



UNIVERSIDAD PERUANA  
CAYETANO HEREDIA

“EFECTO ADYUVANTE DE ADYUVAX Y  
RESIQUIMOD SOBRE LA EXPRESIÓN  
RELATIVA DEL ARNm Y PRODUCCIÓN  
DE CITOCINAS INFLAMATORIAS EN  
MACRÓFAGOS DE POLLO HD-11  
INFECTADOS CON EL VIRUS DE  
NEWCASTLE”

TESIS PARA OPTAR EL GRADO DE MAESTRA  
EN INMUNOLOGÍA

MELANIE CLAIRE CABALLERO GARCIA

LIMA – PERÚ

2023



**ASESOR:**

Iván Lozada Requena MSc., PhD.

UPCH

**CO ASESOR:**

Sandra Palma Albornoz MSc., PhD.

QUIMTIA

**JURADO DE TESIS**

MG. WILLY MANUEL CERON TELLO

PRESIDENTE

DR. JOHNY CESAR PONCE CANCHIHUAMAN

VOCAL

MG. MARCO ANTONIO ISAIAS CABELLO NAPURI

SECRETARIO

## **DEDICATORIA**

A mi mamá, por ser mi ejemplo para incursionar en investigación.

A mi hijo Sebastián, por ser mi principal motivación.

## **AGRADECIMIENTOS**

A mí querida familia (esposo, padres, hijo y hermanos), por su apoyo constante y acompañamiento en este tiempo de grandes retos.

A mi equipo de Investigación y Desarrollo de QUIMTIA S.A. por el soporte técnico-científico de siempre.

A mi asesor, PhD. Ivan Lozada, y Co-asesora, PhD. Sandra Palma, por su orientación, enseñanzas y paciencia para el desarrollo de este estudio experimental.

## **FUENTES DE FINANCIAMIENTO**

A la empresa QUIMTIA S.A. por permitirme estudiar sobre su adyuvante “ADYUVAX”, ejecutar este estudio de investigación en sus instalaciones y brindarme todas las facilidades que permitieron el desarrollo del presente trabajo de investigación.

# EFFECTO ADYUVANTE DE ADYUVAX Y RESIQUIMOD SOBRE LA EXPRESIÓN RELATIVA DEL ARNm Y PRODUCCIÓN DE CITOCINAS INFLAMATORIAS EN MACRÓFAGOS DE POLLO HD-11 INFECTADOS CON EL VIRUS DE NEWCASTLE

## NORMA DE ORIGINALIDAD

12%	11%	10%	3%
INDICE DE SIMILITUD	FUENTES DE INTERNET	PUBLICACIONES	TRABAJOS DEL ESTUDIANTE

## FUENTES PRIMARIAS

1	<a href="https://patents.google.com">patents.google.com</a> Fuente de Internet	1%
2	<a href="https://hdl.handle.net">hdl.handle.net</a> Fuente de Internet	1%
3	<a href="https://www.researchgate.net">www.researchgate.net</a> Fuente de Internet	1%
4	<a href="https://1library.co">1library.co</a> Fuente de Internet	1%
5	<a href="https://es.scribd.com">es.scribd.com</a> Fuente de Internet	<1%
6	<a href="https://repositorio.upch.edu.pe">repositorio.upch.edu.pe</a> Fuente de Internet	<1%
7	<a href="https://repositorio.xoc.uam.mx">repositorio.xoc.uam.mx</a> Fuente de Internet	<1%
8	<a href="https://repositorio.unal.edu.co">repositorio.unal.edu.co</a> Fuente de Internet	<1%

## TABLA DE CONTENIDOS

### RESUMEN

### ABSTRACT

<b>I. INTRODUCCIÓN</b> .....	1
<b>II. OBJETIVOS</b> .....	6
<b>2.1 Objetivo general</b> .....	6
<b>2.2 Objetivos específicos</b> .....	6
<b>III. METODOLOGÍA</b> .....	7
<b>3.1. Materiales y métodos</b> .....	7
<b>3.1.1. Cultivo celular de HD-11</b> .....	7
<b>3.1.2. Propagación de la Cepa viral</b> .....	8
<b>3.1.3. Titulación Viral por qRT-PCR</b> .....	8
<b>3.1.4. Determinación de la citotoxicidad de Adyuvax y R-848</b> .....	9
<b>3.1.5. Estimulación con vENC</b> .....	12
<b>3.1.6. Exposición a diferentes tratamientos</b> .....	13
<b>3.1.7. Extracción de ARN</b> .....	14
<b>3.1.8. Tratamiento con ADNasa</b> .....	14
<b>3.1.9 PCR Punto final</b> .....	15
<b>3.1.10. Síntesis de ADN complementario</b> .....	16
<b>3.1.11 Optimización de la reacción de PCR en tiempo real</b> .....	16
<b>3.1.12 Evaluación de la expresión de genes mediante RT-PCR</b> .....	17
<b>3.1.13 ELISA</b> .....	19
<b>3.1.14 Producción de óxido nítrico por el método de Griess</b> .....	20
<b>3.2 Consideraciones éticas</b> .....	20
<b>3.3 Análisis estadístico</b> .....	21

<b>IV. RESULTADOS .....</b>	<b>22</b>
<b>4.1 Citotoxicidad de los adyuvantes en células HD-11.....</b>	<b>22</b>
<b>4.1.1. Citotoxicidad de Adyuvax .....</b>	<b>22</b>
<b>4.1.2. Citotoxicidad de R-848 .....</b>	<b>23</b>
<b>4.1.3. Citotoxicidad de la combinación de R-848 y Adyuvax .....</b>	<b>26</b>
<b>4.2 Morfología de las células HD-11 infectadas con vENC .....</b>	<b>27</b>
<b>4.3. Expresión de genes de citocinas inflamatorias en las células HD-11 infectadas y estimuladas con los adyuvantes. ....</b>	<b>30</b>
<b>4.4. Producción de citocinas .....</b>	<b>32</b>
<b>4.5. Activación de las células HD-11 infectadas con vENC y estimuladas con los adyuvantes .....</b>	<b>32</b>
<b>V. DISCUSIÓN .....</b>	<b>36</b>
<b>VI. CONCLUSIONES .....</b>	<b>43</b>
<b>VII. RECOMENDACIONES.....</b>	<b>44</b>
<b>VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>45</b>

## **ANEXOS**

**ANEXO 1: Morfología de células HD-11 expuestas a diferentes concentraciones de Adyuvax**

**ANEXO 2: Morfología de células HD-11 expuestas a diferentes concentraciones de R-848**

**ANEXO 3: Morfología de células HD-11 expuestas a la combinación de Adyuvax y R-848**

**ANEXO 4: Tratamiento con ADNasa**

**ANEXO 5: Optimización de condiciones del RT-PCR para citocina**

## ABREVIATURAS Y SIMBOLOS

ADN	: Ácido desoxirribonucleico
ADNc	: Ácido desoxirribonucleico complementario
C <sub>t</sub> GOI	: Umbral de ciclos del gen de interés (por las siglas en inglés Cycle Threshold Gen of interest)
DF-1	: Línea celular tipo fibroblasto de embrión pollo DF-1
DMEM	: Medio de cultivo Dulbecco's Modified Eagle's
ELISA	: Ensayo de Inmunoabsorción ligado a enzima
ENC	: Enfermedad de Newcastle
HD-11	: Línea celular tipo macrófagos de pollo HD-11
IC50	: Concentración inhibitoria 50
IL-1 $\beta$	: Interleuquina 1 tipo $\beta$
IFN- $\gamma$	: Interferón tipo gamma
MOI	: Unidad de Multiplicidad de Infección (por las siglas en inglés Multiplicity of infection)
MTS	: Dimetiltiazol caroximetoxigenil sulfofenil tetrazolium (por las siglas en inglés [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium, inner salt)

ng/mL	: Nanogramo por mililitro
PBS	: Buffer fosfato salino (por las siglas en inglés Phosphate Buffered Saline)
PFU	: Unidades formadoras de placa (por las siglas en inglés Plaque-Forming Unit)
PMS	: Metosulfato de fenazina (por las siglas en inglés Phenazine methosulfate)
P/S/A	: Penicilina, estreptomicina y anfotericina B
R-848	: Resiquimod
RPMI	: Medio de cultivo, Instituto Conmemorativo de Parque Roswell (por sus siglas en inglés Roswell Park Memorial Institute)
RT-PCR	: Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (por sus siglas en inglés Real-Time Polymerase Chain Reaction)
SPF	: Libre de patógenos específicos (por sus siglas en inglés Specific Pathogen Free)
TLR	: Receptor Tipo Toll (por sus siglas en inglés Toll Like Receptor)
TLR-7 Receptor-7)	: Receptor Tipo Toll 7 (por sus siglas en inglés Toll Like Receptor-7)
vENC	: Virus de la Enfermedad de Newcastle
$\Delta\Delta C_t$	: Delta Delta Umbral de ciclos (por sus siglas en inglés Delta delta Cycle Threshold)

$\Delta C_{t \text{ sample}}$  : Delta Umbral de ciclos de la muestra (por sus siglas en inglés  
Cycle Threshold sample)

## LISTA DE TABLAS

- TABLA 1. Conteo celular y viabilidad celular
- TABLA 2. Concentraciones finales individuales (C) de Adyuvax y R-848 usados para cada ensayo de citotoxicidad
- TABLA 3. Combinación de las concentraciones finales (C) de Adyuvax y R-848
- TABLA 4. Esquema de tratamientos por cada grupo experimental (G) usando las concentraciones finales
- TABLA 5. Secuencia de los *primers forward* y *reverse* utilizados para el RT-PCR

## **LISTA DE FIGURAS**

- FIGURA 1. Análisis de citotoxicidad de Adyuvax
- FIGURA 2. Análisis de citotoxicidad de Resiquimod
- FIGURA 3. Concentración inhibitoria 50 de Resiquimod
- FIGURA 4. Análisis de citotoxicidad de la combinación de Adyuvax y Resiquimod
- FIGURA 5. Imágenes representativas de células HD-11 expuestas a diferentes tratamientos con Adyuvax y R-848 a diferentes tiempos de incubación
- FIGURA 6. Niveles de expresión diferencial de mRNA de IL-1 $\beta$  e IFN- $\gamma$  en células HD-11
- FIGURA 7. Niveles de expresión diferencial de mRNA de iNOS en células HD-11
- FIGURA 8. Evaluación de la producción de óxido nítrico en sobrenadante de las células HD-11

## LISTA FIGURAS ANEXO

FIGURA 1 ANEXO. Imágenes representativas de células HD-11 expuestas a diferentes tratamientos de Adyuvax. Células HD-11 tratadas con 12.5, 50, 200 y 800  $\mu\text{g/mL}$  de Adyuvax por 24 h (A) y 48 h (B)

FIGURA 2 ANEXO. Imágenes representativas de células HD-11 expuestas a diferentes tratamientos de R-848

FIGURA 3 ANEXO. Imágenes representativas de células HD-11 expuestas a la combinación de Adyuvax más R-848 por 24 y 48h

FIGURA 4 ANEXO. Evaluación por PCR de contaminación con ADN genómico en muestras de ARN

FIGURA 5 ANEXO. Evaluación de especificidad analizando las curvas *melting* mediante RT-PCR en gradiente

FIGURA 6 ANEXO. Evaluación de especificidad usando RT-PCR en gradiente

## RESUMEN

El futuro del desarrollo de adyuvantes vacunales consiste en la combinación de dos o más de ellos a fin de obtener una potente respuesta inmune en las aves. Resiquimod (R-848), un agonista sintético de TLR-7/8, unido a Adyuvax, un adyuvante a base de fosfatos de calcio, sales de aluminio y magnesio, podrían tener un efecto sinérgico. Por tanto, el objetivo de este estudio fue evaluar *in vitro* el efecto de la coadministración de Adyuvax y R-848 en la expresión relativa y producción de citocinas proinflamatorias en macrófagos de pollos infectados con virus de la enfermedad de Newcastle (vENC). Mediante el ensayo de MTS se evaluó la citotoxicidad de ambos adyuvantes sobre macrófagos de pollo HD-11, posteriormente las células se estimularon con el vENC y se trataron con dosis de cada adyuvante por 6, 12, 24 y 48 h. Los niveles expresión del ARNm de IL-1 $\beta$  e IFN- $\gamma$  y la producción de ambas citocinas se evaluaron por cada tiempo de exposición a los diferentes tratamientos de Adyuvax y R-848 mediante PCR y ELISA respectivamente. Paralelamente, se evaluó la expresión génica de iNOS y la producción de óxido nítrico. Se evidenció que cada adyuvante individualmente como en combinación no fueron citotóxicos en las células HD-11. Por otro lado, la combinación de Adyuvax y R-848 mostraron resultados similares al grupo de R-848 solamente ante la expresión relativa de ARN mensajero de IL-1 $\beta$ , IFN- $\gamma$ , iNOS y la producción de óxido nítrico en células HD-11 infectadas. No se detectó la producción de IL-1 $\beta$  ni IFN- $\gamma$ . La combinación de Adyuvax y R-848 sólo presentó un efecto sinérgico y con una diferencia estadísticamente significativa a los otros grupos tratados en la expresión relativa de iNOS e IFN- $\gamma$  a las 12 h y 6 h respectivamente, pero no se sostiene en el tiempo. Se atribuye este efecto a la acción

inmunomoduladora de R-848. La integración de estos dos adyuvantes en la formulación de vacunas inactivadas puede ser de utilidad para mejorar la respuesta inmune celular de las vacunas inactivadas en aves.

**PALABRAS CLAVES:** Resiquimod, Adyuvax, adyuvante, citocinas, virus de la enfermedad de Newcastle

## ABSTRACT

The future of the adjuvants development for vaccines consists in the combination of two or more of them to obtain a powerful immune response in poultry. Resiquimod (R-848), a synthetic TLR-7/8 agonist, together with Adyuvax, an adjuvant based on calcium phosphates, Al and Mg salts, might have a synergistic effect. Therefore, the objective of this study was to evaluate the effect *in vitro* of the co-administration of Adyuvax with R-848 on the relative expression and production of proinflammatory cytokines in chicken macrophages infected with virus of Newcastle Disease. Using the MTS assay, the cytotoxicity of both adjuvants on HD-11 chicken macrophages was evaluated. Subsequently, the cells were stimulated with the Newcastle disease virus (vENC) and treated with doses of each adjuvant for 6, 12, 24 and 48 hours. The mRNA expression levels of IL-1 $\beta$  e IFN- $\gamma$  were evaluated for each exposure time to the different Adyuvax and R-848 treatments by real-time PCR and cytokine production by ELISA. In parallel, iNOS gene expression and nitric oxide production were evaluated. It was shown that the combination of both adjuvants was not toxic to HD-11 cells. On the other hand, the combination of Adyuvax and R-848 showed similar results to the R-848 group regarding the relative expression of IL-1 $\beta$ , IFN- $\gamma$ , iNOS and nitric oxide production in HD-11 cell line. The combination of Adyuvax and R-848 just presented a synergistic effect and with a statistically significant difference to the other treated groups in the relative expression of iNOS and IFN-g at 12 h and 6 h respectively, but it is not sustained over time. This effect is attributed to the immunomodulatory action of R-848. The integration of these two adjuvants in the formulation of

inactivated vaccines can be useful to improve the cellular immune response of inactivated vaccines in poultry.

**KEYWORDS:** Resiquimod, Adyuvax, adjuvant, cytokines, Newcastle disease virus.

## I. INTRODUCCIÓN

La industria avícola es una de las industrias más grandes de producción animal en el mundo (1), la cual está siendo económicamente afectada por la incidencia de enfermedades infecciosas en las aves de corral. Dentro de las múltiples enfermedades aviarias, se encuentra la Enfermedad de Newcastle (ENC) (2,3), causada por un virus de tipo ARN monocatenario de hebra negativa, del género *Orthoavulavirus* perteneciente a la familia *Paramyxoviridae* (4).

Los brotes de la ENC se han reportado en todos los continentes del mundo, ocasionando una elevada morbilidad y mortalidad en aves de diferentes edades, lo que repercute en importantes pérdidas económicas (2). La ENC se transmite por contacto directo de las heces, descargas respiratorias, alimento y agua contaminada. Las aves enfermas presentan síntomas como secreción nasal, lagrimeo, depresión, pérdida de apetito, diarreas verdosas, signos nerviosos, incoordinación de movimientos y torticolis. Según su patogenicidad, las cepas se clasifican en lentogénica o leve, mesogénica o moderada y velogénica o muy virulenta (5).

Actualmente, no existe tratamiento contra ENC, pero sí protocolos de vacunación, que son considerados la intervención médica preventiva más efectiva y segura (6,7). Sin embargo, a pesar de que las vacunas inactivadas induzcan una respuesta humoral elevada (mediante la producción de anticuerpos neutralizantes que protegen a las aves contra la enfermedad), la respuesta inmune mediada por células es débil, no logrando prevenir la diseminación viral ni la propagación de la infección; lo que conduce a una incompleta respuesta inmunológica (8,9). Por lo tanto, se necesita reforzar la inmunogenicidad de las vacunas con agentes

inmunomoduladores.

