroorbital, y se mezclaron con 200  $\mu$ L de eosina al 1% (Quiméfa). Luego se contaron los eosinófilos en cámara de Neubauer. A los animales sacrificados por dislocación cervical, se les extrajo sus pulmones para evaluar la existencia o no de inflamación peribronquiovascular. Se utilizó la tinción de hematoxilina-eosina.

#### Ensayo de anafilaxia cutánea pasiva

Los niveles de IgE maDer s-específicos se evaluaron mediante un ensayo de anafilaxia cutánea pasiva (PCA) [18]. Se utilizaron ratas machos Wistar (entre 180 y 200 g de peso corporal) provenientes de CENPALAB. Cada muestra de suero se evaluó en tres ratas que se consideraron como réplicas. A cada rata se le inoculó, por vía s.c., en la región dorsal previamente rasurada, 100  $\mu$ L de los *pools* de sueros (semana 4) de los animales inmunizados y diluidos 1:5 en una solución tampón PBS. Pasadas 48 horas, se les inyectó por vía intravenosa a través de la vena del pene, 1 mL de extracto alérgico de *D. siboney* (concentración de Der s 1.500  $\mu$ g/mL) y azul de Evans al 1%, diluidos en PBS. Se promediaron y analizaron los diámetros de

las manchas de la piel de la región dorsal, en cada una de las ratas, como criterio de los niveles de IgE específica existentes en los sueros.

#### Determinación del título de anticuerpos EGFhr y alérgeno-específicos por ELISA

Los niveles de IgG total en los sueros de los animales inmunizados se evaluaron al utilizar un ELISA indirecto no competitivo con el antígeno fijado a la fase sólida. Las placas Costar *high binding* de 96 pozos, se recubrieron toda la noche a 4 °C con 50  $\mu$ L de EGFhr 10  $\mu$ g/mL o con 100  $\mu$ L de extracto de *D. siboney* diluido a una concentración de Der s 1 de 0,7  $\mu$ g/mL, en solución tampón Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>/NaHCO<sub>3</sub> 0.1 M, pH 9.6. Para detectar los niveles de anticuerpos anti-EGFhr y anti-maDer s, se utilizó un conjugado anti-IgG ratón-peroxidasa (Sigma), en una dilución 1:1 000. La absorbancia se midió a 492 nm en un lector de placa Multiskan EX. Como valor de corte se utilizó una absorbancia mayor o igual que 0.2. Para determinar los títulos de IgG1, IgG2a e IgG2b se utilizó un ELISA similar, pero a diferencia de este, se empleó un conjugado anti-subclase de IgG-biotina (PharMingen) 1:5 000. Para la detección se utilizó un conjugado estreptavidina-peroxidasa (PharMingen) 1:2 000.

#### Determinación de los niveles de IgE total en suero

La cuantificación se realizó mediante un equipo de ELISA tipo sándwich, siguiendo las recomendaciones del proveedor (PharMingen). Los niveles de IgE se expresaron en microgramos por mililitros. Las placas se recubrieron con 100  $\mu$ L de una solución del anticuerpo monoclonal anti-IgE total de ratón R35-72, cuya concentración fue de 2  $\mu$ g/mL, diluidos en solución tampón de recubrimiento, durante toda la noche a 4 °C. Los sueros se adicionaron diluidos 1:20 en solución de bloqueo y se depositaron 100  $\mu$ L por pozo, por duplicado. Luego se añadieron diluciones dobles seriadas de un anticuerpo monoclonal IgE de ratón patrón y se incubaron las placas durante 1 h a 37 °C. Seguidamente, después de los lavados, se adicionaron 100  $\mu$ L de una solución del anticuerpo monoclonal anti-IgE de ratón-biotinilado R35-95 a una concentración de 2  $\mu$ g/mL.

#### Determinación de la concentración de proteínas

Se empleó el método de Lowry [19], modificado en nuestro laboratorio. A las muestras y patrones diluidos en NaOH 1 N se les adicionó desoxicolato de sodio al 5%. Se utilizó BSA 1 mg/mL para la curva de calibración.

