

# EVALUACIÓN DE LA RESPUESTA INMUNE INDUCIDA POR LA INOCULACIÓN DEL PÉPTIDO KA-11-MAP-8 DERIVADO DE SINTENINA-1 EN RATONES BALB/C

**Hurtado Ortega, Edgar**

Laboratorio de Investigación en Inmunobiología y Diagnóstico Molecular, Universidad Autónoma de Guerrero. Chilpancingo de los Bravo, Guerrero, México  
edduorte@gmail.com  
<https://orcid.org/0009-0007-5760-2802>

**Nicolás Morales, María Lilia**

Laboratorio de Investigación en Inmunobiología y Diagnóstico Molecular, Universidad Autónoma de Guerrero. Chilpancingo de los Bravo, Guerrero, México  
nmlilia@gmail.com  
<https://orcid.org/0009-0007-5760-2802>

**Vences Velázquez, Amalia**

Laboratorio de Investigación en Inmunobiología y Diagnóstico Molecular, Universidad Autónoma de Guerrero. Chilpancingo de los Bravo, Guerrero, México  
avences@yahoo.com  
<https://orcid.org/0000-0001-8393-0286>

**Espinoza Rojo, Mónica**

Laboratorio de Biología Molecular y Genómica, Universidad Autónoma de Guerrero. Chilpancingo de los Bravo, Guerrero, México  
monicaespinoza@uagro.mx  
<https://orcid.org/0000-0002-1854-2700>

**Cortés Sarabia, Karen**

Laboratorio de Investigación en Inmunobiología y Diagnóstico Molecular, Universidad Autónoma de Guerrero. Chilpancingo de los Bravo, Guerrero, México.  
kcortes\_sarabia@hotmail.com  
<https://orcid.org/0000-0002-4405-2297>

## RESUMEN

**Introducción:** El cáncer es considerado una de las principales causas de muerte a nivel mundial. Durante la última década se ha potenciado el uso de la inmunoterapia, particularmente el uso de las vacunas entre las que se encuentran las basadas en péptidos; de las cuales la fase inicial consiste en verificar su capacidad de inducir respuesta inmune. **Objetivo:** Evaluar la respuesta inmune humoral (anticuerpos totales, IgM, e IgG) generada por la administración del péptido KA-11-MAP8 derivado de Sintenina-1 en ratones Balb/C. **Metodología:** Se inoculó el péptido KA-11-MAP8 vía subcutánea en 28 ratones Balb/C durante los días 1, 43, 93 y 142. Se utilizaron concentraciones de 5 y 10 µg del péptido en una mezcla homogénea con el adyuvante hidróxido de aluminio o incompleto de Freund. Los ratones fueron sangrados cada 30 días hasta el día 150, y con el suero colectado se realizaron ensayos de ELISA Indirecto para evaluar la presencia de anticuerpos totales, IgM e IgG. **Resultados:** Detectamos la presencia de anticuerpos totales anti-KA-11-MAP8 a partir del día 30, al detectar específicamente IgM e IgG observamos un

incremento linealmente hasta el día 150. **Conclusiones:** El péptido fue capaz de inducir una respuesta inmune humoral en los animales inmunizados, particularmente, se observó una mayor producción de IgG en el grupo inmunizado con péptido KA-11-MAP8 a una concentración de 10 µg en una mezcla homogénea con el adyuvante hidróxido de aluminio.

**Palabras clave:** Vacunas, Sintenina-1, anticuerpos, cáncer.

## ABSTRACT

**Introduction:** Cancer is considered one of the leading causes of death worldwide. During the last decade the use of immunotherapy has increased, particularly the use of vaccines as those based on peptides, which initially need to be tested to verify their capacity to induce immune response.

**Objective:** To evaluate the humoral immune response (total antibodies, IgM, and IgG) generated by the administration of the KA-11-MAP8 peptide derived from Syntenin-1 in Balb/C mice.

**Methodology:** KA-11-MAP8 peptide was inoculated subcutaneously into 28 Balb/C mice on days 1, 43, 93 and 142. Concentrations of 5 and 10 µg of the peptide were used in a homogeneous mixture with aluminum hydroxide or Freund's incomplete adjuvant. Mice were bled every 30 days until day 150, and Indirect ELISA assays were performed to evaluate the presence of total antibodies, IgM, and IgG. **Results:** Total antibodies anti-KA-11-MAP8 were detected since the day 30, and a linear increase of IgM and IgG was observed until day 150. **Conclusions:** The peptide was able to induce a humoral immune response in the immunized animals, particularly, a higher IgG production was observed in the group immunized with the KA-11-MAP8 peptide to a final concentration of 10 µg in a homogeneous mixture with the adjuvant aluminum hydroxide.

