

Contribución de las células B-1 a la respuesta de anticuerpos antígeno-específica y a la polarización del fenotipo de macrófagos peritoneales inducidos por liposomas constituidos por fosfatidil colina

Autoría principal
Yoelys Cruz Leal¹.

Otros autores

Maria Eliana Lanio¹, Rolando Perez², Alejandro Lopez-Requena², Mario Mariano³, Yoan Machado³, Maria Fernanda Lucattelli Laurindo³, Lika Osugui³, Liem Canet¹, Ana Flavia Popi³, Carlos Alvarez¹.

Colaboradores

MsC. Adolfo Castillo², Dra. Anuska Marcelino³, MsC. Julio Felipe Santo Tomas², Dra. Katia Rashida de la Luz², MsC. Liliana Oliver², Dra. Maria Carmen Luzardo¹, Dra. Maria Eugenia Alonso¹, MsC. Oralys Sanchez¹, MsC. Rady Laborde¹, Dr. Renato Arruda Mortara⁴, Lic. Yuniel L. Rubalcaba Saez¹.

Entidades ejecutoras principales

¹Centro de Estudios de Proteínas, Facultad de Biología, Universidad de La Habana.

Entidades participantes

²División de Investigación y Desarrollo del Centro de Inmunología Molecular.

³Disciplina de Inmunología del Departamento de Microbiología, Inmunología y Parasitología, Universidad Federal del Estado de Sao Paulo.

⁴Departamento de Microbiología, Inmunología y Parasitología, Universidad Federal del Estado de Sao Paulo.

Autor para correspondencia

Dra. Yoelys Cruz Leal

Calle 25 #455 e/ J e I, Vedado, Plaza de la Revolución, La Habana, Cuba, CP 10 400.

Telefono: 832 4830, Fax: 832 1321

E-mail: yoelys@fbio.uh.cu

Aporte científico de cada autor al resultado

✓ Dra. **Yoelys Cruz Leal** (40 %): Realizo la mayor parte del trabajo experimental. Obtuvo e hizo la caracterización físico-química de las preparaciones liposomales evaluadas. Realizo los experimentos *in vivo* e *in vitro* que permitieron demostrar: *i*) la participación de las células B-1 en las propiedades adyuvantes de los liposomas que contienen PtC, *ii*) la influencia directa de las vesículas que contienen PtC sobre la capacidad de las células B-1 de secretar anticuerpos anti-fosfocolina, IL-10 y expresar moléculas de superficie involucradas en el proceso de presentación antigénica, así como *iii*) la contribución de las células B-1 al patrón de los macrófagos peritoneales inducido por el antígeno encapsulado en liposomas que contienen PtC. Además, participo en el diseño de los experimentos y en el análisis de los resultados en todas las etapas del trabajo, así como en la escritura de los artículos científicos publicados.

- ✓ Dra. **María Eliana Lanio Ruíz** (20 %): Participo en el diseño del proyecto y de los experimentos así como en el análisis de los resultados a lo largo de todo el trabajo. Tuvo un papel fundamental en la escritura de los artículos científicos publicados.
- ✓ Dr. **Rolando Pérez Rodríguez** (10%): Participo en el diseño del proyecto, asesoro su ejecución y participo en el análisis de los resultados del trabajo desde su concepción original, así como en la escritura de los artículos científicos publicados.
- ✓ Dr. **Alejandro López-Requena** (8%): Participo en el análisis de los resultados del trabajo desde su concepción original y tuvo un papel primordial en la escritura de los artículos científicos publicados.
- ✓ Dr. **Mario Mariano** (6%): Participo en el análisis de estrategias de los experimentos realizados con células B-1 purificadas y en la discusión de resultados. Colaboro en la escritura de los artículos.
- ✓ Dra. **Maria Fernanda Lucattelli Laurindo** (3%): Participo en los ensayos de evaluación inmunológica de la OVA encapsulada en liposomas de DPPC:Col en animales BALB/*xid* reconstituidos con células B-1. Además participo en los experimentos de determinación del patrón de macrófagos peritoneales inducidos en ratones BALB/c por la OVA encapsulada en liposomas y en los experimentos *in vitro* con células B-1 purificadas. También contribuyo al análisis de los resultados y a la escritura de los artículos científicos publicados.
- ✓ MsC. **Lika Osugui** (3%): Participo en los experimentos de determinación del patrón de los macrófagos peritoneales en ratones BALB/c, inducidos por las formulaciones liposomales y en los experimentos *in vitro* con células B-1 purificadas. Además, realizo la determinación de citocinas en el sobrenadante de células peritoneales. También participo en el análisis de los resultados y en la escritura del artículo científico publicado en Immunobiology.
- ✓ MsC. **Yoan Machado** (2.5 %): Participo en el diseño de los experimentos y en el análisis de los resultados obtenidos. También contribuyo en la escritura del artículo científico publicado en International Immunology.
- ✓ Lic. **Liem Canet** (2.5%): Participo en la obtención de las preparaciones liposomales y en la evaluación mediante ELISA de la respuesta de anticuerpos específica contra OVA.
- ✓ Dra. **Ana Flavia Popi** (2.5%): Participo en el diseño de las estrategias y el análisis de los resultados del trabajo, fundamentalmente en la etapa que involucra el trabajo con células B-1 purificadas ya sea en experimentos de transferencia adoptiva de células, como experimentos *in vitro*.
- ✓ Dr. **Carlos Alvarez** (2.5%): Participo en el análisis de los resultados del trabajo desde su concepción original, así como en la escritura de los artículos científicos publicados.