#### Análisis estadístico

Para el análisis estadístico de los resultados se empleó el paquete de programas Statistica, versión 6.0 (StatSoft, Inc., 2001). Con la finalidad de comprobar si los datos cumplían una distribución normal, se realizó la prueba de Kolmogorov-Smirnov y, a continuación, las pruebas de Bartlett o Levene para determinar la homogeneidad de varianzas. Se realizaron análisis de varianzas (ANOVA) de clasificación simple, modelo de efectos fijos para probar diferencias significativas entre las medias de distintos grupos. Para

18. Mota I, Wong D. Homologous and heterologous passive cutaneous anaphylaxis activity of mouse antisera during the course of immunization. *Life Sci* 1969;8:813.

las comparaciones múltiples se emplearon las pruebas de rangos múltiples de Duncan y de Student-Newman-Keuls. Para probar la igualdad entre las medias de dos muestras independientes se utilizó la prueba *t*; cuando los datos no cumplían con la homogeneidad de varianzas, se empleó la prueba *U* de Mann-Whitney. En el ensayo de actividad antitumoral se utilizó el estimador de la función de supervivencia de Kaplan-Meier. Las comparaciones de los tiempos de supervivencia entre los diferentes tratamientos se realizaron mediante la prueba *log-rank* con el empleo del paquete estadístico SPSS, versión 10.05/1999 (Copyright SPSS Inc.). Todas las pruebas se realizaron con  $p < 0.05$ .

## Resultados y discusión

### Resultados a partir del empleo de EGFhr

El empleo de las vesículas liposomales como adyuvante requiere el estudio previo de las características de estos sistemas para cada antígeno. Para el EGFhr fue necesario definir la metodología, así como la composición lipídica que se debía emplear en la obtención de los preparados liposomales por cuanto no se disponía de antecedentes. De los procedimientos tecnológicos empleados para la encapsulación de EGFhr, los mejores resultados se obtuvieron con la tecnología de deshidratación-rehidratación (DRV), en cuanto a la cantidad de EGFhr atrapado y a la capacidad de las vesículas para retener este antígeno durante su almacenamiento [20, 21].

La encapsulación de EGFhr en vesículas DRV, constituidas por fosfatidilcolinas saturadas o insaturadas y colesterol en proporciones equimolares, demostró que la naturaleza de este fosfolípido es un factor que determina la encapsulación y la capacidad de retención por las vesículas. Las vesículas DRV, constituidas por dipalmitoil fosfatidilcolina y colesterol (DPPC:Cho), exhibieron un rendimiento superior en la encapsulación y capacidad de retención del EGFhr, en comparación con otras preparaciones constituidas por fosfatidilcolinas de diferente naturaleza [20, 21].

La salida de EGFhr de las vesículas DRV durante su almacenamiento, sin que se apreciaran cambios en el tamaño de las partículas, sugirió que la causa de esta liberación podía ser el resultado de la interacción de esta proteína con las bicapas lipídicas, más que la fusión o agregación de los liposomas. La mayor liberación de carboxifluoresceína de las vesículas que contenían el EGFhr coencapsulado, así como la disminución significativa del  $\Delta H$  de la transición de fase en las membranas de DPPC y DSPC que contenían EGFhr, son evidencias de la interacción selectiva de este polipéptido con los fosfolípidos de las membranas liposomales, lo cual provoca, probablemente, la separación de los grupos polares de la zona interfacial de la bicapa y una disminución en las interacciones electrostáticas entre los grupos fosforilcolina de las moléculas fosfolípicas adyacentes [20, 21]. Esta liberación del EGFhr se redujo con la adición de los azúcares sacarosa, trealosa, maltosa y glucosa a las preparaciones liposomales [20, 22]. Este efecto protector ha sido atribuido a que los azúcares reemplazan el agua de hidratación de los grupos polares de los fosfolípidos, y se

establecen enlaces de hidrógeno entre sus grupos fosfato y los hidroxilos de los azúcares [23].