**Keywords:** Vaccines, Syntenin-1, antibodies, cancer.

## 1. INTRODUCCIÓN

El cáncer es una enfermedad en la que células anormales del cuerpo crecen y se propagan descontroladamente, pudiéndose diseminar a otras partes del cuerpo. A nivel mundial es una de las principales causas de muerte, representando casi 10 millones de muertes en 2020 (American Cancer Society, 2022). Durante la última década, la inmuno-oncología ha aportado evidencia sustancial sobre la importancia que tiene la manipulación de la respuesta inmune en el tratamiento del cáncer a través del desarrollo de métodos de inmunoterapia, como son las vacunas, entre ellas las basadas en péptidos (Criscitiello, *et al.*, 2019). Por lo que, la sobreexpresión, mutación o producción específica de proteínas endógenas que pueden ser antígenos tumorales resultan de gran interés para el desarrollo de vacunas peptídicas que puedan contrarrestar su efecto (Malonis, *et al.*, 2020).

Sintenina-1 es miembro de la familia PDZ y funciona como proteína adaptadora o de andamio. Se ha reportado su sobreexpresión en distintos tipos de cáncer donde promueve procesos cancerígenos como la migración, invasión y metástasis. Por lo que es un excelente blanco para el desarrollo experimental de una vacuna basada en péptidos (Pradhan, *et al.*, 2020; Das, *et al.*, 2019; Yu, *et al.*, 2019). El presente trabajo tiene como objetivo evaluar la respuesta inmune humoral (anticuerpos totales, IgM, e IgG) generada por la administración del péptido KA-11-MAP8 derivado de Sintenina-1 en ratones Balb/C, con la finalidad de demostrar su capacidad de inducir una respuesta inmune humoral.

## 2. MATERIAL Y MÉTODOS

### Inmunización de ratones de la cepa Balb/C

Se utilizaron 28 ratones hembra (n=28) categorizados en siete grupos: cuatro experimentales (n=16) y tres grupos control (n=12). En los grupos experimentales el péptido fue administrado vía

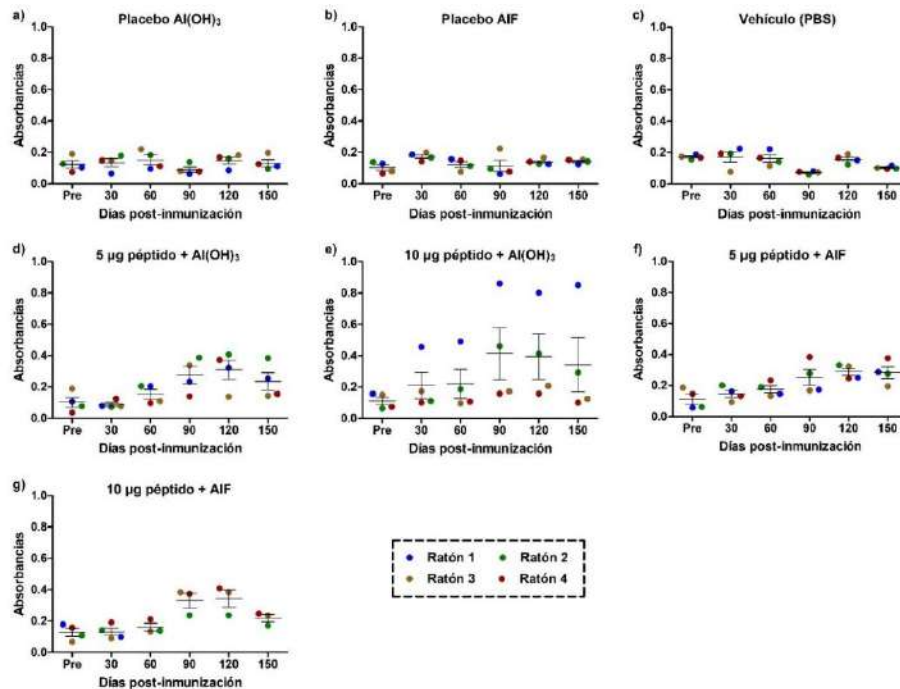
subcutánea en una mezcla homogénea con los adyuvantes: hidróxido de aluminio  $[\text{Al}(\text{OH})_3]$  o incompleto de Freund (AIF). Los grupos control fueron inmunizados solo con el adyuvante o el vehículo. Todos los ratones se mantuvieron bajo vigilancia y en condiciones controladas de luz y temperatura. A los grupos 1 y 2 se les administró la formulación placebo, que consistió de una mezcla homogénea del adyuvante hidróxido de aluminio (grupo 1) o Adyuvante Incompleto de Freund (grupo 2) con *buffer* de fosfato estéril (PBS), al grupo 3 se le administró únicamente el vehículo (PBS). A los grupos experimentales (4 – 7) se les administró el péptido en una mezcla homogénea con el adyuvante, la principal diferencia entre cada uno de los grupos de estudio fue la dosis del péptido y el tipo de adyuvante utilizado: 5  $\mu\text{g}$  del péptido KA-11-MAP8 + hidróxido de aluminio al 2% (grupo 4), 10  $\mu\text{g}$  del péptido + hidróxido de aluminio al 2% (grupo 5), 5  $\mu\text{g}$  del péptido + adyuvante incompleto de Freund (Sigma Aldrich Cat # F5506) (grupo 6), y 10  $\mu\text{g}$  del péptido + adyuvante incompleto de Freund (grupo 7).