Aporte de los colaboradores extranjeros:

- ✓ **Anuska Marcelino Alvares**: Colaboro en los ensayos de evaluación inmunológica de la OVA encapsulada en liposomas de DPPC:Col en animales BALB/*xid* reconstituidos con células B-1. Además, contribuyo en la etapa final de revisión del artículo científico publicado en International Immunology.
- ✓ **Renato Arruda Mortara**: Realizo la evaluación por microscopia confocal de los experimentos de internalización, por las células B-1, del antígeno encapsulados en liposomas.

Resumen

Las células B-1 son una población de linfocitos B que muestran una frecuente especificidad hacia la fosfatidil colina (PtC). Sin embargo, a pesar de que los liposomas que contienen PtC se han empleado como adyuvantes, su efecto inmunomodulador se ha atribuido a la capacidad de interactuar con las células dendríticas y los macrófagos.

El impacto científico de este trabajo radica en que por primera vez se demostró la contribución de las células B-1 a las propiedades adyuvantes de liposomas que contienen PtC, siendo este el elemento relevante que condiciona esta participación. Las células B-1 potencian la respuesta inmune humoral inducida por la ovoalbumina (OVA) encapsulada en los liposomas de dipalmitoil PtC colina y colesterol (DPPC:Col) (Lp DPPC/OVA). Al mismo tiempo, estas vesículas inducen en las células B-1 un fenotipo presentador de antígenos y menos supresor.

Además, los anticuerpos anti-fosfocolina, inducidos por los Lp DPPC/OVA, favorecen la Internalización de las vesículas por los macrófagos, lo que pudiera contribuir al incremento de la respuesta humoral antígeno-específica inducida por las células B-1. Se demostró que Lp DPPC/OVA induce en los macrófagos peritoneales un fenotipo M2 reprogramable a un patrón M1 tras la estimulación *in vitro* con LPS, proceso en el cual las células B-1 juegan un papel importante, particularmente en la potencialidad de reprogramación al fenotipo pro-inflamatorio. Esta función para la población de linfocitos B-1 no había sido anteriormente descrita, por lo que estas evidencias aportan nuevos elementos al conocimiento acerca del papel regulador de estas células sobre otras del sistema inmune.

Comunicación corta

La capacidad de los liposomas de potenciar la respuesta inmune humoral y mediada por células contra un espectro amplio de enfermedades infecciosas y el cáncer ha sido ampliamente demostrada.

Actualmente, existen diferentes formulaciones liposomales disponibles comercialmente o en estudios clínicos, ya sea como adyuvantes o como sistemas de liberación de fármacos. Aunque la mayoría de las formulaciones liposomales desarrolladas contienen PtC, la influencia de este fosfolípido en las propiedades adyuvantes de los liposomas es poco conocida. La mayoría de los estudios realizados con el objetivo de profundizar en los mecanismos de inmunoadyuvancia de los liposomas, han centrado su atención en la interacción de estas vesículas con las células del sistema inmune, principalmente las células dendríticas y los macrófagos. Sin embargo, a pesar de que las células B son consideradas células presentadoras de antígenos profesionales (APCs), su influencia en la respuesta inmune inducida por antígenos encapsulados en liposomas no ha sido abordada.