En la formulación de las vacunas inactivadas existen componentes denominados adyuvantes que actúan como inmunomoduladores dirigiendo una potente respuesta inmunológica (10). Aunque, su mecanismo de acción no está totalmente caracterizado, los estudios revelan principales modos de acción, tales como: la formación del depósito vacunal, la secreción de citocinas y quimioquinas, reclutamiento de células inmunes, la captación del antígeno, procesamiento y expresión del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) clase II, migración hacia los nódulos linfáticos y expresión de moléculas coestimuladoras para desencadenar la respuesta inmune adaptativa (11).

Los adyuvantes son compuestos a base de aluminio, fosfatos de calcio, componentes microbianos, emulsiones de aceite y agua, citocinas y agonistas de los Receptores Tipo Toll (TLR) capaces de reforzar la respuesta inmune de la vacuna (12–14).

Los adyuvantes agonistas de TLR tienen un papel importante en las células de la respuesta inmune innata por su potente acción inmunomoduladora al estimular la producción de citocinas e inhibir la replicación viral (15). Actualmente, en pollos se han identificado 10 TLRs, tales como: TLR-1 (A y B), TLR-2 (A y B), TLR-3, TLR-4, TLR-5, TLR-7, TLR-15 y TLR-21 (16). Entre ellos, el TLR-7 reconoce y se une a componentes del ARN de una sola cadena rica en guanosina-uridina (GU) o secuencias ricas en poli-U o sus análogos sintéticos como Resiquimod (R-848) (17).

R-848 es una molécula sintética que pertenece a la familia de imidazoquinolina y

es considerado como un potente inmunomodulador de la respuesta inmune y un componente antiviral (8,18,19). R-848 activa a los macrófagos a través de vías de señalización dependientes de MyD88 de TLR-7/TLR-8; y desencadena la activación del factor nuclear Kappa B (NF- $\kappa$ B) (20) estimulando la producción de interferones de tipo I (IFN- $\alpha$  and IFN- $\beta$ ) y tipo II (IFN- $\gamma$ , antiviral), interleucina (IL) -4, IL-12, IL-1 $\beta$ , óxido nítrico sintetasa inducible (iNOS), además del factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) (17).

Ramakrishnan y col, en un estudio *in vitro* demostraron que las células mononucleares de sangre periférica de pollos estimularon la expresión de IFN- $\beta$ , IFN- $\gamma$ , IL-1 $\beta$ , IL-4 y TRL-7 después de la administración con R-848 (19). Posteriormente, ese mismo grupo reportaron que la combinación de R-848 con una vacuna inactivada de vENC confirió una completa inmunidad en pollos desafiados con vENC. Además, R-848 fue capaz de sobre regular la expresión génica de citocinas IFN tipo I, IFN tipo II, IL-4, iNOS, IL-1 $\beta$  y MHC-II, en los esplenocitos de esas aves cuando fueron comparados con los que recibieron sólo la vacuna inactivada (8).

En otro estudio *in vitro*, Gupta y col, demostraron que R-848 además, de presentar un efecto antiviral contra el virus vENC en células DF-1, estimuló una elevada expresión de genes tales como, de IL-18, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$ , importantes en la respuesta inmune innata del hospedero frente al antígeno viral (18). Por otro lado, el diseño de una formulación vacunal contra la fiebre aftosa en ratones, mostró también que la combinación de R-848 con Poly I:C (agonista de TLR3) e hidróxido de aluminio aumentaron cuatro veces el nivel de anticuerpos IgG con respecto al

grupo que sólo recibió aluminio (21). Todos esos estudios mencionados tanto *in vitro* e *in vivo* sugieren considerar que R-848 es un adyuvante que individualmente o en la combinación con otros adyuvantes es capaz de reforzar la inmunogenicidad de las vacunas por la activación de células de la inmunidad innata.

Diferente a los agonistas de TLR, los adyuvantes a base de aluminio y fosfatos de calcio no son reconocidos por receptores de reconocimiento patrón (PRR, por sus siglas en inglés) en las células (11). Estos adyuvantes inducen una señal de daño causado por el sitio de la inyección y muerte celular en el tejido, este daño no infeccioso conocido como patrones moleculares asociados a muerte (DAMP, por sus siglas en inglés), producen especies reactivas de oxígeno (ROS, por sus siglas en inglés), adenosina trifosfato (ATP, por sus siglas en inglés), ácido úrico (UA, por sus siglas en inglés), provocando la activación del inflamasoma: el dominio de oligomerización de unión a nucleótidos (NOD, por sus siglas en inglés), proteínas que contienen repeticiones ricas en leucina (LRR, por sus siglas en inglés) – conteniendo miembros de las familias de proteínas (NLRP3, por sus siglas en inglés) (11,22). El inflamasoma NLRP3, mecanismo importante de la inmunidad innata es una plataforma molecular y presenta un papel importante en el efecto del adyuvante de aluminio induciendo la producción de citocinas proinflamatorias IL-1 $\beta$  e IL-18 por macrófagos (22).

El adyuvante vacunal denominado Adyuvax (desarrollado por Quimtia S.A., con certificado de marca en INDECOPI N° 00327943 y utilizado en la vacuna Inmuno Broiler con registro SENASA N° B.01.2.01.N.0850), ha sido diseñado a base de fosfatos de calcio, sales minerales como aluminio y magnesio, viscosantes, agua grado inyectable entre otros; y actualmente es usado en vacunas inactivadas

veterinarias contra diferentes enfermedades que acechan a la industria avícola peruana entre ellas ENC.

Las vacunas inactivadas con adyuvantes de tipo mineral y oleoso (11) similar a la composición de Adyuvax inducen una respuesta inmune humoral (8,10,23); mediante la elevación de títulos de anticuerpos específicos contra vENC (24,25). Fawzy y cols, no lograron inducir anticuerpos aplicando vENC inactivado sin adyuvante. Por su parte Hongzhuan y cols, reportan que la vacuna con adyuvante oleoso y antígeno inactivado con formaldehído indujo los títulos más altos que al grupo al que se le aplicó únicamente solución salina (5.36 y 1.92 títulos por HI respectivamente) (25). Ello demuestra que una vacuna potente requiere de buenos antígenos, pero también de la selección de un adyuvante capaz de estimular una respuesta inmune (24).

Investigaciones científicas, utilizan la línea celular HD-11 derivada de la médula ósea del pollo, que constituye ser una buena candidata de célula inmune innata para explorar las propiedades de inmunoactividad o inmunomodulación de los adyuvantes para los agonistas de TLR, liposomas, péptidos de defensa del huésped, citocinas, además para bacterias y replicación viral (26).

Actualmente, no se conoce el mecanismo de acción de Adyuvax en células de la respuesta inmune innata y poco son los estudios que señalan que R-848 estimula una respuesta inmunomodulatoria en combinación con otros adyuvantes. Por tal motivo, el objetivo principal del presente estudio fue evaluar el efecto de los adyuvantes Adyuvax y R-848 sobre la expresión relativa del ARNm y la producción

de citocinas inflamatorias en macrófagos HD-11 infectados con el virus de Newcastle.

## **II. OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo general**

- Evaluar el efecto de los adyuvantes Adyuvax y R-848 sobre la expresión relativa del ARNm y la producción de citocinas inflamatorias en macrófagos de pollo HD-11 infectados con el virus de la Enfermedad de Newcastle.

### **2.2 Objetivos específicos**

- Evaluar *in vitro* la citotoxicidad de Adyuvax y R-848 en células de macrófagos de pollos (HD-11).
- Medir la expresión relativa del ARN mensajero de citocinas inflamatorias y la producción en forma de proteína de IFN- $\gamma$  e IL-1 $\beta$  en la línea celular de macrófagos de pollos infectados con vENC y expuestos a Adyuvax y R-848.
- Evaluar la activación de las células HD-11 infectados con vENC y expuestos a Adyuvax y R-848 mediante la expresión relativa del ARN mensajero de iNOS y la producción de óxido nítrico.

### **III. METODOLOGÍA**

#### **3.1. Materiales y métodos**

##### **3.1.1. Cultivo celular de HD-11**

Se utilizó la línea celular inmortalizada derivada de macrófago de pollo HD-11 (Banco de Células de Río de Janeiro, código 0099), conservada en medio RPMI-1640 (Sigma-Aldrich). Un criovial de la línea celular HD-11 se descongeló y se resuspendió en 9 mL de medio RPMI-1640 (Sigma-Aldrich) suplementado con 1.5 g/L de bicarbonato de sodio, 0.11 g/L de piruvato de sodio, 2.5 g/L de glucosa, 2.383 g/L de HEPES, 20% de SBF, 100 IU/mL de penicilina, 0.01 mg/mL de estreptomicina y 0.25 µg/mL de anfotericina B (en adelante se denominará RPMI). Seguidamente, se realizó un lavado con RPMI por 5 minutos a 1100 rpm y las células se sembraron en un frasco T-75 con 15 mL de RPMI a 37°C, 5% CO<sub>2</sub> por 72 horas. (27).

Transcurrido el periodo de incubación, y luego de haber obtenido una confluencia de 80-90%, las células se tripsinizaron con 0.25% de tripsina-EDTA (Sigma-Aldrich) y se determinó el conteo y la viabilidad celular en un volumen final de 8 mL mediante azul de tripano (Tabla 1). Para los ensayos descritos posteriormente, se sembraron  $3.5 \times 10^4$  células por pozo en placas de 96 pozos (Corning COSTAR, Sigma-Aldrich) y  $2 \times 10^5$  células por pozo en placas de 24 pozos (Corning COSTAR, Sigma-Aldrich), en 100 µL y 500 µL de RPMI respectivamente.

Tabla 1. Conteo celular y viabilidad celular

Densidad celular	Vol. Total	Cantidad total	Viabilidad (%)
$3.79 \times 10^6$ cel/mL	8 mL	$30.3 \times 10^6$ cel	93.4

### 3.1.2. Propagación de la Cepa viral

La cepa de *Paramyxovirus aviar*, La Sota – lentogénica se obtuvo a partir del *American Type Culture Collection* (ATCC; Código: VR – 699). El virus se propagó en la línea celular DF-1, para ello, se infectó un frasco T-75 de células en un volumen de 15 mL de RPMI, seguidamente se incubaron a 37°C con 5% CO<sub>2</sub> por tres días hasta la observación del efecto citopático (células en suspensión con pérdida de la monocapa celular, mientras que las células que se mantuvieron adheridas se muestran con formación de sincitios y agregación celular, y presencia de detritus celular) mediante un microscopio invertido (EVOS M5000, Thermo Fisher Scientific), finalmente se colectó el sobrenadante y se conservó a -80°C (Cepario de Quintia S.A.) hasta antes de su uso.

### 3.1.3. Titulación Viral por qRT-PCR

La cantidad de partículas virales en el inóculo se determinó por RT-PCR cuantitativo (qRT-PCR) con la finalidad de conocer la cantidad de virus a infectar en los macrófagos. La técnica y los cebadores (*primers*) usados (LaSota F/NDVR2) están basados en el gen F (proteína de fusión) de vENC, y se usaron de acuerdo a

estudios previos (28,29). Brevemente, se construyó un plásmido estándar clonando una región del gen F de vENC en el plásmido pGEM-T (Promega, USA). Para los ensayos de detección y cuantificación se usó 1  $\mu$ L de las diluciones seriadas de Log 10 del plásmido estándar y 1  $\mu$ L del cADN del inóculo de vENC. La amplificación se realizó en el termociclador QuantStudio 5 (Applied Biosystems, USA) usando *Power Up SYBR Green Master Mix* con las condiciones de 50<sup>0</sup>C por 2 min, seguido de 95<sup>0</sup>C por 2 min, seguido de 40 ciclos de 95<sup>0</sup>C por 15 seg, 60<sup>0</sup>C por 30 seg y 72<sup>0</sup>C por 20 seg. Los resultados de la cuantificación viral se expresaron en número de copias por mL.

#### **3.1.4. Determinación de la citotoxicidad de Adyuvax y R-848**

La citotoxicidad de Adyuvax y R-848 se evaluó mediante el ensayo de viabilidad celular colorimétrico usando el *kit MTS assay Cell Titer 96® AQueous Non-Radioactive Cell Proliferation Assay* (Promega, USA), que determina el número de células viables en proliferación. El MTS es bio-reducido por las células a formazan mediante enzimas deshidrogenasas que se encuentran en células metabólicamente activas y la cantidad de este producto se mide por la absorbancia a 490 nm que es directamente proporcional al número de células vivas. Las células HD-11 se cultivaron en placas de 96 pozos a 37<sup>0</sup>C con 5% de CO<sub>2</sub> y luego de alcanzar una confluencia de 70% a las 24 h, se expusieron a diferentes concentraciones individuales de Adyuvax (concentraciones finales: desde 12.5 hasta 800  $\mu$ g/mL en un volumen de 100  $\mu$ l por pozo) y R-848 (concentraciones finales: 2.5 hasta 320  $\mu$ g/mL en un volumen de 100  $\mu$ l por pozo) (Tabla 2). Como control negativo las

células no se trataron con ningún adyuvante y como control positivo las células se expusieron a etanol al 50%. Se incubaron a 37°C a 5% de CO<sub>2</sub>. Transcurrido el tiempo de incubación de 24 h y 48 h se continuó con el protocolo MTS/PMS siguiendo las especificaciones del fabricante. Se adicionó 20 µL del reactivo MTS/PMS a todos los pozos de la placa, se incubaron a 37°C por 4 horas y luego se midió la absorbancia a 490 nm. Los ensayos se realizaron por cuadruplicado y se repitieron tres veces.

La citotoxicidad se determinó por la concentración inhibitoria al 50% (IC<sub>50</sub>) y la clasificación de los niveles de toxicidad (30,31). La IC<sub>50</sub> se determinó por la curva dosis respuesta mediante el programa GraphPad Prism 9 (GraphPad Software Inc.). Para ambos análisis, se utilizó el porcentaje de viabilidad celular de cada muestra de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$Viabilidad\ celular\ (\%) = \frac{\text{Densidad óptica de cada muestra}}{\text{Densidad óptica del control negativo}} \times 100\%$$

Control negativo: células no tratadas.

Los niveles de toxicidad, según los porcentajes de viabilidad obtenidos se clasificaron en:

- No citotóxico: > 90% de viabilidad celular
- Ligeramente citotóxico: 60-90% de viabilidad celular

- Moderadamente citotóxico: 30-59% de viabilidad celular
- Severamente citotóxico:  $\leq 30\%$  de viabilidad celular

Tabla 2. Concentraciones finales individuales (C) de Adyuvax y R-848 usados para cada ensayo de citotoxicidad

Adyuvantes	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8
Adyuvax ( $\mu\text{g/mL}$ )	12.5	25	50	100	200	400	800	-
R-848 ( $\mu\text{g/mL}$ )	2.5	5	10	20	40	80	160	320

Posterior a la determinación de las concentraciones óptimas de cada adyuvante, las células HD-11 se expusieron a la combinación de ambos compuestos (Tabla 3). En una placa de 96 pozos se sembraron las células HD-11 y luego de una incubación a  $37^{\circ}\text{C}$  con 5% de  $\text{CO}_2$  por 24 h, se expusieron con la combinación de ambos adyuvantes como se indica en la Tabla 3 y se continuó con el procedimiento descrito anteriormente. Las alteraciones morfológicas de los macrófagos se observaron y se registraron mediante fotografía usando el microscopio invertido EVOS M5000 (Thermo Fisher Scientific, USA). El ensayo de citotoxicidad de cada combinación se realizó por cuadruplicado.

Tabla 3. Combinación de las concentraciones finales (C) de Adyuvax y R-848

Adyuvante	C1	C2	C3	C4	C5	C6
Adyuvax ( $\mu\text{g/mL}$ )	25	50	100	25	50	100
R-848 ( $\mu\text{g/mL}$ )	10	10	10	20	20	20

### 3.1.5. Estimulación con vENC

Las células HD-11 se cultivaron en placas de 24 pozos a razón de  $2 \times 10^5$  células por pozo a  $37^\circ\text{C}$  con 5% de  $\text{CO}_2$  por 24 h. Transcurrida la incubación, los pozos se lavaron con PBS 1X y se infectaron con un MOI (Unidad de Multiplicidad de Infección) de 2 de vENC. El volumen de la suspensión viral (61.5  $\mu\text{l}$  por pozo) conteniendo el MOI de 2 se estimó a partir del número de copias obtenido en la cuantificación viral por qRT-PCR ( $6.5 \times 10^3$  números de copias/ $\mu\text{L}$ ) según la siguiente fórmula descrito por Zhang y colaboradores (32).