#### **Evaluación de la respuesta inmune humoral**

Los ratones fueron sangrados en el día 0, 30, 60, 90, 120 y 150 para evaluar la producción de anticuerpos por ELISA indirecto. El péptido KA-11-MAP8 fue diluido a una concentración de 0.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  en *buffer* de carbonatos pH 9.6, del que se tomaron 100  $\mu\text{L}$  para su fijación en placas de 96 pozos de fondo plano altamente hidrofílicas (Costar Cat#3590). La placa fue incubada durante 2 horas a 37 °C y bloqueada utilizando leche descremada al 5%, posteriormente, el suero extraído fue diluido 1:500 en PBS pH 7.2 y se realizaron diluciones dobles seriadas hasta 1:16,000. La placa fue incubada durante toda la noche a 4 °C y finalmente se utilizaron anticuerpos monoclonales anti-IgG (H+L) (#14286945A), anti-gamma (IgG) y anti-Mu (IgM) de ratón diluido 1:11,000 y 1:4,000, respectivamente, durante 1 hora 30 minutos a 37 °C. Al final de cada paso del ensayo, la placa fue lavada tres veces con PBS-Tween 20 0.05% durante 5 minutos. La reacción antígeno-anticuerpo se hizo evidente al añadir una solución de cromógeno (orto-fenildiamina) y sustrato (peróxido 30%) diluidos en *buffer* de citratos, la cual se dejó actuar durante 10 minutos. Finalmente, la placa fue leída en un lector de microplacas a 492 nm y las absorbancias fueron capturadas en una base de datos.

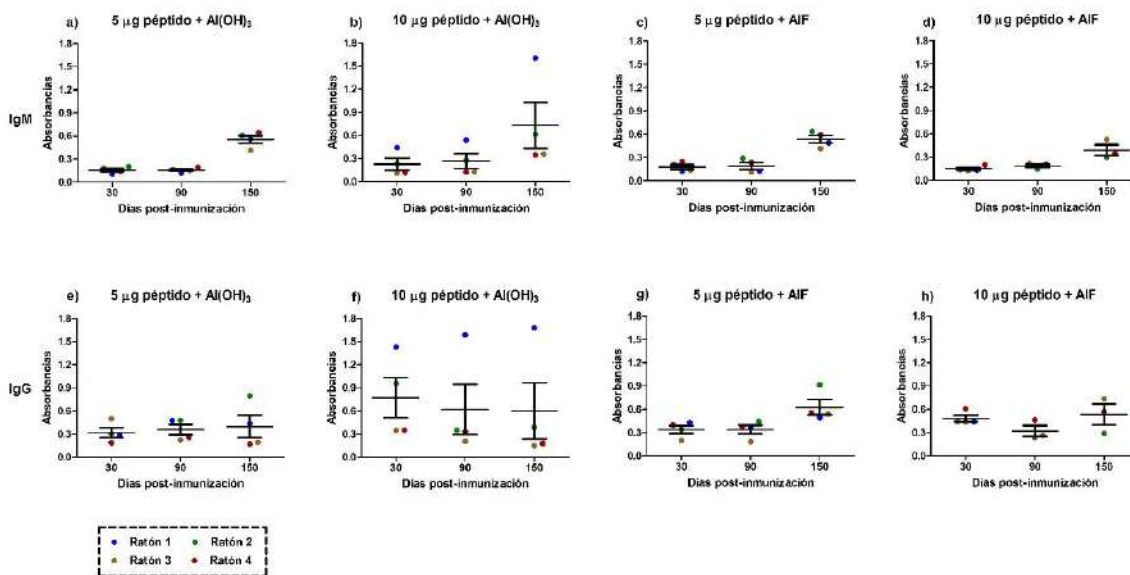
### **3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