En una segunda etapa del trabajo, se estudió la respuesta inmune anti-EGFhr en ratones con el EGFhr, conjugado o no a la proteína transportadora P64k, y encapsulado en vesículas DRV, en comparación con la obtenida con el adyuvante convencional  $Al(OH)_3$ . La inmunización de ratones Balb/c y NMRI con EGFhr, conjugado o no a P64k y encapsulado en vesículas DRV de DPPC:Cho, indujo una respuesta de títulos elevados de anticuerpos anti-EGFhr (IgG), la mayoría de la subclase IgG1, pero con elevados niveles de IgG2a e IgG2b [24, 25].

La respuesta inmune obtenida contra el EGFhr solo en vesículas DRV de DPPC:Cho, resultó más eficiente que con el empleo de  $Al(OH)_3$  como adyuvante. En los animales que recibieron liposoma/EGFhr se detectaron niveles superiores de anticuerpos (IgG total así como IgG1, IgG2a e IgG2b), una mayor respuesta de proliferación de linfocitos y mayor supervivencia al ser retados con células de tumor ascítico de Ehrlich, en comparación con los animales que recibieron  $Al(OH)_3$ /EGFhr. Además, la encapsulación de EGFhr en liposomas DRV de DPPC:Cho, en ausencia de la proteína transportadora P64k, produjo un efecto similar al obtenido con EGFhr-P64k en liposomas o en  $Al(OH)_3$ , tanto en los niveles de IgG total, como en la respuesta de hipersensibilidad retardada y de linfoproliferación. Estos resultados sugieren que la proteína transportadora P64k no es necesaria para inducir una respuesta inmune anti-EGFhr, cuando este antígeno se administra encapsulado en vesículas liposomales [24-26].

El empleo de fosfatidilcolinas de diferente naturaleza en la preparación de los liposomas que encapsulaban el conjugado EGFhr-P64k, influyó en la potenciación de la respuesta inmune contra el EGFhr, fundamentalmente en la calidad de la respuesta humoral. Los liposomas constituidos por fosfatidilcolinas saturadas (DPPC y DSPC) indujeron niveles superiores de IgG2a e IgG2b, y estos anticuerpos mostraron una mayor capacidad de inhibición de la unión del EGFhr a su receptor, en comparación con los liposomas de sPC (insaturada) y con el  $Al(OH)_3$ , (Figura 1) [21, 25].

### Resultados a partir del empleo de maDers

En una primera etapa se estudió la eficiencia de encapsulación de maDer s y de StII en vesículas (DRV) de DPPC y DPPC:Cho (relación molar 1:1). Se ensayaron, además, dos relaciones lípido:alergenos, y se encontró que el rendimiento de encapsulación de maDer s dependió de la relación lípido:alergenos empleada. La incorporación de colesterol en las vesículas mejoró la encapsulación de maDer s y StII.

Al analizar la capacidad de retención de maDer s por las vesículas en suspensión a 4 °C durante un mes, se observó una disminución de esta propiedad cuando estaba presente en las vesículas StII, lo que se hizo más significativo si la preparación liposomal contenía colesterol. Por el contrario, StII se retuvo de manera más eficiente en los liposomas de DPPC:Cho, lo cual sugiere que hay una mayor proporción de esta proteína asociada a estas membranas.

El estudio de la respuesta inmune humoral en ratones Balb/c se centró en la comparación de la respuesta

19. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951; 193:265-75.

20. Luzardo MC, Martínez Y, Alonso ME, Álvarez C, Disalvo EA, Lanio ME. Epidermal Growth Factor (EGF): encapsulation characteristics and stability of liposomes. *Revista Cubana de Química* 2001; 127-8.