Donde:

MOI: unidades traducidas por célula (número de copias/células)

Densidad celular: número de células/ pozo

Título viral: número de copias/ $\mu\text{L}$

$$\text{Número total de partículas virales} = \frac{(\text{MOI})(\text{Número de células/ pozo})}{(\text{Título viral en número de copias}/\mu\text{L})}$$

Reemplazando valores:

$$\# = \frac{(2 \text{ número de copias/célula})(200000 \text{ células/ pozo})}{(6500 \text{ número de copias}/\mu\text{L})}$$

Por tanto, el volumen viral requerido para un MOI de 2 de un título de 6500 copias/ $\mu\text{L}$  fue de 61.5  $\mu\text{L}$ . Los pozos infectados de acuerdo a la Tabla 4 se incubaron

a 37°C con 5% de CO<sub>2</sub> durante una hora, y cada 10 minutos se agitó suavemente la placa. Al finalizar el tiempo de adsorción se añadieron los tratamientos como se indica en la Tabla 4.

### **3.1.6. Exposición a diferentes tratamientos**

Transcurrida la estimulación con vENC, las células HD-11 infectadas o no se expusieron a los diferentes tratamientos: 10 µg/mL de R-848 (G1), 50 µg/mL de Adyuvax (G2), 10 µg/mL de R-848 más 50 µg/mL de Adyuvax (G3), RPMI al control de infección con vENC (G4) y RPMI al control negativo, células sin infección (G5). Los volúmenes de cada compuesto y la combinación entre ellos se determinaron de acuerdo a sus concentraciones finales para un volumen final de 500 µl por pozo, como descrito en la Tabla 4.

El ensayo se realizó por triplicado para cada tratamiento y a diferentes tiempos de incubación (6, 12, 24 y 48 h) a 37 °C con 5% de CO<sub>2</sub>. Tras los periodos de incubación, se colectaron los sobrenadantes de cada pozo por tratamiento y se conservaron a -20°C para el ensayo de ELISA y el método de Griess. Mientras, las células de cada pozo se recuperaron añadiendo 500 µL de *RNA/DNA Shield* (Zymo Research, USA) para luego ser colectados en tubos libres de ARNasa y ser conservados a 4°C hasta antes de su extracción de ARN.

Tabla 4. Esquema de tratamientos por cada grupo experimental (G) usando las concentraciones finales

Tratamientos	R-848	Adyuvax	vENC	RPMI
G1	200 $\mu$ l	-	61.5 $\mu$ l	238.5 $\mu$ l
G2	-	200 $\mu$ l	61.5 $\mu$ l	238.5 $\mu$ l
G3	200 $\mu$ l	200 $\mu$ l	61.5 $\mu$ l	38.5 $\mu$ l
G4	-	-	61.5 $\mu$ l	438.5 $\mu$ l
G5	-	-	-	500 $\mu$ l

### 3.1.7. Extracción de ARN:

La extracción de ARN se realizó a partir de las células HD-11 recuperadas con el tampón de lisis *DNA/RNA Shield 2X* utilizando el kit *Quick DNA /RNA viral* (Zymo Research, USA) siguiendo las recomendaciones del fabricante. Las concentraciones de ARN se determinaron en el *Nanodrop One C* (Thermo Fisher Scientific, USA) usando 1  $\mu$ L de la muestra. El *ratio*  $A_{260}/A_{280}$  nos indicó la pureza del ARN.

### 3.1.8. Tratamiento con ADNasa

El ADN genómico del ARN total extraído fue digerido con ADNasa, usando el kit *RQ1 RNase-free DNase* (Promega, USA) siguiendo las recomendaciones del fabricante. Para ello, 23  $\mu$ L de ARN total se mezclaron con 4  $\mu$ L de *RQ1 DNase 10X Reaction Buffer*, 1  $\mu$ L (1 U/ $\mu$ L) de *RQ1 RNase-Free DNase* y cantidad suficiente de agua DEPC para un volumen final de 30  $\mu$ L. Seguidamente, se incubó

a 37°C por 50 minutos en el termociclador T-100 (Bio Rad, USA). Finalmente se adicionó 3 µL de la solución stop (20 mM EDTA) y se incubó a 65°C por 10 minutos. El ARN se cuantificó nuevamente en el *Nanodrop One C* (Thermo Fisher Scientific, USA) (Ver Anexo 4).

### **3.1.9 PCR Punto final**

Se realizó un PCR convencional para verificar la eliminación de ADN genómico en las muestras de ARN tratadas con ADNasa, para ello se usaron los *cebadores* para amplificar iNOS, IFN- $\gamma$  e IL-1 $\beta$  (Tabla 5). Las reacciones de PCR estuvieron compuestas de 12,5 µL de PCR *Master mix 2X* (Promega), 1 µL de *primer forward* (10 µM), 1 µL de *primer reverse* (10 µM), 1 µL de ARN (50-100 ng/µL) y 9.5 µL de agua ultrapura. Como control positivo se preparó una reacción con ARN sin tratamiento con DNasa. La reacción de PCR se realizó en el termociclador T-100 (BioRad, USA) usando las siguientes condiciones de ciclaje: 95°C por 3 minutos, 40 ciclos de 95°C por 30 segundos, 55°C por 30 segundos, 72°C por 20 segundos y extensión final de 72°C por 10 minutos. Las muestras fueron analizadas mediante el uso del sistema de electroforesis *RunView* (Clever Scientific, Reino Unido) con gel de agarosa al 1.5%, marcador de peso molecular 1 kb *Opti DNA marker* (ABM, Canadá), tampón de carga *Safe Green 6x* (ABM, Canadá) y TAE *Buffer 1X* (Clever Scientific, Reino Unido).

### **3.1.10. Síntesis de ADN complementario**

La reacción de transcripción reversa para la síntesis de ADN complementario se realizó mediante el Kit *Superscript IV first-strand cDNA synthesis* (Thermo Fisher Scientific, Wilmington, DE, USA) siguiendo las indicaciones del fabricante. En microtubos de 0.2 mL se pre-incubaron ARN (150 – 178 ng) con 1 µL de *primers hexamer* (50 ng/µL), 2 µL de dNTPs (10 mM) y agua DEPC (c.s.p, 13 µL) a 65°C por 5 minutos. Seguidamente, el tubo se transfirió a una cubeta de hielo por 1 minuto. Luego, se adicionaron 4 µL de tampón de reacción SSIV *Buffer 5x*, 1 µL de DTT (100 mM), 1 µL de inhibidor de ARNasa recombinante (40 U/µL) y 1 µL de transcriptasa reversa *Superscript IV* (200 U/µL). Las mezclas se incubaron a 23°C por 10 minutos, seguidamente de 50°C por 20 minutos, finalizando la reacción de síntesis a 80°C por 10 minutos. Luego, se adicionó 1µL de ARNasa H e incubo a 37°C por 20 minutos. Las concentraciones de ADNc se cuantificaron en el *Nanodrop One C UV-VIS spectrophotometer* (Thermo Fisher Scientific, USA).

### **3.1.11 Optimización de la reacción de PCR en tiempo real**

Las condiciones para desarrollar la metodología de RT-PCR para cuantificación relativa fue de acuerdo a un estudio previo (33). A partir de ello, se realizaron evaluaciones de las temperaturas de alineamiento (55, 57, 58, 59, 60 y 61°C) en el RT-PCR usando como referencias los genes de IFN- $\gamma$ , IL-1 $\beta$  y  $\beta$ -actina (Tabla 5). Los análisis de las curvas de melting de las reacciones RT-PCR se realizaron usando el ADNc sintetizado como descrito anteriormente. Luego se realizó el análisis con

las curvas melting de cada resultado y paralelamente se realizó electroforesis en gel de agarosa al 2% para verificar los productos obtenidos (Ver Anexo 5).

### **3.1.12 Evaluación de la expresión de genes mediante RT-PCR**

La expresión de los niveles de ARN de IFN- $\gamma$ , iNOS, IL-1 $\beta$  se analizaron por RT-PCR usando *primers* específicos (Tabla 5). La  $\beta$ -actina se usó como gen de referencia o normalizador (8). Cada reacción de RT-PCR se realizó con 10  $\mu$ L de *Power Up SYBR Green Master mix 2X* (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), 1  $\mu$ L de *primer forward* (10  $\mu$ M), 1  $\mu$ L de *primer reverse* (10  $\mu$ M), 1  $\mu$ L de ADNc (~ 1000 – 1400  $\eta$ g/ $\mu$ L) y agua ultrapura c.s.p 20  $\mu$ L. Las reacciones de amplificación se realizaron en placas *MicroAmp Fast optical* (Applied Biosystems) de 96-pozos (0.1 mL) con muestras en triplicado por cada grupo experimental (tratamiento) y grupo control (sin tratar) usando el termociclador *Quantstudio 5* (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Los resultados se analizaron con el *software Quantstudio design & analysis*.

Las condiciones de ciclaje fueron de: 50°C por 2 minutos, 95°C por 2 minutos, 40 ciclos de 95°C por 15 segundos, 60°C por 25 segundos y 72°C por 25 segundos (19). La especificidad de la amplificación fue determinada por electroforesis en gel de agarosa y análisis de la curva *melting* de las muestras y controles negativos (NTC), el cual consistió de un paso adicional de 95°C de desnaturación por 15 segundos, 60°C de alineamiento por 1 min, calentamiento a 95°C a una velocidad de 0,11°C por segundo. Los valores de las curvas *melting*,  $C_t$  fueron calculados a partir de las curvas de amplificación generadas usando el *software* del *Quantstudio 5*.

Tabla 5. Secuencias de los *primers forward* y *reverse* utilizados para el RT-PCR

Nombre de primer	Secuencias (5' - 3')*	Tamaño del producto (bp)
Primer IFN- $\gamma$ F	TGA GCC AGA TTG TTT CGA TG	152
Primer IFN- $\gamma$ R	CTT GGC CAG GTC CAT GAT	
Primer iNOS F	AGGCCAAACATCCTGGAGGTC	371
Primer iNOS R	TCATAGAGACGCTGCTGCCAG	
Primer IL-1 $\beta$ F	GGA TTC TGA GCA CAC CAC AGT	272
Primer IL-1 $\beta$ R	TCT GGT TGA TGT CGA AGA TGT C	
Primer $\beta$ -actina F	TAT GTG CAA GGC CGG TTT C	110
Primer $\beta$ -actina R	TGT CTT TCT GGC CCA TAC CAA	

\* Secuencias de oligos de acuerdo a Sachan et al. 2015

Los datos obtenidos se analizaron por cuantificación comparativa  $\Delta\Delta C_t$  usando el método de Livak (34). Este método compara los resultados experimentales de las muestras con un control (no tratadas) y un normalizador (gen *housekeeping*,  $\beta$  – actina). Los valores  $C_t$  (*Cycle threshold*) de los genes de interés (GOI) en muestras *test* y muestras control fueron ajustados en relación al  $C_t$  del gen normalizador  $\beta$  – actina para las 2 muestras, obteniéndose el  $\Delta C_t$  de las mismas [1-2]. Para obtener los valores  $\Delta\Delta C_t$  de cada gen se efectuó la diferencia entre los valores de  $\Delta C_t$

(muestra) –  $\Delta\text{Ct}$  (control), [3]. El nivel de expresión de cada gen fue determinado por  $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$  [4]

$$\text{Ct}_{\text{GOI}^t} - \text{Ct}_{\text{norm}^t} = \Delta\text{Ct}_{\text{muestra}} [1]$$

$$\text{Ct}_{\text{GOI}^c} - \text{Ct}_{\text{norm}^c} = \Delta\text{Ct}_{\text{control}} [2]$$

$$\Delta\text{Ct}_{\text{muestra}} - \Delta\text{Ct}_{\text{control}} = \Delta\Delta\text{Ct} [3]; 2^{-\Delta\Delta\text{Ct}} [4]$$

### 3.1.13 ELISA

La detección de citocinas IFN- $\gamma$  e IL-1 $\beta$  en los sobrenadantes de los cultivos tratados (Tabla 4) se realizó empleando el kit de ELISA tipo sándwich (Genorise Scientific INC, USA). El ensayo permite detectar citocinas en un rango de 19 – 1200  $\mu\text{g/mL}$  para IFN- $\gamma$  y de 62- 4000  $\mu\text{g/mL}$  para IL-1 $\beta$ .

Para ello, se agregó 100  $\mu\text{L}$  de la muestra diluida en cada pozo de la placa de 96 (previamente diluida (1:1) en “Assay Buffer”), luego se cubrió y se incubó por 1 hora a temperatura ambiente. Seguidamente, la placa fue lavada dos veces, y se agregó 100  $\mu\text{L}$  de la dilución de trabajo de la detección de anticuerpos a cada pozo, y se dejó incubar por 1 h a temperatura ambiente. Nuevamente la placa fue lavada dos veces, y se añadió 100  $\mu\text{L}$  de la dilución de trabajo del conjugado HRP a cada pozo, luego la placa fue cubierta y se incubó por 20 min a temperatura ambiente, y nuevamente se lavó la placa dos veces. Se añadió 100  $\mu\text{L}$  de la solución sustrato a cada pozo, y se incubó por 20 min a temperatura ambiente, pasado el tiempo se agregó 50  $\mu\text{L}$  de la solución Stop a cada pozo y las lecturas de absorbancia se

realizaron a 450 nm en el espectrofotómetro *Multiskan SkyHigh* (Thermo Fisher Scientific, USA).

#### **3.1.14 Producción de óxido nítrico por el método de Griess**

La producción de óxido nítrico por las células HD11 se evaluó mediante el ensayo de *Griess* (35) a partir de los sobrenadantes de las células infectadas con vENC expuestas a los diferentes tratamientos por 6, 12, 24 y 48 h (Tabla 4). El ensayo de Griess se realizó con 50 µL de sobrenadantes de cultivo que se transfirieron a pocillos (duplicado) de una placa de 96 pozos y se mezclaron con 50 µL de 1% de Sulfanilamida disuelto en 5% de ácido fosfórico. Se incubó por 10 min a temperatura ambiente, seguidamente se adicionó 50 µL de 0.3% N-(1-naftil) etilendiamina disuelto en agua, y se incubó por 10 minutos a temperatura ambiente. Una serie de diluciones estándar de nitrito  $\text{NaNO}_2$  de 3,13–100 µM (Sigma-Aldrich, Merck, St. Louis, MO, USA) se incluyó para generar una curva estándar por duplicado. Las concentraciones de nitritos se determinaron por absorbancia a 540 nm de acuerdo con la curva estándar de nitrito.

#### **3.2 Consideraciones éticas**

El proyecto de investigación fue revisado y registrado con el código SIDISI N° 207559; tras la evaluación del proyecto la Dirección Universitaria de Investigación, Ciencia y Tecnología de la Universidad Peruana Cayetano Heredia informa mediante el oficio CAREG-ORVEI-021-22, que de acuerdo al Manual de

Procedimientos de la universidad, y por sus características, el proyecto no requiere evaluación por el Comité Institucional de Ética en Humanos o en Animales, pudiendo iniciar la ejecución.

### **3.3 Análisis estadístico**

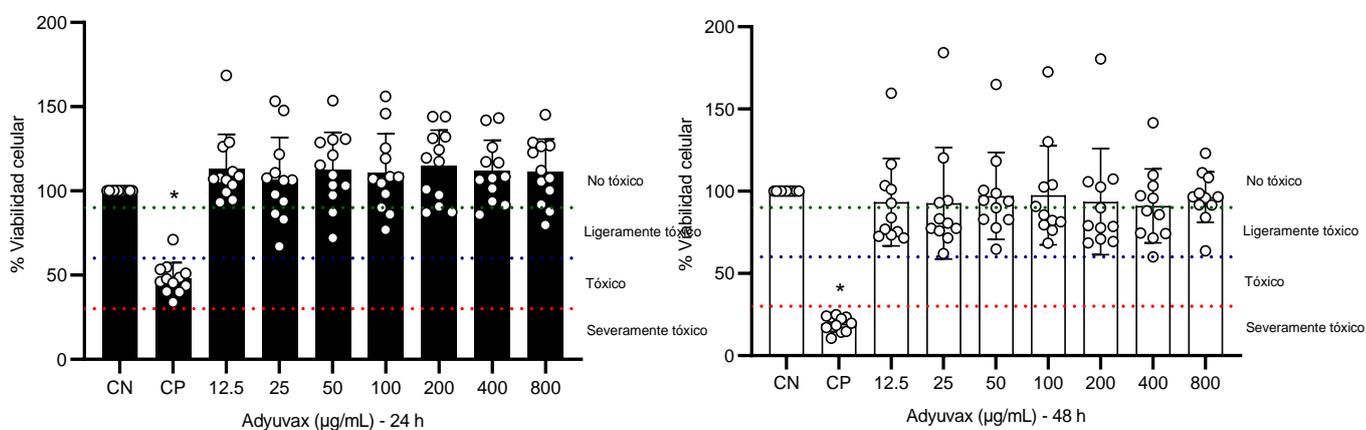
El ensayo de citotoxicidad de cada adyuvante evaluado individualmente se realizó por cuadruplicado y se repitió tres veces; y el ensayo de citotoxicidad de la combinación de ambos adyuvantes se realizó por cuadruplicado en un solo experimento. Mientras que el ensayo de expresión de genes y medición del óxido nítrico se realizó por triplicado en un solo experimento. Los datos colectados se analizaron usando el programa estadístico GraphPad versión 9 (GraphPad Software Inc. CA, USA). Para el análisis de distribución normal se utilizó el test de *D'Agostino-Pearson*. Para un análisis de dos grupos con distribución normal se aplicó el *test de Student* (Unpaired). Por otro lado, el análisis de más de dos grupos experimentales con distribución normal se realizó el análisis de varianza (ANOVA) y test de *Tukey* para múltiples comparaciones. Sin embargo, para datos sin distribución normal se utilizó el test de *Kruskal-Wallis* con el test de *Dunn's* para múltiples comparaciones. Los valores de  $P < 0.05$  se consideraron estadísticamente significativos.