Los linfocitos B-1 se consideran elementos relevantes en la respuesta inmune humoral temprana contra patógenos, como resultado de su elevada capacidad para producir anticuerpos naturales. En comparación con los linfocitos B-2, las células B-1 tienen mayor capacidad de presentar antígenos a las células T e inducir una potente

proliferación y diferenciación de estos linfocitos. Adicionalmente, la secreción espontánea de interleucina (IL) 10 por las células B-1, les confiere un papel inmunomodulador. En este sentido, se ha descrito que estas células inhiben las funciones pro-inflamatoria y fagocítica de los macrófagos, por lo que favorecen en estos un fenotipo similar al M2. A pesar de que las células B-1 muestran una frecuente especificidad hacia PtC y el grupo fosfolina, hasta este momento, no se había establecido una conexión entre estas células y las propiedades adyuvantes de vesículas constituidas por este fosfolípido.

En el presente trabajo se estudio la participación de las células B-1 en la adyuvancia de los liposomas que contienen PtC. En una etapa inicial, al evaluar la capacidad adyuvante de estas vesículas para diferentes dosis del antígeno modelo OVA administradas por la ruta intraperitoneal, se demostró la superioridad de la formulación liposomal Lp DPPC/OVA, en cuanto al isotipo y la calidad de los anticuerpos antígeno-específico inducidos. Además, se demostró que las células B-1 peritoneales contribuyen al incremento de la respuesta inmune humoral que se logra mediante la encapsulación del antígeno en estos liposomas, con respecto a la respuesta generada por el antígeno en su forma soluble.

Esta contribución se sustenta, además, por: *i)* la capacidad de las células B-1 de internalizar estas partículas, efecto que es potenciado por su especificidad por la PtC liposomal; *ii)* los anticuerpos anti-fosfolina producidos por estas células contribuyen a la opsonización de las vesículas y favorecen su internalización por otras APCs, por ejemplo los macrófagos peritoneales, *iii)* la importancia de la PtC en el efecto de las células B-1 sobre la inmunoadyuvancia de los liposomas.

Liposomas que no contienen PtC fueron menos eficientes en potenciar la respuesta de anticuerpos OVA-específicos en comparación con la formulación Lp DPPC/OVA. Estos resultados constituyen uno de los principales aportes teóricos del trabajo, al demostrar la importancia de la especificidad de las células B-1 por la PtC en la contribución a las propiedades inmunopotenciadoras de un adyuvante liposomal constituido por este lípido. La profundización en los mecanismos mediante los cuales los liposomas constituidos por PtC manifiestan sus propiedades inmunopotenciadoras, posibilitaría el desarrollo de formulaciones dirigidas a la estimulación de las células B-1, lo que constituiría un aporte práctico del presente trabajo. Además, el sistema células B-1/liposomas de PtC constituye un modelo que pudiera permitir el estudio del posible papel de las células B-1 en la inmunidad contra determinadas enfermedades. Estos resultados se encuentran incluidos en la publicación Cruz-Leal et al (2014a) y en la tesis de doctorado Cruz-Leal (2014).

Los liposomas de DPPC que encapsulan OVA también ejercen una influencia directa sobre las células B-1. Esta formulación promovió la migración de las células B-1 hacia los órganos linfoides secundarios. Además, en estas células estimulo la expresión de MHC-II y la molécula coestimuladora CD86 e indujo una disminución de la secreción de IL-10. Esta citocina ejerce un papel supresor sobre el patrón Th1, de manera que la

disminución de su secreción por las células B-1 como consecuencia del tratamiento con Lp DPPC/OVA, pudiera favorecer este tipo de respuesta. Las células B-1 ejercen un efecto supresor sobre las funciones de los macrófagos mediante la IL-10, al favorecer la polarización a un fenotipo M2. Frecuentemente, la estimulación de las células B-1 provoca un incremento en la secreción de los niveles de IL-10 por estas células. Sin embargo, los liposomas que contienen PtC tuvieron un efecto contrario sobre las células B-1. Estos hallazgos permiten concluir que la formulación liposomal que contiene PtC favorece en las células B-1 un fenotipo presentador de antígenos y menos supresor. Estos resultados se encuentran incluidos en la publicación Cruz-Leal et al (2014a) y en la tesis de doctorado Cruz-Leal (2014).