Inicialmente se determinaron los niveles de anticuerpos totales producidos contra el péptido KA-11-MAP8 en sueros pre-inmunes (día 0) y post-inmunización en los días 30, 60, 90, 120 y 150. Observamos que la producción de anticuerpos comienza a partir del día 30 en los grupos inoculados con dosis de 10  $\mu\text{g}$  del péptido KA-11-MAP8 en una mezcla homogénea con los adyuvantes  $\text{Al}(\text{OH})_3$  o AIF (Figura 1e y g). A partir del día 60 se observó la producción de anticuerpos en todos los grupos experimentales, siendo aun más evidente en el grupo inmunizado con dosis de 10  $\mu\text{g}$  del péptido +  $\text{Al}(\text{OH})_3$ , este mismo patron se mantuvo en las determinaciones correspondientes a los días 90, 120 y 150 (Figura 1e). En los grupos inmunizados con dosis de 5  $\mu\text{g}$  del péptido +  $\text{Al}(\text{OH})_3$  o AIF observamos la producción de anticuerpos a partir del día 60, siendo más evidente en los ratones inmunizados con el adyuvante  $\text{Al}(\text{OH})_3$  (Figura 3 panel d). Finalmente, en los ratones del grupo control y vehículo no se observó la producción de anticuerpos en ninguna de las seis determinaciones (Figura 1a-c).



**Figura 1. Detección de anticuerpos totales en los ratones inmunizados.** Se evaluó la presencia de anticuerpos totales durante los días 0 (pre), 30, 60, 90, 120 y 150. Panel a-c grupos control y panel d-g grupos experimentales. Cada ratón se encuentra representado con un patrón de color: azul (ratón 1), verde (ratón 2), café (ratón 3) y rojo (ratón 4). Las diluciones graficadas corresponden a los títulos 1:1000.

Una vez que se comprobó que el péptido era capaz de generar anticuerpos, se determinaron las clases IgM e IgG en los días 30, 90 y 150. Observamos que la producción de anticuerpos tanto IgM como IgG comenzó a partir del día 30, siendo más evidente en los grupos inoculados con dosis de 10 µg del péptido KA-11-MAP8 en una mezcla homogénea con los adyuvantes Al(OH)<sub>3</sub> o AIF (Figura 2b, d, f y h). La producción de anticuerpos IgG fue más evidente en el día 150, específicamente en el grupo inmunizado con dosis de 10 µg del péptido + Al(OH)<sub>3</sub> (Figura 2f).



**Figura 2. Detección de anticuerpos IgM e IgG en los ratones inmunizados.** Se evaluó la presencia de anticuerpos IgM e IgG durante los 30, 90, y 150. Panel a-d evaluación IgM; panel e-h evaluación IgG. Cada ratón se encuentra representado con un patrón de color: azul (ratón 1), verde (ratón 2), café (ratón 3) y rojo (ratón 4).

#### 4. CONCLUSIONES

El péptido KA-11-MAP8 derivado de Sintenina-1, fue capaz de inducir una respuesta humoral en ratones de la cepa Balb/C al inocularse en concentraciones de 5 y 10 µg en conjunto con el adyuvante hidróxido de aluminio e incompleto de Freund, lo cual sugiere la capacidad inmunogénica del péptido para inducir una respuesta inmune humoral contra células cancerosas que expresen este antígeno.

#### REFERENCIAS

- American Cancer Society. (2022). *Cancer Facts & Figures 2022*. Atlanta: American Cancer Society.
- Criscitello, C., Viale, G., & Curigliano, G. (2019). Peptide vaccines in early breast cancer. *The Breast*, 44, 128-134. <https://doi.org/10.1016/j.breast.2019.02.003>
- Das, S. K., Sarkar, D., Cavenee, W. K., Emdad, L., & Fisher, P. B. (2019). Rethinking glioblastoma therapy: MDA-9/Syntenin targeted small molecule. *ACS Chemical Neuroscience*, 10(3), 1121-1123. <https://doi.org/10.1021/acschemneuro.9b00016>
- Malonis, R. J., Lai, J. R., & Vergnolle, O. (2019). Peptide-Based vaccines: current progress and future challenges. *Chemical Reviews*, 120(6), 3210-3229. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.9b00472>
- Pradhan, A. K., Maji, S., Das, S. K., Emdad, L., Sarkar, D., & Fisher, P. B. (2020). MDA-9/Syntenin/SDCBP: New insights into a unique multifunctional scaffold protein. *Cancer and Metastasis Reviews*, 39(3), 769-781. <https://doi.org/10.1007/s10555-020-09886-7>
- Yu, Y., Li, S., Wang, K., & Wan, X. (2019). A PDZ protein MDA-9/Syntenin: as a target for cancer therapy. *Computational and Structural Biotechnology Journal*, 17, 136-141. <https://doi.org/10.1016/j.csbj.2019.01.002>

1

---

<sup>1</sup> Los autores del trabajo autorizan a la Universidad Internacional de Ciencia y Tecnología (UNICYT) a publicar este resumen en extenso en las Actas del Congreso IDI-UNICYT 2023 en Acceso Abierto (Open Access) en formato digital (PDF) e integrarlos en diversas plataformas online bajo la licencia CC: Attribution-NonCommercial-ShareAlike 4.0 International (CC BY-NC-SA 4.0) <https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/>.