## IV. RESULTADOS

### 4.1 Citotoxicidad de los adyuvantes en células HD-11

#### 4.1.1. Citotoxicidad de Adyuvax

Mediante el análisis de la clasificación de citotoxicidad (30), se determinó que Adyuvax a concentraciones entre 12.5 – 800  $\mu\text{g/mL}$  demostró ser “no tóxico” sobre las células HD-11 a las 24 y 48 h, alcanzando una viabilidad cercana y superior al 100% comparadas con el control negativo (CN) (Figura 1A,B). El análisis de la  $\text{IC}_{50}$  no mostró valores para las 24 y 48 h para las concentraciones evaluadas de Adyuvax.



**Figura 1. Análisis de la citotoxicidad de Adyuvax en relación al porcentaje de viabilidad celular.** Las células HD-11 se expusieron a concentraciones de Adyuvax de 12.5 – 800  $\mu\text{g/mL}$  por 24 y 48 h. El porcentaje de viabilidad celular se determinó por la fórmula:  $(\text{DO muestra}/\text{DO CN}) \times 100\%$ . DO, densidad óptica; CN, control

negativo; CP, control positivo (células tratadas con etanol al 50%). Las líneas punteadas muestran la clasificación de los niveles de toxicidad según Kong (2009). El análisis de los datos se realizó por ANOVA y test de Tukey. Los datos son de tres ensayos independientes (n=4) y se representan como el promedio  $\pm$  la desviación estándar.

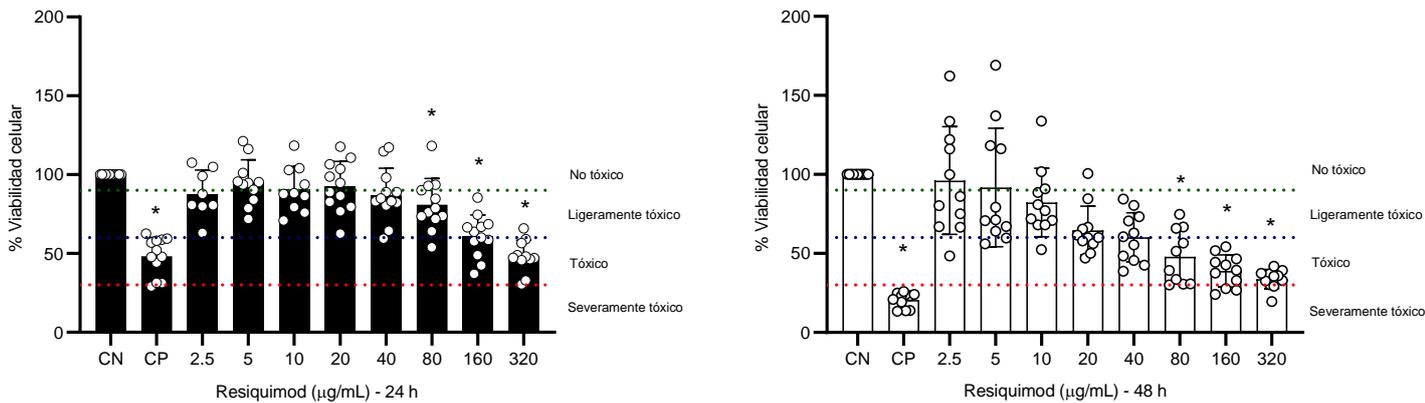
#### **4.1.2. Citotoxicidad de R-848**

El análisis de clasificación de citotoxicidad determinó que R-848 no fue tóxico a las células HD-11 a las 24 h, desde la concentración de 2.5 hasta los 40  $\mu\text{g/mL}$ , sin presentar diferencia significativa con respecto al CN (Figura 2A). Mientras, a las 48 h de exposición, R-848 no fue tóxico hasta 10  $\mu\text{g/mL}$  (Figura 2B) y a partir de esa concentración se observó una dosis respuesta, pasando de no tóxicas a ligeramente tóxicas y finalmente tóxicas a mayores concentraciones.

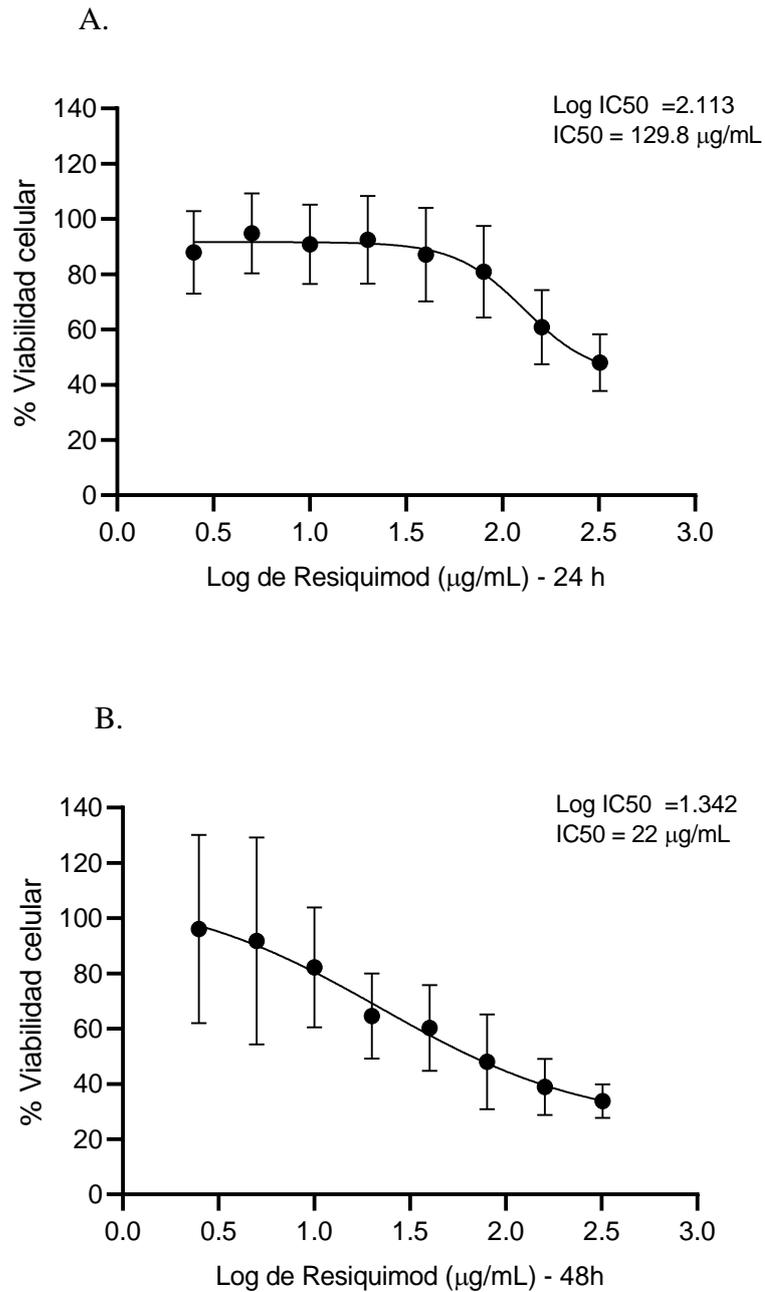
Por otro lado, el análisis de  $\text{IC}_{50}$  de R-848 dio valores de 129.8 y 22  $\mu\text{g/mL}$  a las 24 y 48 h respectivamente (Figura 3 A, B). Esas dosis determinan las concentraciones inhibitorias que causan el 50% de la citotoxicidad de las células, sin embargo, esos valores de  $\text{IC}_{50}$  se encontraron clasificados en el límite de ser ligeramente tóxicos según la clasificación de niveles de citotoxicidad. Por ello, para los ensayos de combinación de ambos adyuvantes se usaron 10 y 20  $\mu\text{g/mL}$  de R-848 porque no representan ser tóxicos hasta las 48 h.

Cabe mencionar, que otros autores usaron concentraciones menores a 50  $\mu\text{g/mL}$  de R-848 en sus estudios de citotoxicidad, y no evidenciaron afección en la viabilidad celular (Anfray, 2021; Vinod, 2019; Peine, 2014; Stathopoulos, 2012). Por otro

lado, la ficha técnica del producto y otros autores reportan una modulación de la respuesta inmune a partir de 10 µg/mL de R-848 (21,26).



**Figura 2. Análisis de citotoxicidad de R-848 en relación al porcentaje de viabilidad celular.** Las células HD-11 se expusieron a diferentes concentraciones de R-848 por 24 y 48 h. El porcentaje de viabilidad celular se determinó por la fórmula:  $(DO \text{ muestra} / DO \text{ CN}) \times 100\%$ . DO, densidad óptica; CN, control negativo; CP, control positivo (células tratadas con etanol al 50%). Las líneas punteadas muestran la clasificación de los niveles de toxicidad. El análisis de los datos se realizó por ANOVA y el test de Tukey. Los datos son representativos de tres ensayos independientes (n=9-12) y son expresados como el promedio  $\pm$  la desviación estándar \*  $p \leq 0.05$  comparado con el CN.

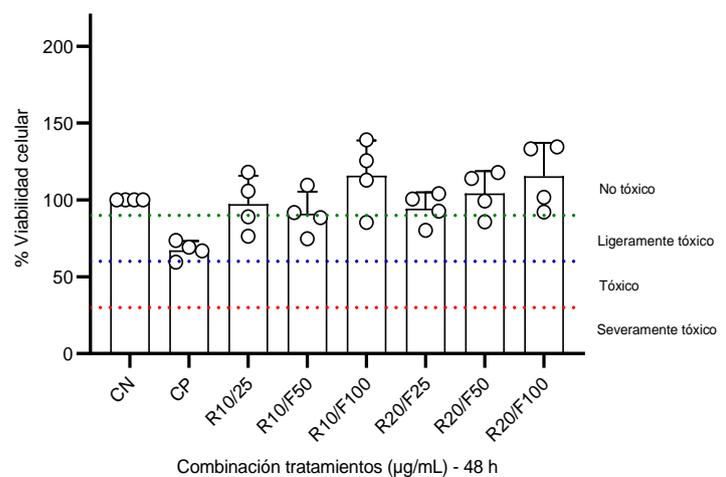
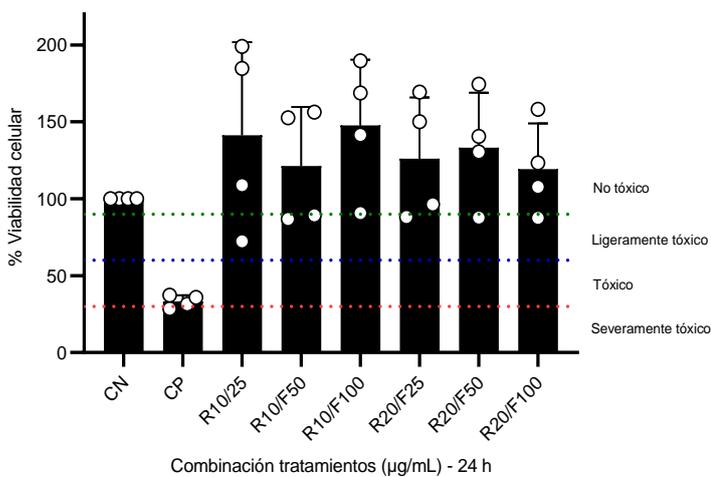


**Figura 3. Concentración inhibitoria (IC<sub>50</sub>) de R-848 a las 24 y 48 h de exposición.** Las células HD-11 se trataron con diferentes concentraciones de R-848 en un rango de 2.5 hasta 320 µg/mL por 24 h (A) y 48 h (B). Los datos se generaron usando GraphPrism software para el cálculo de IC<sub>50</sub>. Los datos son representativos

de tres ensayos independientes (n=7-12) y representan el promedio  $\pm$  la desviación estándar.

#### 4.1.3. Citotoxicidad de la combinación de R-848 y Adyuvax

Antes de evaluar el sinergismo de ambos adyuvantes en la respuesta inflamatoria de las células HD-11, se determinó la citotoxicidad de la combinación de ambos compuestos para conocer si tenían un efecto negativo sobre las células. Debido a que Adyuvax carece de tener efecto tóxico sobre las células HD-11, se seleccionaron tres concentraciones (25, 50 y 100  $\mu\text{g/mL}$ ) de Adyuvax que fueron clasificadas como “no tóxicas” y se combinaron con 10 y 20  $\mu\text{g/mL}$  de R-848 (rango no tóxico y menor del  $\text{IC}_{50}$  de 22  $\mu\text{g/mL}$ ). La combinación de ambos adyuvantes no evidenció efecto citotóxico en las células HD-11 tanto a las 24 y 48 h en todas las concentraciones evaluadas, alcanzando una viabilidad promedio al 100% (Figura 4A,B). Estos resultados sugieren que la combinación tiene un efecto positivo en la viabilidad celular.



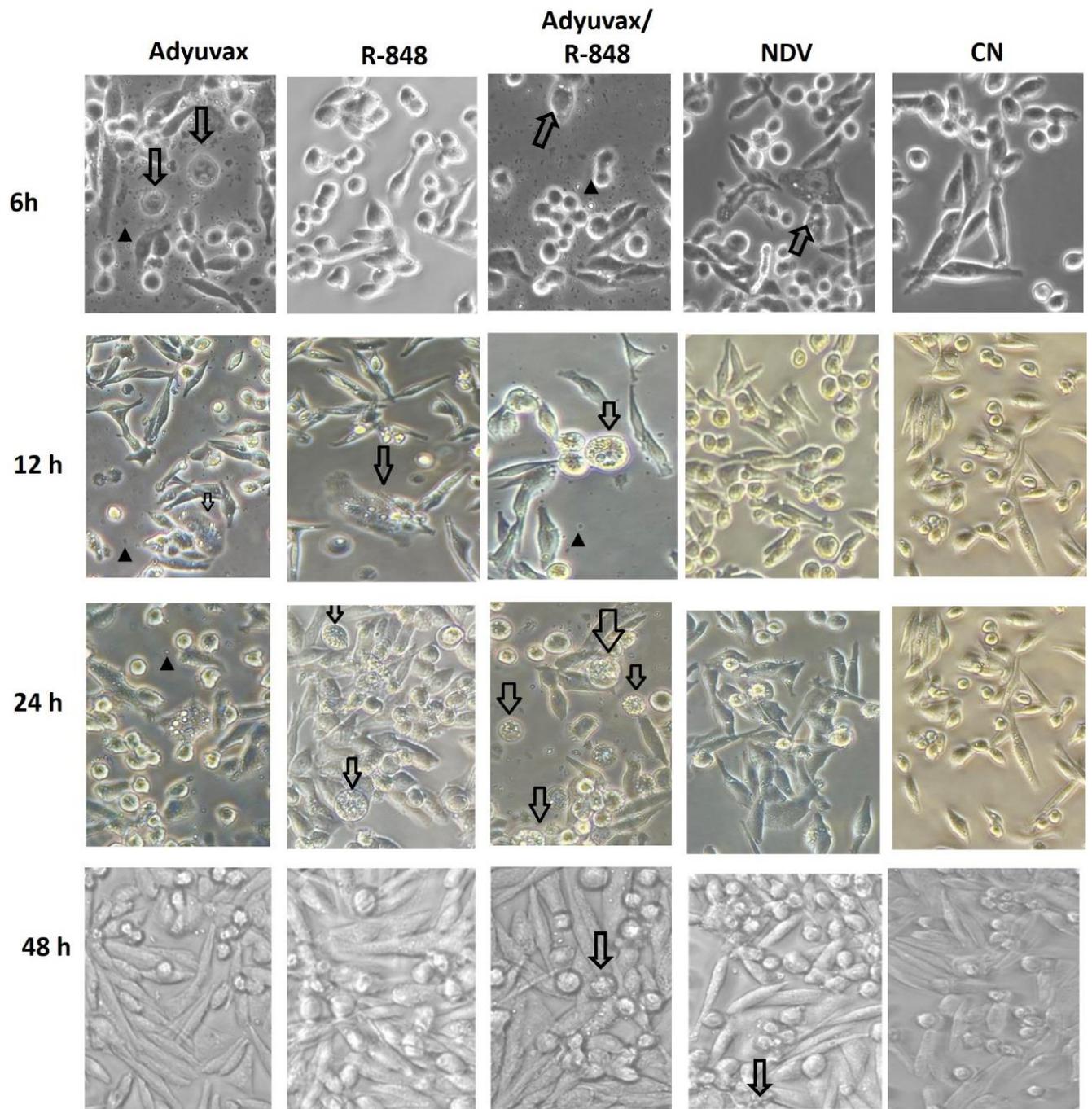
**Figura 4. Análisis de la citotoxicidad de la combinación de Adyuvax (A) y R-848 (R).** Las células HD-11 se expusieron a diferentes concentraciones de la combinación de R-848 más Adyuvax por 24 (A) y 48 h (B). El porcentaje de viabilidad celular se determinó por la fórmula:  $(DO \text{ muestra}/DO \text{ CN}) \times 100\%$ . DO, densidad óptica; CN, control negativo; CP, control positivo (células tratadas con etanol al 50%); A25, 25  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de Adyuvax; A50, 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de Adyuvax; A100, 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de Adyuvax; R10, 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de R-848; R20, 20  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de R-848. Las líneas punteadas muestran la clasificación de los niveles de toxicidad. El análisis de los datos se realizó por ANOVA y test de Tukey. Los datos corresponden a un ensayo independiente ( $n=4$ ) y es expresado como el promedio  $\pm$  la desviación estándar. \*  $p \leq 0.05$  comparado con el CN.