21. Luzardo MC, Martínez Y, Calderón L, Álvarez C, Alonso ME, Zadi B, et al. Encapsulation of EGF in liposomes of different phospholipid composition: influence on the humoral immune response. 17ma Conferencia de Química, Universidad de Oriente, Santiago de Cuba, ISBN: 959-207-083-0 (Publicación en formato electrónico) 2002; Diciembre 4-6.

22. Luzardo MC, Martínez Y, Calderón L, Álvarez C, Alonso ME, Disalvo EA, et al. Características de la encapsulación de EGF, P64k y el conjugado de ambas proteínas en liposomas obtenidos mediante congelación-descongelación. *Biotechnol Appl* 2002; 19(Suppl 3 y 4):147-52.

23. Luzardo MC, Amalía F, Núñez AM, Díaz S, Biondi de López AC, Disalvo EA. Effect of Trehalose and Sucrose on the Hydration and Dipole Potential of Lipid Bilayers. *Biophys J* 2000; 78:2452-8.

24. Martínez Y, Luzardo MC, Alonso ME, Ramos Y, Álvarez C, Lanio ME. Liposomes probably function as immunological carriers when used to encapsulate Epidermal Growth Factor (EGF) with vaccine purpose. *Revista Cubana de Química* 2001; 127.

25. Martínez Y, Luzardo MC, Calderón L, Pazos IF, Álvarez C, Alonso ME, et al. Liposomas: Efecto Potenciador sobre la Respuesta Inmune Anti-hrEGF. *Biotechnol Appl* 2003; 20(Suppl 2):95-101.

26. Luzardo MC, Martínez Y, Calderón L, Lanio ME, Alonso ME. Anticuerpos IgG1, IgG2a e IgG2b y respuesta de hipersensibilidad retardada (HR) en ratones NMRI inmunizados con EGFhr conjugado o no a P64k y encapsulado en liposomas. *Biología* 2003; 17(Suppl 2):143-8.

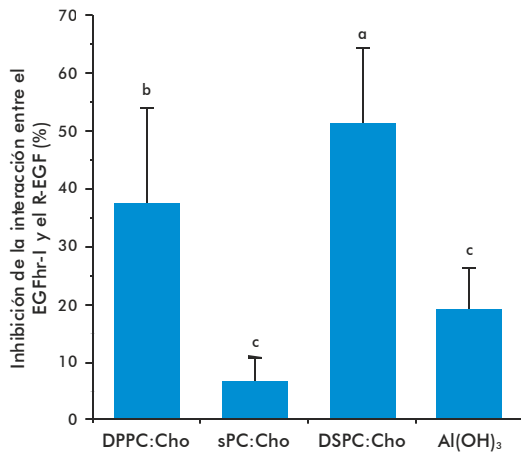


Figura 1. Inhibición de la interacción entre el EGF y su receptor por el suero de los animales inmunizados con EGFhr-P64k encapsulado en DRV o adsorbido en Al(OH)<sub>3</sub>. La ordenada representa el porcentaje de inhibición de la interacción EGFhr/R-EGF, derivado de los anticuerpos anti-EGFhr presentes en el suero de los animales inmunizados. Como fuente de receptores se utilizaron membranas de placenta humana. Ratones NMRI se inmunizaron a los 0 y 28 días por vía intramuscular, con 10 µg de EGFhr conjugado a P64k. Para el ensayo se extrajo el suero de los animales (n = 7) a los 90 días (dilución 1:5). Como control y para el cálculo del porcentaje de inhibición se utilizaron sueros de animales no inmunizados y un exceso de EGFhr no radiactivo (control de máximo bloqueo o inhibición de la interacción EGFhr-1<sup>125</sup>/R-EGF). Letras desiguales indican diferencias significativas, según la prueba de Rangos Múltiples de Duncan (p < 0.05).