Los liposomas de DPPC indujeron en los macrófagos peritoneales un fenotipo similar al M2, reprogramable a un patrón similar al M1 tras la estimulación *in vitro* con LPS. Se demostró que las células B-1 tienen un papel importante en la polarización de los macrófagos, específicamente en la potencialidad de reprogramarse al fenotipo M1. Las evidencias experimentales derivadas del presente trabajo, demuestran la relevancia de las células B-1 en la reprogramación de los macrófagos peritoneales hacia un patrón pro-inflamatorio inducido por la preparación liposomal, lo cual contrasta con la demostrada capacidad de estas células de polarizar macrófagos hacia el fenotipo anti-inflamatorio M2. Por tanto, estos resultados aportan nuevos elementos al conocimiento acerca del papel regulador de las células B-1 sobre otras células del sistema inmune. Estos resultados se encuentran contenidos en la publicación Cruz-Leal *et al* (2014b) y en la tesis de doctorado Cruz-Leal (2014).

Publicaciones

1. **Cruz-Leal, Y.** Machado, Y. Lopez-Requena, A. Canet, L. Laborde, R. Marcelino, A. Laurindo, M.F. Santo Tomas, J.F. Alonso, M.E. Alvarez, C. Arruda, R. Popi, A.F. Mariano, M. Perez, R. Lanio, M.E. (2014a). Role of B-1 cells in the immune response against an antigen encapsulated into phosphatidylcholine-containing liposomes. *Int Immunol.* 26: 8, 427–437.
2. **Cruz-Leal, Y.** Lucatelli, M.F. Osgui, L. Luzardo, M.D. Lopez-Requena, A. Alonso, M.E. Alvarez, C. Popi, A.F. Mariano, M. Perez, R. Lanio, M.E. (2014b). Liposomes of phosphatidylcholine and cholesterol induce an M2-like macrophage phenotype reprogrammable to M1 pattern with the involvement of B-1 cells. *Immunobiology.* 219403–415.
3. Lanio M.E., Luzardo M.C., Laborde R., Sanchez O., **Cruz-Leal Y.**, Pazos F., Tejuca M., Valle A., Alonso M.E., Fernandez L.E., Alvarez C. (2009). Las vesículas liposomales: obtención, propiedades y aplicaciones potenciales en la biomedicina. **Rev. Cub. Física** Vol .26, No. 1,p 23-30. ISSN 0253-9268.

Referencias Bibliográficas

- [1] A.G. Allison and G. Gregoriadis, Liposomes as immunological adjuvants, *Nature*, 252 (1974) 252.
- [2] G. Gregoriadis, Liposomes as immunoadjuvants and vaccine carriers: antigen entrapment, *ImmunoMethods*, 4 (1994) 210-216.
- [3] M. Henriksen-Lacey, K.S. Korsholm, P. Andersen, Y. Perrie and D. Christensen, Liposomal vaccine delivery systems, *Expert Opin Drug Deliv*, 8 (2011) 505-519.