Paralelamente en cada ensayo de citotoxicidad individual o en la combinación de Adyuvax con R-848, se registró las fotografías de la morfología de las células HD-11 expuestas a los adyuvantes (Anexo 1, 2 y 3).

#### **4.2 Morfología de las células HD-11 infectadas con vENC**

Luego del análisis de citotoxicidad individual (Figuras 1, 2 y 3) y la combinación de ambos adyuvantes (Figura 4), se expuso a las células HD-11 infectadas con vENC con 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de Adyuvax y 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de R-848. Ambas concentraciones se encontraron en el rango no tóxico, además de ser concentraciones usadas por otros autores en ensayos de expresión génica. A manera de observación se registró fotografías representativas de las células HD-11 infectadas con vENC y tratadas

con ambos adyuvantes, observando, además de las formas típicas (huso y redondas) un mayor número de células abultadas con vacuolas en comparación al tratamiento individual de cada adyuvante y a los controles (células solo con vENC y CN) (Figura 5). Esta apariencia celular se denotó a las 6 y 12 h de exposición al menos de 1-3 células por campo y más de 5 células con esa misma apariencia a las 24 horas. A las 48 h se observó mayor confluencia celular en todos los tratamientos y escasas células abultadas o gigantes.



**Figura 5. Imágenes representativas de células HD-11 expuestas a diferentes tratamientos con Adyuvax y R-848 a diferentes tiempos de incubación. Las células HD-11 se estimularon con vENC y seguidamente se expusieron a los diferentes tratamientos con Adyuvax y R-848 y la combinación de ambos por 6, 12,**

24 y 48 h. CN, control negativo; vENC (NDV), virus de la enfermedad de Newcastle. Células HD-11 abultadas con vacuolas (Flecha negra). Micropartículas de Adyuvax (Triángulo negro). Las fotografías son representativas de un experimento independiente (n=3). Magnitud 40x.

### **4.3. Expresión de genes de citocinas inflamatorias en las células HD-11 infectadas y estimuladas con los adyuvantes.**

Previo al análisis de la expresión relativa del ARNm de citocinas inflamatorias y de iNOS, se optimizaron las condiciones de la técnica RT-PCR. El tratamiento con ADNasa para obtener un RNA puro libre de contaminantes de ADN genómico, se verificó mediante un PCR y una electroforesis que no mostraron amplificaciones de ADN genómico (Anexo 4). Seguidamente, se evaluó las condiciones de temperatura de alineamiento y desnaturación paralelamente con los tiempos de tratamiento con ADNasa obteniéndose las condiciones de ciclaje óptimas de RT-PCR (Anexo 5).

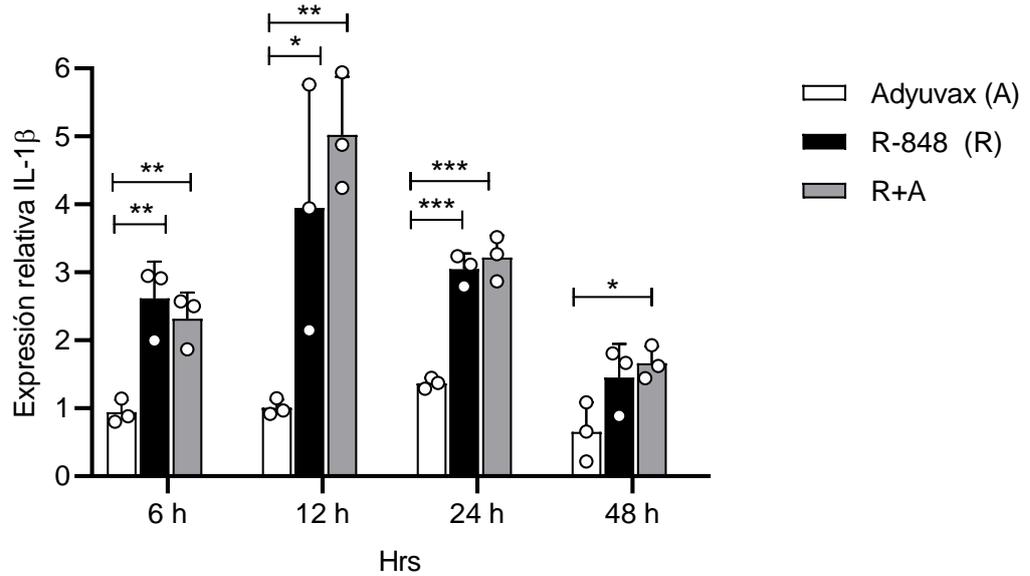
El análisis de la expresión relativa de genes mostró un aumento de IL-1 $\beta$  a intervalos de 6, 12, 24 y 48 h en células HD-11 infectadas y estimuladas con la combinación de Adyuvax más R-848, similar al tratamiento individual con R-848 pero significativamente diferente a Adyuvax. La mayor expresión de IL-1 $\beta$  se observó a las 12 h y descendió a mayor tiempo de estimulación (Figura 6A).

Mientras, la expresión de IFN- $\gamma$  mostró un aumento a las 6 h en células HD-11 infectadas y estimuladas con Adyuvax más R-848 con respecto a los demás tiempos

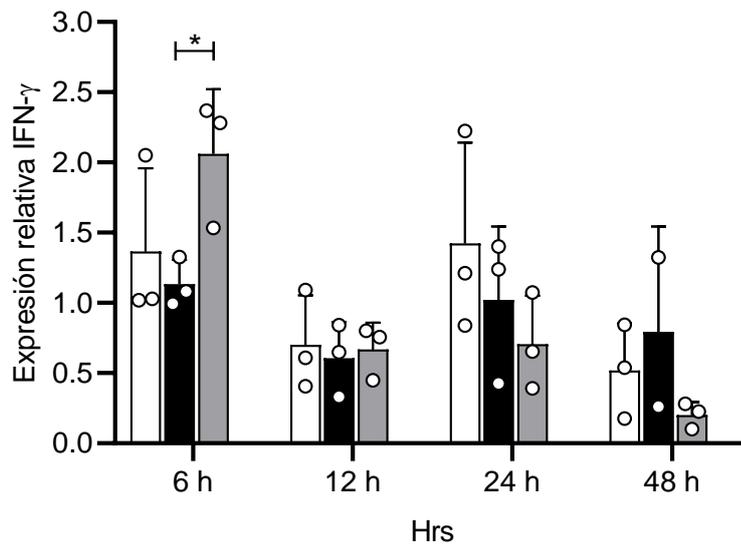
de estimulación. Asimismo, ese aumento fue diferentemente significativo a la estimulación individual de R-848 y no significativo con Adyuvax (Figura 6B).

Los resultados sugieren que la combinación de ambos adyuvantes favorece el sinergismo entre ellos y estimulan la producción de citocinas inflamatorias.

A)



B)



**Figura 6. Niveles de expresión diferencial de mRNA de IL-1β e IFN-γ en células HD11 estimuladas con vENC y tratadas con Adyuvax y R-848 por 6, 12, 24 y 48 h.**

**48 hr.** Los resultados de expresión relativa para IL-1 $\beta$  (A) e IFN- $\gamma$  (B) son presentados como *fold change* comparado a niveles en controles de células infectadas con vENC. La expresión del gen se normalizó con el gen  $\beta$ -Actina y calculado por el método  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ . Los datos corresponden a un ensayo independiente (n=3) y son expresados como el promedio  $\pm$  la desviación estándar. El *test de student* se realizó para el análisis de dos grupos independientes. Las columnas correlacionadas y marcadas con asteriscos fueron consideradas significantes \*p < 0.05; \*\*p < 0.01; \*\*\*p < 0.001.

#### **4.4. Producción de citocinas**

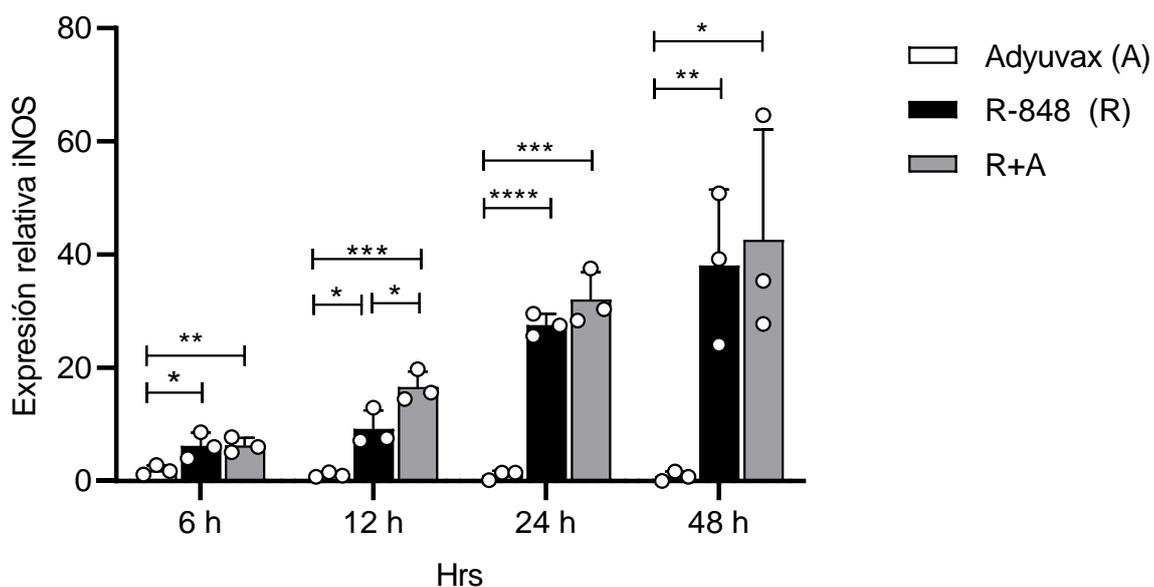
No se detectó la producción de IFN- $\gamma$  e IL-1 $\beta$  para los rangos de detección usados en este ensayo (IFN- $\gamma$ , 19-1200pg/mL; IL-1 $\beta$ , 62–4000 pg/mL) en los sobrenadantes de las células HD-11 infectadas con vENC y tratadas individualmente o en combinación de adyuvantes en todos los tiempos evaluados (6, 12, 24 y 48 h).

#### **4.5. Activación de las células HD-11 infectadas con vENC y estimuladas con los adyuvantes**

Finalmente, se evaluó la activación de las células HD-11 infectadas frente a los tratamientos de adyuvantes mediante la expresión de óxido nítrico sintetasa (iNOS) y la producción de óxido nítrico mediante el método de Griess. Se observó una creciente expresión significativa de iNOS en la combinación de Adyuvax más R-

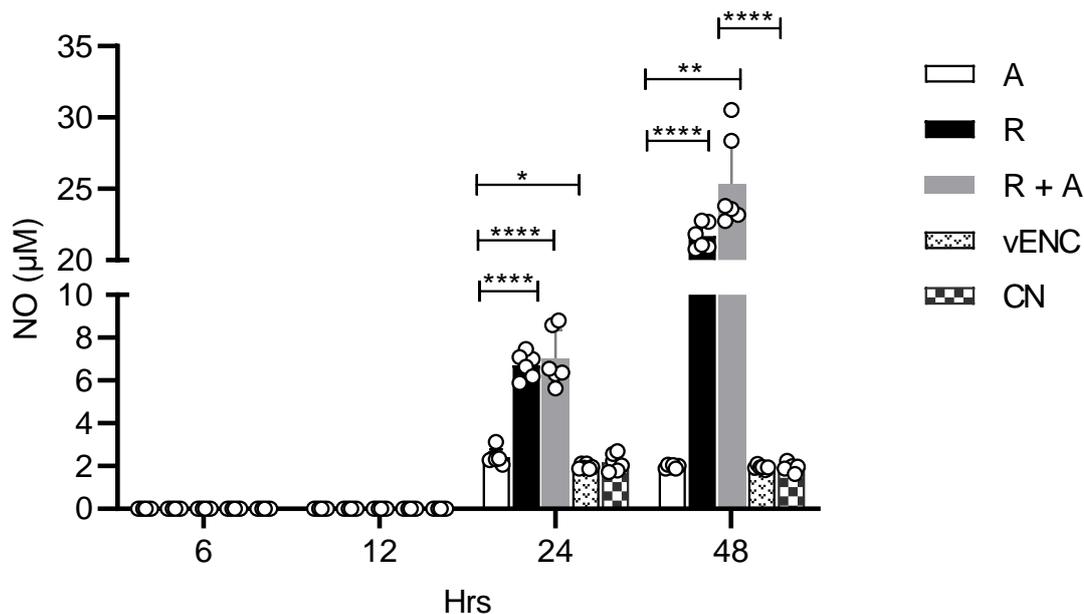
848 hasta las 48h, similar comportamiento lo hizo R-848, no obstante, estadísticamente diferente a Adyuvax (Figura 7). Sólo a las 12 h de exposición se observó un aumento significativo de iNOS en la combinación de Adyuvax más R-848 con respecto a la estimulación de cada adyuvante.

Mediante el método de *Griess* no se detectó la producción de óxido nítrico a las 6 y 12 h de exposición con los diferentes tratamientos. Sin embargo, a las 24 h y 48 h se detectó mayor producción de óxido nítrico en los grupos estimulados con Adyuvax más R-848 y con R-848 individualmente cuando comparados a los otros grupos (Adyuvax, control negativo, vENC). A las 48 horas, la combinación de Adyuvax más R-848 produjeron mayor óxido nítrico que a las 24h y estadísticamente significativo con respecto a R-848, Adyuvax, vENC y CN (Figura 8). La producción de óxido nítrico por las células HD-11 estimuladas con vENC más la combinación con los adyuvantes acompaña a los resultados de expresión génica de iNOS.



**Figura 7. Niveles de expresión diferencial de mRNA iNOS en células HD11 estimuladas con vENCy tratadas con Adyuvax y R-848 por 6, 12, 24 y 48 hr.**

Los resultados de expresión relativa para iNOS son presentados como *fold change* comparado a niveles en controles de células infectadas con vENC. La expresión del gen se normalizó con el gen  $\beta$ -Actina y calculado por el método  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ . Los datos corresponden a un ensayo independiente (n=3) y son expresados como el promedio  $\pm$  la desviación estándar. El *test de student* se realizó para el análisis de dos grupos independientes. Las columnas correlacionadas y marcadas con asteriscos fueron consideradas significantes \*p < 0.05; \*\*p < 0.01; \*\*\*p < 0.001.



**Figura 8. Evaluación de la producción de óxido nítrico (NO) en sobrenadante de células HD11 estimuladas con vENC, Adyuvax (A), R-848(R) y A + R a diferentes tiempos de exposición.** vENC, virus de la enfermedad de Newcastle; ND, no detectado. Los datos son representativos de dos experimentos independientes (n=6) por duplicado y son expresados como el promedio  $\pm$  desviación estándar. El test de student se realizó para el análisis de dos grupos independientes. Las columnas correlacionadas y marcadas con asteriscos fueron consideradas significantes \* $p < 0.05$ \*; \*\* $p < 0.01$ ; \*\*\* $p < 0.001$ .