inducida con los alérgenos encapsulados en liposomas (LP/maDer s), adyuvados en alúmina (Al/maDer s) o disueltos en PBS (PBS/maDer s). Tanto la alúmina como los liposomas indujeron respuestas de IgG total alérgeno-específica elevadas. Sin embargo, los niveles de IgE total en los sueros de los animales inmunizados con LP/maDers fueron similares a los encontrados en el grupo control que sólo recibió PBS, y muy inferiores a los presentes en los sueros de los animales que recibieron los alérgenos adyuvados en alúmina. La evaluación de la respuesta de IgE específica mediante anafilaxia cutánea pasiva, nuevamente demostró que la alúmina favorece las respuestas de IgE. El estudio histopatológico de los pulmones de los ratones previamente sometidos a un reto alérgico, mostró en el grupo LP/maDer s un reducido infiltrado celular, similar al control PBS y muy diferente al grupo Al/maDer s, donde se evidenció inflamación. Estos resultados avalan, de manera preliminar, la eficacia del empleo de los liposomas en la inmunoterapia contra las enfermedades alérgicas [27].

Para profundizar en el estudio de la respuesta inmune alérgeno-específica inducida, se utilizaron vesículas liposomales de DPPC y DPPC:Cho que contenían o no la proteína potencialmente inmunomoduladora StII. La presencia de colesterol o la ausencia determinó las características de la respuesta inmune humoral maDer s-específica, en términos de IgG1, IgG2a e IgE. Las vesículas de DPPC:Cho fueron más efectivas en la inducción de un patrón de respuesta de tipo no alérgico (Figura 2A). Sin embargo, independientemente de la composición lipídica liposomal, la inmunización con las vesículas previno el desarrollo de eosinofilia en sangre

periférica y la inflamación peribronquiovascular en los ratones inmunizados y luego desafiados con aerosoles del extracto de *D. siboney*. La mayor producción de IgG2a maDers-específica, subclase indicadora de respuestas de tipo Th1, se obtuvo con el empleo de vesículas de DPPC:Cho que contenían adicionalmente la StII (Figura 2B). Este resultado constituye la primera evidencia del efecto inmunomodulador de esta proteína encapsulada en liposomas, cuya manifestación, además, dependió de la composición lipídica liposomal.

Diversos aspectos destacan la *novedad científica* de los resultados de este trabajo. Se demuestra por primera vez:

1. Las vesículas DRV de DPPC:Cho muestran la mayor eficiencia de encapsulación y capacidad para retener el EGFhr durante su conservación.

2. La interacción del EGFhr con los fosfolípidos que componen las vesículas liposomales.

3. Es posible inducir respuesta inmune en ratones inmunizados con EGFhr encapsulado en liposomas, aun en ausencia de la proteína transportadora P64k.

4. Los liposomas constituidos por fosfatidilcolinas saturadas inducen una respuesta humoral contra un antígeno soluble como el EGFhr más eficiente que las vesículas de fosfatidilcolina insaturada o el Al(OH)<sub>3</sub>.

5. Las vesículas liposomales potencian la respuesta inmune específica para los alérgenos principales de *D. siboney*.

6. Es posible inducir una respuesta inmune no alérgica alérgeno-específica más eficiente con la inclusión de colesterol a vesículas de DPPC.

7. La presencia de la citolisina StII encapsulada en los liposomas junto a los alérgenos potencia la capacidad inmunomoduladora de las vesículas liposomales de DPPC:Cho.

Desde el punto de vista teórico, la importancia de este trabajo está en sus aportes al conocimiento de la influencia de factores como la composición lipídica liposomal y la adición de otros solutos (azúcares, citolisinas) a la preparación de los liposomas sobre

27. Calderón L, Facenda E, Machado L, Uyema K, Rodríguez D, Gómez E, et al. Modulation of the specific allergic response by mite allergens encapsulated into liposomes. *Vaccine* 2006;24(Suppl 2):S2-38-9.