- [4] D.S. Watson, A.N. Endsley and L. Huang, Design considerations for liposomal vaccines: influence of formulation parameters on antibody and cell-mediated immune responses to liposome associated antigens, *Vaccine*, 30 (2012) 2256-2272.
- [5] D.B. Fenske and P.R. Cullis, Liposomal nanomedicines, *Expert Opin Drug Deliv*, 5 (2008) 25-44.
- [6] A. Puri, K. Loomis, B. Smith, J.H. Lee, A. Yavlovich, E. Heldman and R. Blumenthal, Lipid-based nanoparticles as pharmaceutical drug carriers: from concepts to clinic, *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst*, 26 (2009) 523-580.
- [7] L. Calderon, E. Facenda, L. Machado, K. Uyema, D. Rodriguez, E. Gomez, Y. Martinez, B. Gonzalez, V. Bourg, C. Alvarez, A. Otero, M. Russo, A. Labrada and M.E. Lanio, Modulation of the specific allergic response by mite allergens encapsulated into liposomes, *Vaccine*, 24 Suppl 2 (2006) S2-38-39.
- [8] M.E. Lanio, M.C. Luzardo, C. Alvarez, Y. Martinez, L. Calderon, M.E. Alonso, B. Zadi, G. Gregoriadis, D.Q. Craig and A. Disalvo, Humoral immune response against epidermal growth factor encapsulated in dehydration rehydration vesicles of different phospholipid composition, *Journal of liposome research*, 18 (2008) 1-19.
- [9] M. Lanio, J. Lombardero, L. Fernández, R. Laborde, Y. Cruz, M.C. Luzardo, C. Mesa, C. Álvarez, F. Pazos, M. Tejuca, A. Valle, M.E. Alonso and L. Canet, Composiciones vacunales a base de Sticholysina encapsulada en liposomas., in, Vol CU/P/2010/144, Cuba, 2010, pp. 1-20.
- [10] L. Thiele, B. Rothen-Rutishauser, S. Jilek, H. Wunderli-Allenspach, H.P. Merkle and E. Walter, Evaluation of particle uptake in human blood monocyte-derived cells in vitro. Does phagocytosis activity of dendritic cells measure up with macrophages?, *J Control Release*, 76 (2001) 59-71.
- [11] R.M. Steinman, Dendritic cells in vivo: a key target for a new vaccine science, *Immunity*, 29 (2008) 319-324.
- [12] K.R. Alugupalli, A distinct role for B1b lymphocytes in T cell-independent immunity, *Curr Top Microbiol Immunol*, 319 (2008) 105-130.
- [13] F. Martin and J.F. Kearney, B-cell subsets and the mature preimmune repertoire. Marginal zone and B1 B cells as part of a "natural immune memory", *Immunol Rev*, 175 (2000) 70-79.
- [14] F. Martin, A.M. Oliver and J.F. Kearney, Marginal zone and B1 B cells unite in the early response against T-independent blood-borne particulate antigens, *Immunity*, 14 (2001) 617-629.
- [15] D. Parra, A.M. Rieger, J. Li, Y.A. Zhang, L.M. Randall, C.A. Hunter, D.R. Barreda and J.O. Sunyer, Pivotal advance: peritoneal cavity B-1 B cells have phagocytic and microbicidal capacities and present phagocytosed antigen to CD4+ T cells, *J Leukoc Biol*, 91 (2011) 525-536.
- [16] X. Zhong, W. Gao, N. Degauque, C. Bai, Y. Lu, J. Kenny, M. Oukka, T.B. Strom and T.L. Rothstein, Reciprocal generation of Th1/Th17 and T(reg) cells by B1 and B2 B cells, *Eur J Immunol*, 37 (2007) 2400-2404.
- [17] A. O'Garra, R. Chang, N. Go, R. Hastings, G. Houghton and M. Howard, Ly-1 B (B-1) cells are the main source of B cell-derived interleukin 10, *European journal of immunology*, 22 (1992) 711-717.
- [18] D.F. Barbeiro, H.V. Barbeiro, J. Faintuch, S.K. Ariga, M. Mariano, A.F. Popi, H.P. de Souza, I.T. Velasco and F.G. Soriano, B-1 cells temper endotoxemic inflammatory responses, *Immunobiology*, 216 (2011) 302-308.
- [19] A.F. Popi, J.D. Lopes and M. Mariano, Interleukin-10 secreted by B-1 cells modulates the phagocytic activity of murine macrophages in vitro, *Immunology*, 113 (2004) 348-354.

- [20] H.C. Oliveira, A.F. Popi, A.L. Bachi, S. Nonogaki, J.D. Lopes and M. Mariano, B-1 cells modulate the kinetics of wound-healing process in mice, *Immunobiology*, 215 (2009) 215-222.
- [21] S.C. Wong, A.L. Puaux, M. Chittezhath, I. Shalova, T.S. Kajiji, X. Wang, J.P. Abastado, K.P. Lam and S.K. Biswas, Macrophage polarization to a unique phenotype driven by B cells, *Eur J Immunol*, 40 (2010) 2296-2307.
- [22] J. Osborne and E. Devaney, Interleukin-10 and antigen-presenting cells actively suppress Th1 cells in BALB/c mice infected with the filarial parasite *Brugia pahangi*, *Infect Immun*, 67 (1999) 1599-1605.
- [23] A.F. Popi, L.C. Godoy, P. Xander, J.D. Lopes and M. Mariano, B-1 cells facilitate *Paracoccidioides brasiliensis* infection in mice via IL-10 secretion, *Microbes Infect*, 10 (2008) 817-824.
- [24] E.H. Wilson, E. Katz, H.S. Goodridge, M.M. Harnett and W. Harnett, In vivo activation of murine peritoneal B1 cells by the filarial nematode phosphorylcholine-containing glycoprotein ES-62, *Parasite Immunol*, 25 (2003) 463-466.
- [25] H. Gary-Gouy, J. Harriague, G. Bismuth, C. Platzer, C. Schmitt and A.H. Dalloul, Human CD5 promotes B-cell survival through stimulation of autocrine IL-10 production, *Blood*, 100 (2002) 4537-4543.