## V. DISCUSION

La efectividad de las vacunas inactivadas contra vENC presentan una robusta respuesta inmune humoral pero una débil respuesta celular, por lo que es necesario explorar nuevas estrategias en la formulación de los adyuvantes para potenciar su respuesta inmune (8). Los adyuvantes a base de sales de aluminio y fosfatos de calcio inducen una robusta respuesta humoral generando altos títulos de anticuerpos (14), mientras que los adyuvantes agonistas de TLR-7/8 como R-848 tiene un efecto inmunomodulatorio e inducen una respuesta inmune celular (18,26). Estudios han mostrado que la coadministración de R-848 con vacunas inactivadas de vENC mejora la respuesta inmune humoral y celular en pollos (8,26). Por otro lado, la formulación de R-848 con sales de hidróxido de aluminio en vacunas contra la fiebre aftosa potencia la respuesta inmune humoral y celular (21). Debido a que la combinación de adyuvantes en la formulación de vacunas potencia la respuesta inmune celular, el objetivo del presente estudio fue evaluar el efecto de Adyuvax y R-848 en la expresión y producción de citocinas en macrófagos de pollos estimulados con vENC.

Se evaluó la citotoxicidad de ambos adyuvantes sobre las células de macrófagos de pollo HD-11, que constituyen un modelo *in vitro* para explorar las propiedades inmunoactivantes o inmunomodulatorias en estudios de vacunas (26,36). Adyuvax no causó toxicidad en los macrófagos, por el contrario, mostró aunque sin diferencia estadísticamente significativa una viabilidad cercana y superior al 100% tanto a las 24 y 48 h de exposición. Similares resultados de viabilidad se observaron en otros estudios, como el de Nies y colaboradores donde reportan que células de

macrófagos humanos (THP-1) expuestos a adyuvantes de hidróxido de aluminio y magnesio (10-100  $\mu\text{g/mL}$ ) presentaron una viabilidad superior al 100% a las 24 h de exposición (37). Otro estudio reportó que células Vero expuestas con fosfatos de calcio al 0.125% por 48 h presentaron una viabilidad de más del 95% (38).

Los métodos utilizados para medir la viabilidad o citotoxicidad celular se basan en el aprovechamiento del metabolismo de las células vivas quienes son capaces bio-reducir sustancias químicas como el MTS usado en este estudio, lo cual es una evidencia contundente de que la célula se encuentra viva, ya que bajo una condición de muerte celular no se evidenciaría esta reacción colorimétrica.

Adicionalmente estos métodos podrían evaluar el proceso de proliferación celular debido a que un mayor número de células a las sembradas se va a traducir en una mayor señal colorimétrica (absorbancia o densidad óptica) que incluso puede ser mayor a la del control negativo (donde se asume que hay 100% de viabilidad). Además, puede ocurrir que una línea celular como la usada en este estudio puede iniciar un proceso de proliferación espontáneo o inducido por las concentraciones de los productos que no son citotóxicos para las células. Es posible entonces tener viabilidades mayores al 100% teniendo en cuenta que la absorbancia del Control Negativo es igual al 100% y las absorbancias de las muestras problema (concentraciones del producto) pueden ser superiores al CN; sin embargo, el objetivo de este estudio no es evaluar la proliferación celular sino la viabilidad que en este caso se expresa de manera porcentual y en algunos casos superior al 100%. Al respecto Wang y colaboradores (39), muestran resultados de experimentos donde evalúan con MTS la viabilidad celular y se muestran que debido a los procesos de proliferación se pueden observar porcentajes de viabilidad superior al 100%.

La composición de Adyuvax contiene fosfatos de calcio en mayor proporción, componente natural del cuerpo humano, inorgánico y biodegradable, además de, sales de aluminio y magnesio en menor cantidad (10,23,41). Ello podría explicar también porque Adyuvax no mostró resultados tóxicos a las concentraciones evaluadas. Además, estos tipos de adyuvantes son reconocidos como agentes de liberación, es decir ayudan a la preservación del antígeno vacunal y una liberación lenta para la protección prolongada en el animal (14), cumpliendo los principales modos de acción en la formulación de una vacuna (11).

Por otro lado, R-848 según su IC50 causó toxicidad a las células HD-11 a partir de concentraciones mayores de 22  $\mu\text{g/mL}$  a las 48 horas respectivamente. Por ello se seleccionó las concentraciones de 10 y 20  $\mu\text{g/mL}$  de R-848, y fueron combinadas con 25, 50 y 100  $\mu\text{g/mL}$  de Adyuvax para exponer en células HD-11, en donde se evidenció que no hubo un efecto negativo sobre las células HD-11, más bien favoreció la viabilidad celular comparada a los grupos tratados individualmente. Debido a ello, en el estudio se optó por usar 50  $\mu\text{g/mL}$  de Adyuvax y 10  $\mu\text{g/mL}$  de R-848 para los subsecuentes ensayos debido a no ser tóxicos. Además, que la concentración de 10  $\mu\text{g/mL}$  de R-848, ha sido utilizada en combinación con vacunas inactivadas de vENCen ensayos de fagocitosis, producción de óxido nítrico en células HD-11 (26); y en esplenocitos de ratones *naive* para evaluar la expresión de citocinas proinflamatorias (21). Asimismo, la ficha técnica del producto y otros autores reportan una modulación de la respuesta inmune a partir de 10  $\mu\text{g/mL}$  de R-848 (21,26). Por su parte, un adyuvante similar al Adyuvax fue estudiado a la concentración de 50  $\mu\text{g/mL}$  (37).

Cabe resaltar que la morfología de las células HD-11 expuestas tanto a R-848 y Adyuvax presentaron formas típicas ovoides y alargadas en forma de huso (42) similar al control negativo. Adicionalmente, se observaron células con vacuolas notorias (26), abultadas (activadas) (43), algunas con alteraciones en la membrana celular, fragmentación del núcleo similar a un proceso de apoptosis (44) y otras con formación de vesículas en la membrana plasmática (43). Esas características se observaron tanto cuando se trataron individualmente o en la combinación de ambas. A diferencia de R-848, se observó micropartículas propias del Adyuvax inmersas en la monocapa celular, y fue más notoria en mayores concentraciones. Es posible que los cristales formen agregados y sean fagocitados por los macrófagos presentando la morfología tipo apoptótica, lo que conduce a estimular una respuesta inmune (45).

Previo al análisis de expresión génica, se optimizaron las condiciones de RT-PCR a base de un estudio previamente reportado (33). El empleo de ADNasa en el ARN y las condiciones de reacción en los pasos de desnaturalización 95<sup>0</sup>C/5 seg a 95<sup>0</sup>C/15 seg y alineamiento 60<sup>0</sup>C/15 seg a 60<sup>0</sup>C/25 seg de acuerdo a las condiciones usadas por otros autores (17,46) mejoró la especificidad de la curva de *melting* a un solo pico. Con esas condiciones, el análisis de expresión de genes demostró que R-848 y la coadministración con Adyuvax estimularon la expresión de IL-1 $\beta$  en células HD-11 infectadas comparadas a la estimulación con Adyuvax. IL-1 $\beta$ , es una citocina antiviral que actúa como un mediador de la respuesta proinflamatoria (47), es producida por monocitos, macrófagos y células dendríticas. Además, media la respuesta inmune innata y adaptativa con énfasis en la activación de células presentadoras de antígeno e inducción en la respuesta mediada por células T, por lo

que contribuye al modo de acción de las vacunas con adyuvantes (48).

R-848, agonista de TLR7, es un potente inductor de citocinas inflamatorias y su efecto ha sido investigado en estudios *in vivo* e *in vitro* de enfermedades aviares (8,21,26), además en ratones y en humanos (49–52). La estimulación de IL-1 $\beta$  sólo por R-848 se compara con el estudio de Gupta y col, que reportan el aumento de la expresión de la citocina en células DF-1 infectadas con vENC a las 9 y 18 h de estimulación (18). Mientras, Sachan y col reportaron la sobre regulación de IL-1 $\beta$  en esplenocitos de pollos estimulados con R-848 y una respuesta celular (CD4+ y CD8+) en PBMC de pollos que recibieron R-848 más vENC inactivado (8). Estos reportes sustentan nuestros hallazgos con respecto a la estimulación de R-848 como potente inductor de IL-1 $\beta$ .

No obstante, la combinación de R-848 con Adyuvax estimuló en las células HD-11 infectadas un similar y ligero aumento de la expresión de IL-1 $\beta$  con respecto a R-848 pero significativamente diferente a Adyuvax. El efecto de R-848 con la combinación con adyuvantes de sales aluminio y/o fosfatos de calcio han sido poco estudiados. Sin embargo, el efecto sinérgico de R-848 regulando la expresión de IL-1 $\beta$  con otros agentes inmunoestimulantes se ha explorado en PBMC de aves expuestos a R-848 más LPS (19,50). Similar estudio de Philbin y col, demuestran la sobre regulación de IL-1 $\beta$  en células HD-11 estimuladas con R-848 más loxoribina (45).

Por otro lado, la expresión de IL-1 $\beta$  por parte de Adyuvax, puede deberse a que los adyuvantes a base de sales de aluminio cumplen la acción de captación de antígeno, señal de daño por parte del Al; y estimulan la activación de NLRP3 en macrófagos

(22,36). Además, la reducida expresión de IL-1 $\beta$ , puede darse por su composición ya que Adyuvax contiene menos concentración de sales aluminio, y mayor concentración de fosfato de calcio, que cumplen una función protectora del antígeno vacunal contra degradaciones proteolíticas o enzimáticas naturales, y propiamente por ser un transportador del antígeno (10). Por su naturaleza, adyuvantes de este tipo ejercen una robusta respuesta inmune humoral más que celular como lo descrito por los adyuvantes a base de aluminio (48). Por consiguiente, los resultados muestran, que aunque no se detectó la producción de IL-1 $\beta$  mediante ELISA, su expresión en este estudio se evidencia tras la estimulación individual de R-848 o la co-estimulación con Adyuvax, sugiriendo que el sinergismo de ambos adyuvantes inducen la expresión de IL-1 $\beta$ .

Igualmente, se observa que la combinación de R-848 con Adyuvax, a las 6 h de exposición estimuló la inducción IFN- $\gamma$  diferente a la estimulación individual a R-848 y estadísticamente no significativa con Adyuvax. El interferón tipo 2, IFN- $\gamma$ , es una citocina pleiotrópica con actividad antiviral y con efecto inmunomodulatorio en infecciones virales (53). Estudios previos reportaron que R-848 estimuló la sobre regulación de IFN- $\gamma$  en células DF-1 infectadas con vENC a las 27 h de estimulación (18). Mientras, Sachan y col, encontraron una inducción de IFN- $\gamma$  en esplenocitos de pollos tratados con R-848 (8). Un estudio mostró el efecto inmunomodulador de R-848 junto con LPS en PBMC de aves estimulando la producción de IFN- $\gamma$  después de 24 h de estimulación. Por su parte, Zhou y col, mostraron la inducción de IFN- $\gamma$  en esplenocitos de ratones estimulados R-848 en combinación con hidróxido de aluminio, Poly (I:C) y antígeno de fiebre aftosa (21). Estas investigaciones refuerzan los resultados del presente estudio, mostrando una

vez más que la combinación de R-848 y Adyuvax sinérgicamente regula la expresión de una citocina inflamatoria, IFN- $\gamma$ , en las células HD-11 infectadas.

No obstante, IFN- $\gamma$  al igual que IL-1 $\beta$  no se detectaron mediante ELISA. Esos hallazgos, sugieren varias hipótesis, una de ellas es que la síntesis de citocinas tiene un tiempo de vida corta y que solo es detectada en el espacio intracelular a nivel de expresión génica que es más sensible. Al respecto son pocos los estudios que intentaron correlacionar la expresión relativa de ARNm y la producción de proteínas, pues la tecnología permite la evaluación de patrones de expresión génica de una manera que actualmente no es posible con las proteínas debido a la complejidad del proteoma (54). Otra hipótesis es que no fue posible detectar las proteínas por no encontrarse en el rango de detección del kit comercial de ELISA usado en el estudio.

Por otro lado, la expresión de iNOS y producción de óxido nítrico en las células HD-11 infectadas y estimuladas con la combinación de R-848 con Adyuvax, o sólo con R-848 se evidenciaron de manera ascendente hasta las 48h. Esos resultados son similares a otros reportes en células HD-11 o PBMC de aves estimuladas con R-848 más LPS, donde la producción de óxido nítrico, al igual al presente trabajo, alcanzó niveles altos de expresión a las 24 y 48 h (19,26). La producción del óxido nítrico (NO) es una herramienta de defensa innata del huésped contra agentes infecciosos invasores y junto con iNOS son considerados biomarcadores de activación de macrófagos. La activación de las células HD-11 también se vio reflejado en la morfología de las células activadas con presencia de vacuolas (26) y células abultadas (43) luego de la estimulación de vENC más la combinación de los adyuvantes. Por otra parte, la sobre producción de óxido nítrico puede regular

negativamente el inflamasoma y la secreción de IL-1 $\beta$  (55). Bajo esa premisa surge la hipótesis de que la ausencia de producción de óxido nítrico a 6 y 12 h permitió la elevada expresión de IL-1 $\beta$  a las 12h, mientras que a mayor tiempo de estimulación la elevada producción de óxido nítrico regula negativamente la expresión de la citocina.

El futuro del desarrollo de adyuvantes vacunales consiste en la combinación de dos o más de ellos, principalmente en los agonistas de PRR y adyuvantes de partículas, lo cual podría repercutir en la mejora de la calidad y cantidad de la respuesta inmune contra los antígenos vacunales (11). Este estudio explorativo muestra que la combinación de R-848 más Adyuvax, ambos con propiedades inmunomodulatorias, tienden a activar células inmunes innatas como los macrófagos capaces de expresar citocinas inflamatorias, útiles para la formulación de una vacuna inactivada que conlleve reforzar una respuesta inmune celular.

## **VI. CONCLUSIONES**

- Adyuvax hasta la concentración de 800  $\mu\text{g/mL}$  no resulta tener un efecto citotóxico para las células HD-11.
- R-848 demostró tener un efecto citotóxico a medida que se incrementaba la concentración de manera dosis dependiente, siendo su IC50 de 129  $\mu\text{g/mL}$  y 22  $\mu\text{g/mL}$  a las 23 y 48 h respectivamente.
- La combinación de Adyuvax y R-848 a las concentraciones evaluadas no mostraron efecto citotóxico en las células HD-11.

- La combinación de Adyuvax y R-848 aumentan la expresión relativa de genes en los macrófagos de pollo, sin embargo la combinación no expresa una diferencia estadísticamente significativa en comparación al grupo tratado solo con R-848 excepto en la expresión de iNOS a las 12 horas e IFN- $\gamma$  a las 6 horas. Sin embargo, no se sostiene en el tiempo. Se atribuye este efecto a la acción inmunomoduladora de R-848.
- La combinación de Adyuvax y R-848 como el grupo tratado solo con R-848 evidenciaron la activación de las células HD-11 a través de la producción de óxido nítrico.

## VII. RECOMENDACIONES

- Se recomienda continuar la exploración del estudio en células mononucleares de sangre periférica de pollos estimulados con los mismos tratamientos.
- Se recomienda continuar la línea de investigación, realizando un estudio *in vivo* en pollos de engorde de 01 día de edad con la finalidad de evaluar la producción de anticuerpos.
- Se recomienda ampliar la evaluación de citocinas inflamatorias, tanto en la expresión relativa de ARNm como la proteína soluble, en el afán de obtener una caracterización del perfil de citocinas tras el uso de estos adyuvantes.
- Se recomienda realizar estudios de otras vías de activación por ejemplo la vía de activación de los TLR-7.
- Se recomienda incluir un estímulo con LPS o antígeno viral que estimule las variables estudiadas.

## VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Shahid N, Samiullah TR, Shakoor S, Latif A, Yasmeen A, Azam S, et al. Early Stage Development of a Newcastle Disease Vaccine Candidate in Corn. *Front Vet Sci.* 2020;7(August):1–12.
2. Rasool MH, Mehmood A, Saqalein M, Nisar MA, Almatroudi A, Khurshid M. Development, Biological Characterization, and Immunological Evaluation of Virosome Vaccine against Newcastle Disease in Pakistan. *Biomed Res Int.* 2021;2021.
3. Guo L xing, Nie F rong, Huang A qun, Wang R ning, Li M yun, Deng H yu, et al. Transcriptomic analysis of chicken immune response to infection of different doses of Newcastle disease vaccine. *Gene* [Internet]. 2021;766(August 2020):145077. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.gene.2020.145077>
4. Ike AC, Ononugbo CM, Obi OJ, Onu CJ, Olovo C V., Muo SO, et al. Towards improved use of vaccination in the control of infectious bronchitis and newcastle disease in poultry: Understanding the immunological mechanisms. *Vaccines.* 2021;9(1):1–25.
5. OIE Terrestrial Manual. Newcastle disease (infection with Newcastle Disease Virus). 2018.
6. Palya V, Tatár-Kis T, Arafa ASA, Felföldi B, Mató T, Setta A. Efficacy of a turkey herpesvirus vectored newcastle disease vaccine against genotype vii.1.1 virus: Challenge route affects shedding pattern. *Vaccines.* 2021;9(1):1–12.