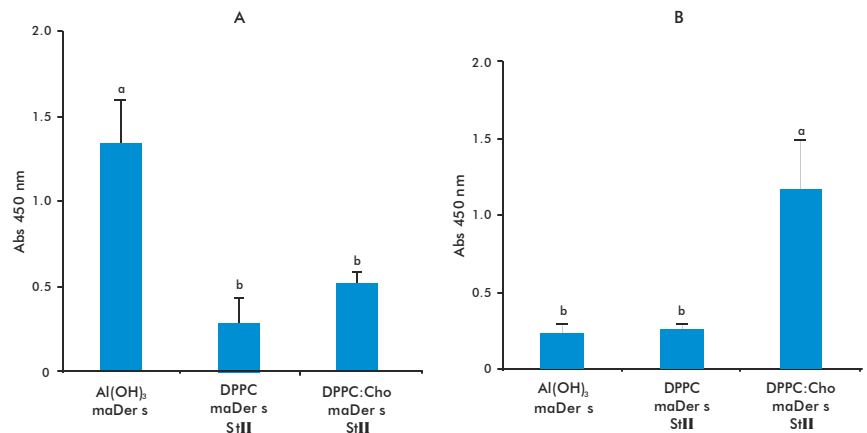


Figura 2. Niveles de IgG1 (A) e IgG2a (B) anti-alérgeno (28 días) en ratones Balb/c inmunizados con maDer s encapsulado, junto a StII, en DRV de DPPC y DPPC:Cho o adsorbido en Al(OH)<sub>3</sub>. Los animales se inmunizaron a los 0 y 14 días por vía intraperitoneal, con una cantidad de maDer s que contenía 5 µg de Der s 1. Para el ensayo (ELISA), se emplearon sueros diluidos 1:100. Se muestran los valores promedio y las desviaciones estándar (n = 6). Las letras diferentes sobre las barras indican diferencias estadísticamente significativas entre los grupos experimentales, de acuerdo con la prueba de Student-Newman-Keuls (p < 0.05).

la eficiencia de encapsulación y retención de los antígenos en estos sistemas, así como sus propiedades inmunomoduladoras. Desde el punto de vista práctico, la importancia radica en la medida que valida las potencialidades de los liposomas como inmunopotenciadores para un antígeno poco inmunogénico como el EGFhr, y en la factibilidad de su empleo para potenciar respuestas inmunes alérgeno-específicas. Se demostró el efecto adyuvante de liposomas de fosfatidilcolinas saturadas y colesterol, preparados mediante la tecnología de deshidratación-rehidratación, al encapsular una proteína de baja inmunogenicidad, obtenida por vía recombinante, sin la necesidad de su conjugación a un transportador proteico. Estos resultados pudieran contribuir al desarrollo de la vacuna-EGFhr terapéutica desarrollada en nuestro país por el Centro de Inmunología Molecular, al brindar una alternativa atractiva y promisoriosa para presentar este antígeno al sistema

inmune, sin limitaciones para su aplicación en seres humanos.

### **Agradecimientos**

Se agradece a nuestros colaboradores del Centro de Estudios de Proteínas<sup>1</sup>; del Centro de Inmunología Molecular<sup>2</sup>; de la Universidad de Buenos Aires, Argentina<sup>3</sup>; de la Universidad de Sao Paulo, Brazil<sup>4</sup>, y de The School of Pharmacy, University of London, Reino Unido<sup>5</sup>: Dr. Anselmo Otero<sup>1</sup>, Téc. Eric Felicó<sup>1</sup>, Téc. Liem Canet<sup>1</sup>, Dra. Gisela González<sup>2</sup>, MSc. Irene Beausoleil<sup>2</sup>, Dr. Edgardo Aníbal Disalvo<sup>3</sup>, Dra. Dunia Rodríguez<sup>4</sup>, Dr. Momtchilo Russo<sup>4</sup>, Dr. Gregory Gregoriadis<sup>5</sup>. También se agradece a la Universidad de La Habana, el Ministerio de Ciencia, Tecnología y Medio Ambiente (CITMA), a la *Royal Society* y al Instituto de Cooperación Iberoamericana, por el financiamiento de becas y proyectos para realizar estas investigaciones.