7. Paneque-Quevedo AA. Compuestos inorgánicos como adyuvantes de vacunas. *Biotechnol Apl.* 2013;30(4):243–56.
8. Sachan S, Ramakrishnan S, Annamalai A, Sharma BK, Malik H, Saravanan BC, et al. Adjuvant potential of resiquimod with inactivated Newcastle disease vaccine and its mechanism of action in chicken. *Vaccine.* 2015 Aug 26;33(36):4526–32.
9. Dimitrov KM, Afonso CL, Yu Q, Miller PJ. Newcastle disease vaccines—A solved problem or a continuous challenge? *Vet Microbiol* [Internet]. 2017;206:126–36. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetmic.2016.12.019>
10. Sun Z, Li W, Lenzo JC, Holden JA, McCullough MJ, O'Connor AJ, et al. The Potential of Calcium Phosphate Nanoparticles as Adjuvants and Vaccine Delivery Vehicles. *Front Mater.* 2021;8(December):1–17.
11. Awate S, Babiuk LA, Mutwiri G. Mechanisms of action of adjuvants. *Front Immunol.* 2013;4(MAY):1–10.
12. Patinote C, Bou N, Moarbess G, Cirnati N. Since January 2020 Elsevier has created a COVID-19 resource centre with free information in English and Mandarin on the novel coronavirus COVID- 19 . The COVID-19 resource centre is hosted on Elsevier Connect , the company ' s public news and information. 2020;(January).
13. Bhadouriya S, Sharma BK, Kakker NK, Chhabra R. Toll like receptors and cytokines as immunostimulatory adjuvants in poultry vaccines: current status and future trends. *Worlds Poult Sci J.* 2019;75(3):417–28.

14. Burakova Y, Madera R, McVey S, Schlup JR, Shi J. Adjuvants for Animal Vaccines. *Viral Immunol.* 2018;31(1):11–22.
15. Gupta SK, Deb R, Dey S, Chellappa MM. Toll-like receptor-based adjuvants: Enhancing the immune response to vaccines against infectious diseases of chicken. *Expert Rev Vaccines.* 2014;13(7):909–25.
16. St. Paul M, Brisbin JT, Abdul-Careem MF, Sharif S. Immunostimulatory properties of Toll-like receptor ligands in chickens. *Vet Immunol Immunopathol [Internet].* 2013;152(3–4):191–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetimm.2012.10.013>
17. Senapathi UDS, Aboelkhair M, Puro K, Ali M, Amarasinghe A, Sarjoon Abdul-Cader M, et al. In ovo delivered toll-like receptor 7 ligand, resiquimod enhances host responses against infectious bronchitis corona virus (IBV) infection. *Vaccines.* 2020;8(2).
18. Gupta A, Deka P, Kumar S. Resiquimod inhibits Newcastle disease virus replication by modulating host cytokines: An understanding towards its possible therapeutics. *Cytokine [Internet].* 2020;125(July 2019):154811. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2019.154811>
19. Ramakrishnan S, Annamalai A, Sachan S, Kumar A, Sharma BK, Govindaraj E, et al. Synergy of lipopolysaccharide and resiquimod on type I interferon, pro-inflammatory cytokine, Th1 and Th2 response in chicken peripheral blood mononuclear cells. *Mol Immunol [Internet].* 2015;64(1):177–82. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.molimm.2014.11.013>

20. Schön MP, Schön M. TLR7 and TLR8 as targets in cancer therapy. *Oncogene*. 2008;27(2):190–9.
21. Zhou CX, Li D, Chen YL, Lu ZJ, Sun P, Cao YM, et al. Resiquimod and polyinosinic-polycytidylic acid formulation with aluminum hydroxide as an adjuvant for foot-and-mouth disease vaccine. *BMC Vet Res*. 2014;10.
22. Eisenbarth SC, Colegio OR, O’Connor W, Sutterwala FS, Flavell RA. Crucial role for the Nalp3 inflammasome in the immunostimulatory properties of aluminium adjuvants. *Nature*. 2008;453(7198).
23. Koppad S, Raj GD, Gopinath VP, Kirubaharan JJ, Thangavelu A, Thiagarajan V. Calcium phosphate coupled Newcastle disease vaccine elicits humoral and cell mediated immune responses in chickens. *Res Vet Sci [Internet]*. 2011;91(3):384–90. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.rvsc.2010.09.008>
24. Fawzy M, Ali RR, Elfeil WK, Saleh AA, El-Tarabilli MMA. Efficacy of inactivated velogenic newcastle disease virus genotype vii vaccine in broiler chickens. *Vet Res Forum*. 2020;11(2):113–20.
25. Hongzhuan Z, Ying T, Xia S, Jinsong G, Zhenhua Z, Beiyu J, et al. Preparation of the inactivated Newcastle disease vaccine by plasma activated water and evaluation of its protection efficacy. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2020;104(1):107–17.
26. van den Biggelaar RHGA, van Eden W, Rutten VPMG, Jansen CA. Nitric oxide production and fc receptor-mediated phagocytosis as functional readouts of macrophage activity upon stimulation with inactivated poultry

- vaccines in vitro. *Vaccines*. 2020;8(2):1–16.
27. Zhang P, Ding Z, Liu X, Chen Y, Li J, Tao Z, et al. Enhanced replication of virulent Newcastle disease virus in chicken macrophages is due to polarized activation of cells by inhibition of TLR7. *Front Immunol*. 2018;9(APR).
  28. Jang J, Hong SH, Kim IH. Validation of a real-time RT-PCR method to quantify newcastle disease virus (NDV) titer and comparison with other quantifiable methods. *J Microbiol Biotechnol*. 2011;21(1):100–8.
  29. Levano-Garcia J, Huberman Y, Caballero-Garcia M, Mendoza-Espinoza A. SYBR Green based real time RT-PCR method for specific detection and quantification of Newcastle Disease Virus. *Manuscr Prep*. 2022;
  30. Kong N, Jiang T, Zhou Z, Fu J. Cytotoxicity of polymerized resin cements on human dental pulp cells in vitro. *Dent Mater*. 2009;25(11):1371–5.
  31. Sjögren G, Sletten G. Cytotoxicity of dental alloys, metals, and ceramics assessed by Millipore filter, agar overlay, and MTT tests. *J Prosthet Dent*. 2000;
  32. Zhang B, Metharom P, Jullie H, Ellem KAO, Cleghorn G, West MJ, et al. The significance of controlled conditions in lentiviral vector titration and in the use of multiplicity of infection (MOI) for predicting gene transfer events. *Genet Vaccines Ther*. 2004;2:1–10.
  33. Nang N, Lee J, Song B, Kang Y, Kim H, Seo S. Induction of inflammatory cytokines and toll-like receptors in chickens infected with avian H9N2

- influenza virus. *Vet Res* [Internet]. 2011;42(1):64. Available from:  
<http://www.veterinaryresearch.org/content/42/1/64>
34. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT method. *Methods*. 2001;25(4).
  35. Ariaans MP, Matthijs MGR, van Haarlem D, van de Haar P, van Eck JHH, Hensen EJ, et al. The role of phagocytic cells in enhanced susceptibility of broilers to colibacillosis after Infectious Bronchitis Virus infection. *Vet Immunol Immunopathol*. 2008 Jun;123(3–4):240–50.
  36. Han B, García-Mendoza D, van den Berg H, van den Brink NW. Modulatory Effects of Pb<sup>2+</sup> on Virally Challenged Chicken Macrophage (HD-11) and B-Lymphocyte (DT40) Cell Lines In Vitro. *Environ Toxicol Chem* [Internet]. 2020;39(5):1060–70. Available from:  
<http://dx.doi.org/10.1002/etc.4702>
  37. Nies I, Hidalgo K, Bondy SC, Campbell A. Since January 2020 Elsevier has created a COVID-19 resource centre with free information in English and Mandarin on the novel coronavirus COVID- 19 . The COVID-19 resource centre is hosted on Elsevier Connect , the company ’ s public news and information. 2020;(January).
  38. El-Bagoury G, EL-Nahas E, Mostafa A, Saafan M. Impact of Chitosan and Calcium phosphate nanoparticles upon VERO cells and their adapted PPRV. *Benha Vet Med J*. 2018;35(2):576–611.
  39. Wang Y, Nguyen DT, Yang G, Anesi J, Kelly J, Chai Z, et al. A Modified MTS Proliferation Assay for Suspended Cells to Avoid the Interference by

- Hydralazine and  $\beta$ -Mercaptoethanol. *Assay Drug Dev Technol.* 2021;19(3):184–90.
40. Wang ZB, Xu J. Better adjuvants for better vaccines: Progress in adjuvant delivery systems, modifications, and adjuvant–antigen codelivery. *Vaccines.* 2020;8(1).
  41. Eliaz N, Metoki N. Calcium phosphate bioceramics: A review of their history, structure, properties, coating technologies and biomedical applications. *Materials (Basel).* 2017;10(4).
  42. Wisner ALS, Potter AA, Köster W. Effect of the salmonella pathogenicity island 2 type III secretion system on Salmonella survival in activated chicken macrophage-like HD11 cells. *PLoS One.* 2011;6(12).
  43. Pertile ATL, Karaca K, Sharma JM, Walser MM. An Antiviral Effect of Nitric Oxide : Inhibition of Reovirus Replication Published by : American Association of Avian Pathologists Stable URL : <http://www.jstor.org/stable/1592230> Linked references are available on JSTOR for this article : An Antiviral Ef. 2016;40(2):342–8.
  44. Han X, Tian Y, Guan R, Gao W, Yang X, Zhou L, et al. Bronchitis virus infection induces apoptosis during replication in chicken macrophage HD11 cells. *Viruses.* 2017;9(8).
  45. Eidi H, David MO, Crépeaux G, Henry L, Joshi V, Berger MH, et al. Fluorescent nanodiamonds as a relevant tag for the assessment of alum adjuvant particle biodisposition. *BMC Med [Internet].* 2015;13(1):1–13. Available from: <http://dx.doi.org/10.1186/s12916-015-0388-2>

46. Rasoli M, Yeap SK, Tan SW, Roohani K, Kristeen-Teo YW, Alitheen NB, et al. Differential modulation of immune response and cytokine profiles in the bursae and spleen of chickens infected with very virulent infectious bursal disease virus. *BMC Vet Res*. 2015;11(1):1–14.
47. Abdul-Cader MS, De Silva Senapathi U, Nagy E, Sharif S, Abdul-Careem MF. Antiviral response elicited against avian influenza virus infection following activation of toll-like receptor (TLR)7 signaling pathway is attributable to interleukin (IL)-1 $\beta$  production. *BMC Res Notes* [Internet]. 2018;11(1):1–7. Available from: <https://doi.org/10.1186/s13104-018-3975-4>
48. Muñoz-Wolf N, Lavelle EC. A Guide to IL-1 family cytokines in adjuvanticity. *FEBS J*. 2018;285(13):2377–401.
49. Vinod N, Hwang D, Azam SH, Van Swearingen AED, Wayne E, Fussell SC, et al. High-capacity poly(2-oxazoline) formulation of TLR 7/8 agonist extends survival in a chemo-insensitive, metastatic model of lung adenocarcinoma. *Sci Adv*. 2020;6(25).
50. Anfray C, Mainini F, Digifico E, Maeda A, Sironi M, Erreni M, et al. Intratumoral combination therapy with poly(I:C) and resiquimod synergistically triggers tumor-associated macrophages for effective systemic antitumoral immunity. *J Immunother Cancer*. 2021;9(9):1–17.
51. Manome Y, Suzuki D, Mochizuki A, Saito E, Sasa K, Yoshimura K, et al. The inhibition of malignant melanoma cell invasion of bone by the TLR7 agonist R848 is dependent upon pro-inflammatory cytokines produced by

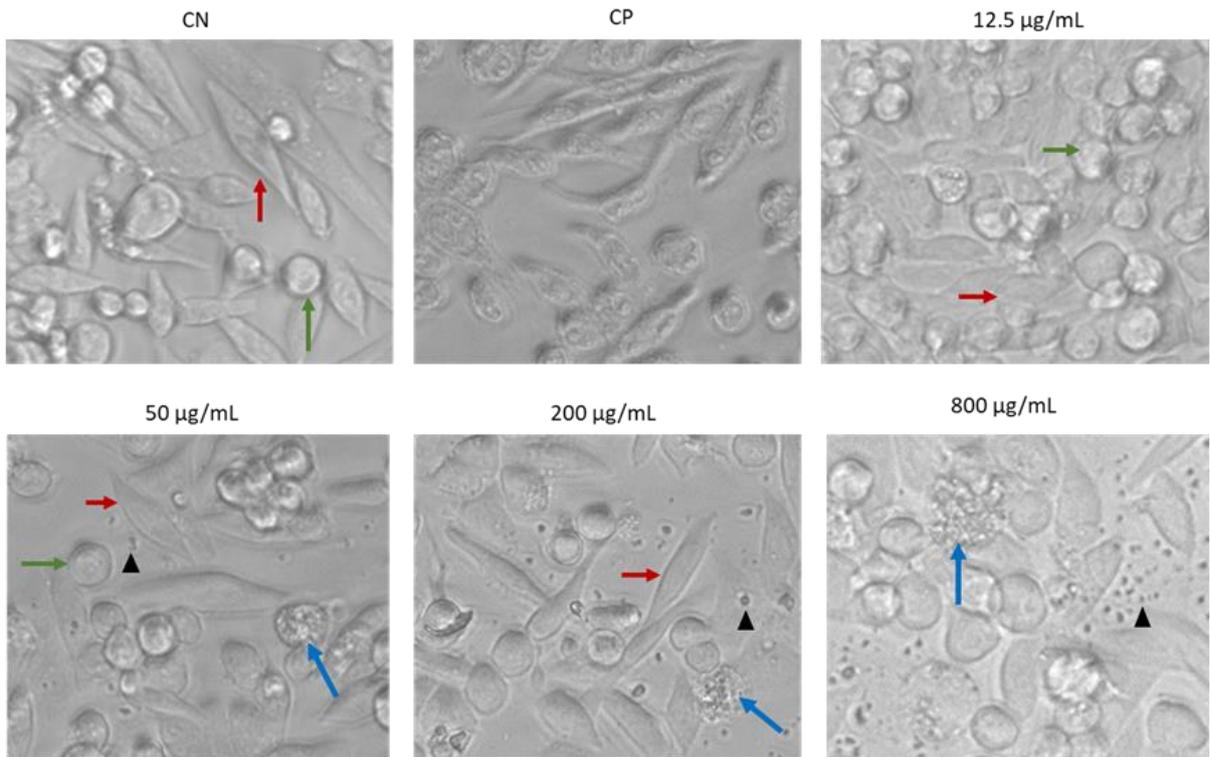
- bone marrow macrophages. *Oncotarget*. 2018;9(52):29934–43.
52. Peine KJ, Gupta G, Brackman DJ, Papenfuss TL, Ainslie KM, Satoskar AR, et al. Liposomal resiquimod for the treatment of leishmania donovani infection. *J Antimicrob Chemother*. 2014;69(1):168–75.
53. Susta L, Cornax I, Diel DG, Garcia SC, Miller PJ, Liu X, et al. Expression of interferon gamma by a highly virulent strain of Newcastle disease virus decreases its pathogenicity in chickens. *Microb Pathog*. 2013;61–62(May 2018):73–83.
54. Shebl FM, Pinto LA, García-Piñeres A, Lempicki R, Williams M, Harro C, et al. Comparison of mRNA and protein measures of cytokines following vaccination with human papillomavirus-16 L1 virus-like particles. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2010;19(4):978–81.
55. Mao K, Chen S, Chen M, Ma Y, Wang Y, Huang B, et al. Nitric oxide suppresses NLRP3 inflammasome activation and protects against LPS-induced septic shock. *Cell Res*. 2013;23(2):201–12.

## **ANEXOS**

### **ANEXO 1: Morfología de células HD-11 expuestas a diferentes concentraciones de Adyuvax**

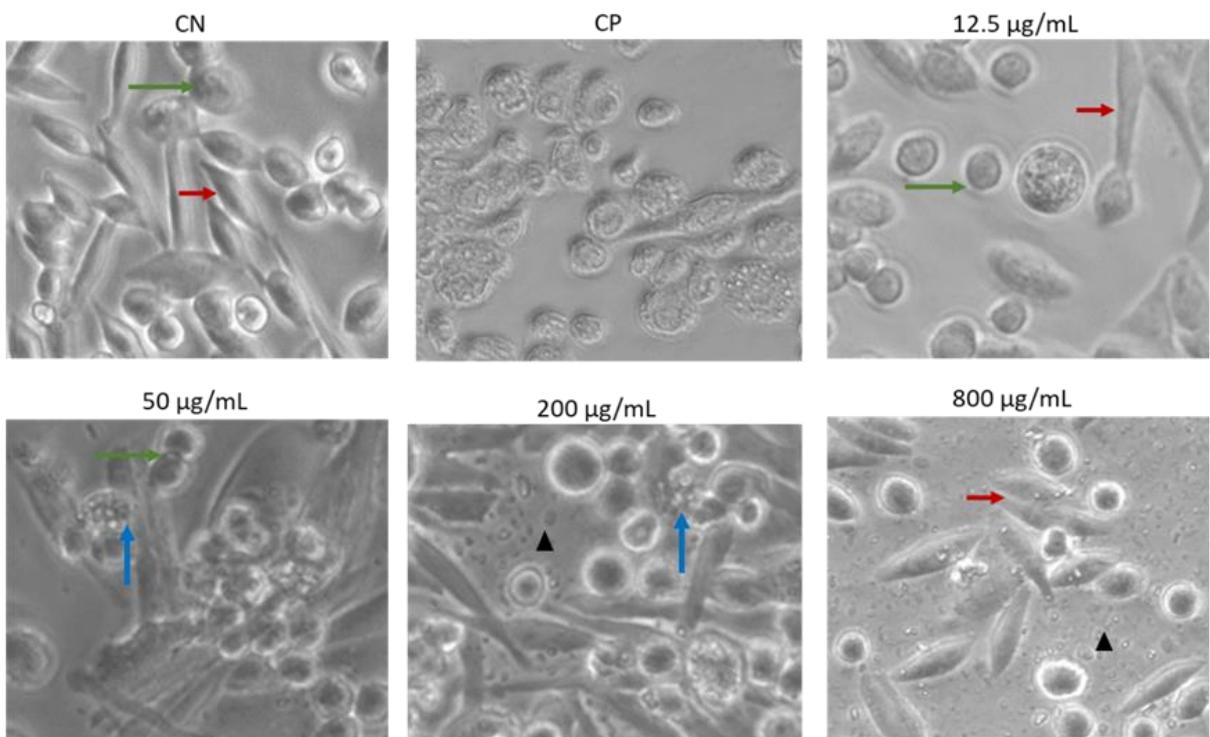
Del ensayo de citotoxicidad de Adyuvax, se observó por microscopia la morfología de las células HD-11 tratadas a diferentes concentraciones con su forma típica a un macrófago, ovoide, en huso y similar al control de células sin tratamiento (CN). Sin embargo, se observó micropartículas dispersas en la suspensión celular en los grupos tratados con Adyuvax, siendo más visibles a mayor concentración de este adyuvante (Figura Anexo 1). Por otro lado, las células expuestas a etanol al 50% (control positivo) se mostraron con vacuolas, crenadas y diferentes al CN. Esas observaciones fueron similares a las 24 h y 48 h de exposiciones a Adyuvax.

**A)**



24 h

**B)**

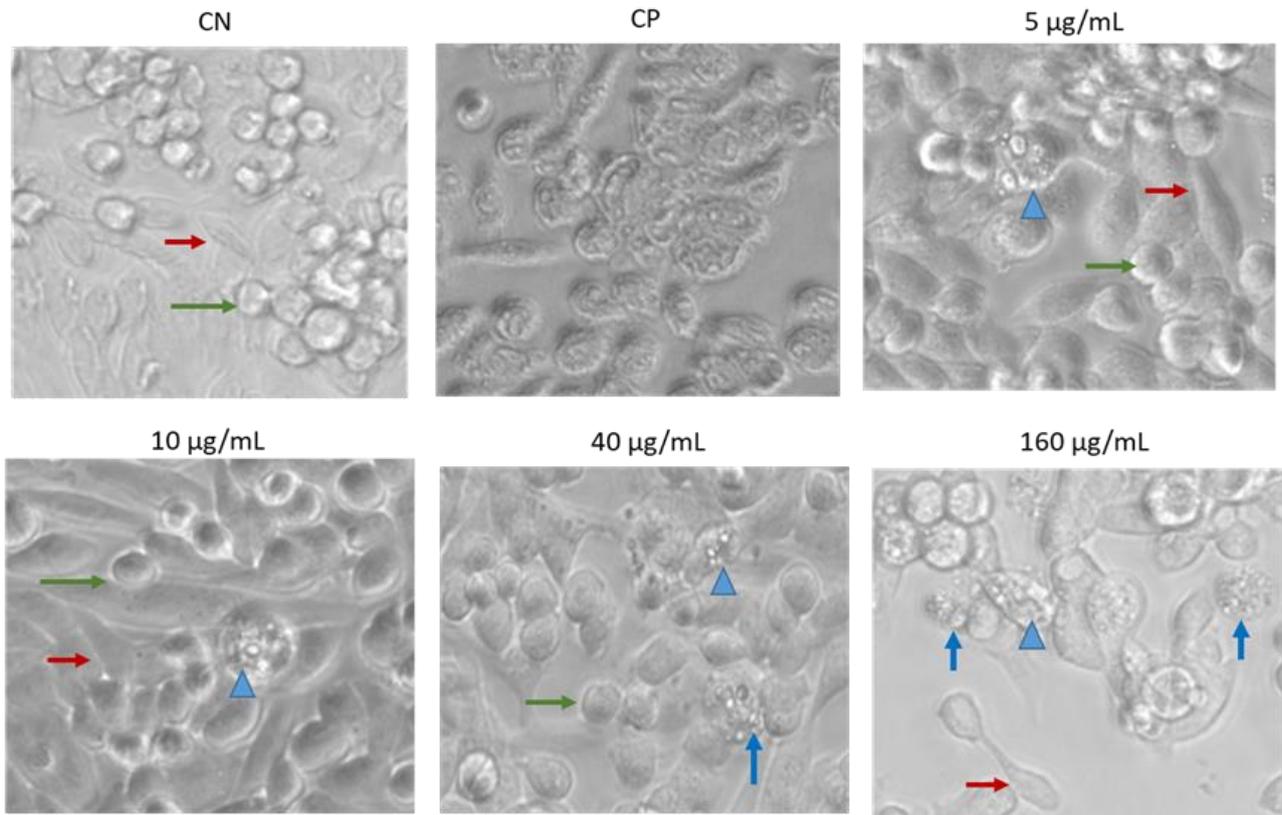


48 h

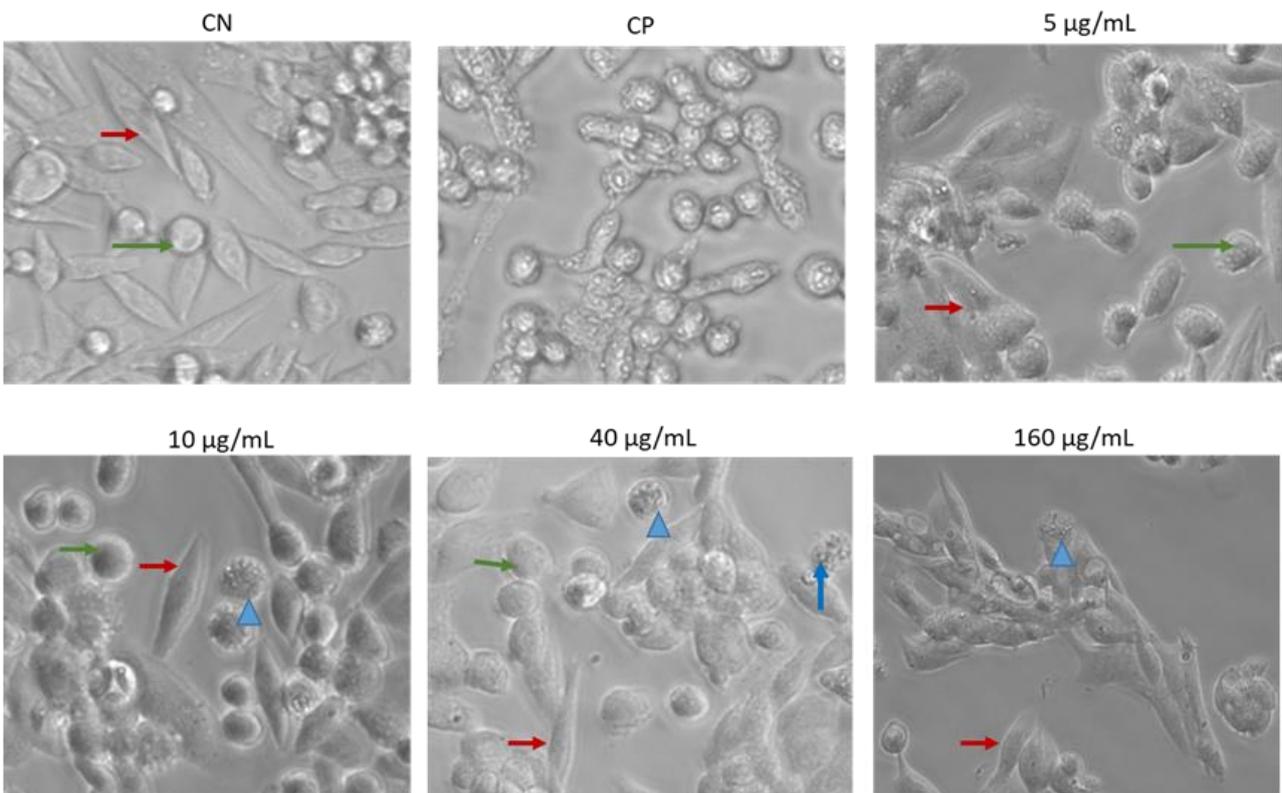
**Figura Anexo 1. Imágenes representativas de células HD-11 expuestas a diferentes tratamientos de Adyuvax. Células HD-11 tratadas con 12.5, 50, 200 y 800 µg/mL de Adyuvax por 24 h (A) y 48 h (B).** CN, control negativo (células no tratadas); CP, control positivo (células tratadas con etanol al 50%). HD-11 en forma ovoide (Flecha verde), huso (Flecha roja) y abultadas con gránulos intracelulares (Flecha azul). Micropartículas dispersas (Triángulo). Las fotografías son representativas de tres experimentos independientes (n=4). Magnitud 40x

## **ANEXO 2: Morfología de células HD-11 expuestas a diferentes concentraciones de R-848**

Las imágenes microscópicas mostraron que las células expuestas a R-848, tanto a las 24 y 48 h, presentaron formas ovoides, en huso y con más presencia de vacuolas, éstas últimas diferentes al CN (Figura Anexo 2). La presencia de acumulación de las vacuolas intracelulares se observó en todas las concentraciones evaluadas, y hubo mayor número de células con vacuolas a mayores concentraciones (160 y 320  $\mu\text{g/mL}$ ). A diferencia del CN, a mayores concentraciones de R-848 se observa células con alteraciones en la membrana celular (Apoptóticas) y células abultadas ("gigantes").

**A)**

24 h

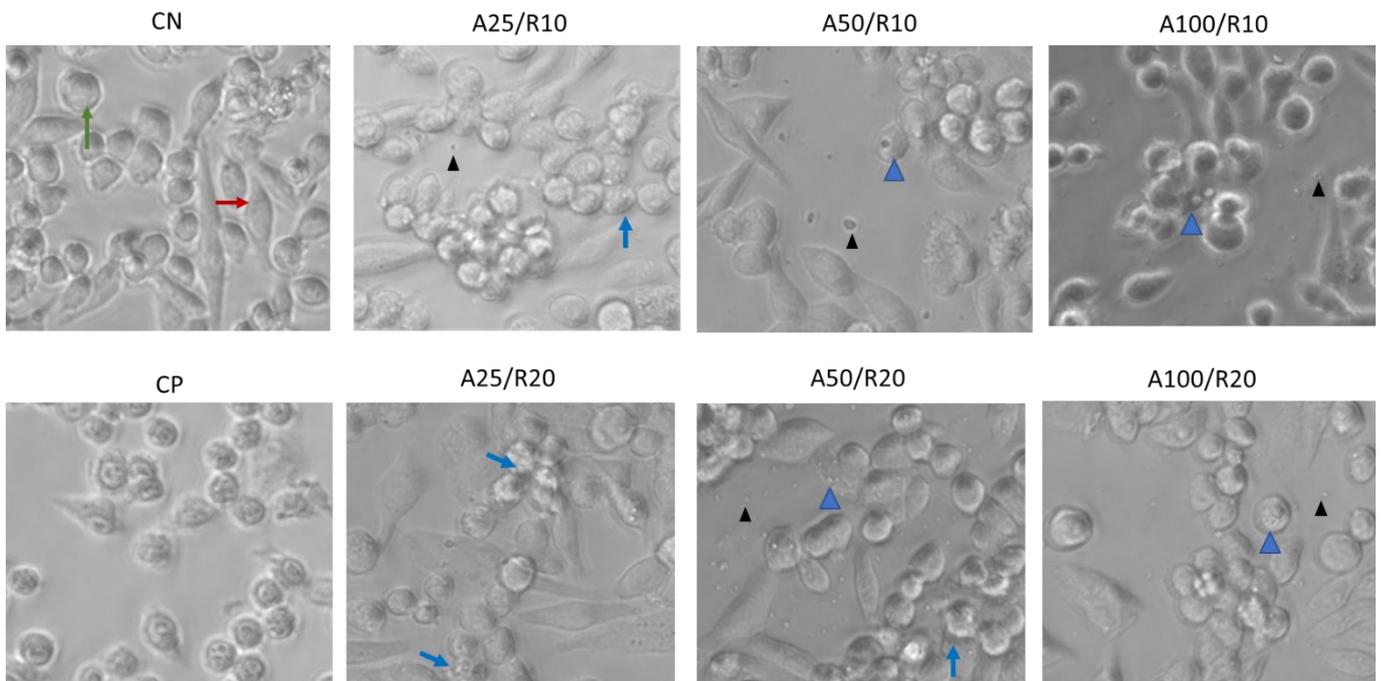
**B)**

48 h

**Figura Anexo 2. Imágenes representativas de células HD-11 expuestas a diferentes tratamientos de R-848.** Células HD-11 tratadas con 5, 10, 40 y 160  $\mu\text{g/mL}$  de R-848 por 24 h (A). CN, control negativo (células no tratadas); CP, control positivo (células tratadas con etanol al 50%). HD-11 en forma ovoide (Flecha verde), huso (Flecha roja) y apoptóticas (Flecha azul). Células con vacuolas (Triángulo). Las fotografías son representativas de tres experimentos independientes (n=4). Magnitud 40x.

### **ANEXO 3: Morfología de células HD-11 expuestas a la combinación de Adyuvax y R-848**

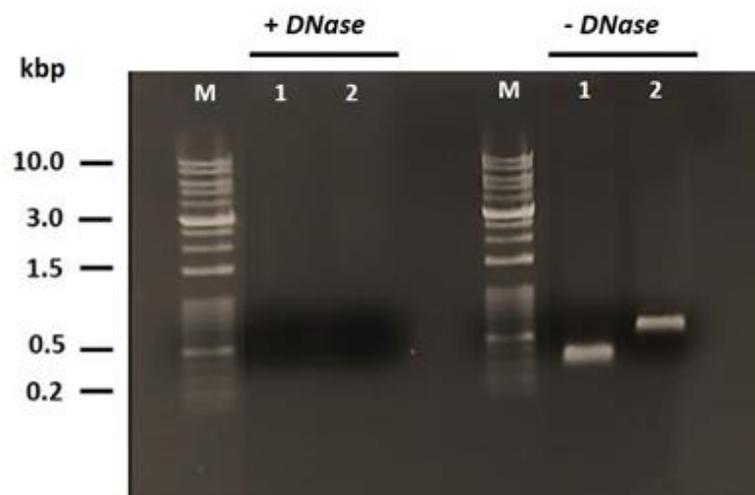
Las imágenes representativas muestran que las células HD-11 expuestas a las 24 h con la combinación de ambos adyuvantes se observan de formas ovoides, en huso y con acúmulo de vacuolas (Figura 7). Además, a comparación del CN se observa células apoptóticas, células abultadas y las micropartículas del Adyuvax, similares características observadas cuando se trataron en forma individual con cada adyuvante. No obstante, la combinación de 25 y 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de Adyuvax con R-848, tanto a 10 y 20  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , presentó menor cantidad de micropartículas que con la combinación de 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de Adyuvax. Por tal, para los ensayos posteriores con se seleccionó trabajar con 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de Adyuvax y 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de R-848 que se encontraron en el rango no tóxico y con características morfológicas similares cuando se trataron individualmente (ovoides, en huso, abultadas, con vacuolas, algunas apoptótica y micropartículas). Las imágenes fotográficas a las 48 horas muestran la morfología celular similar a las descritas a las 24 h (figuras no mostradas).



**Figura Anexo 3. Imágenes representativas de células HD-11 expuestas a la combinación de Adyuvax más R-848 por 24 y 48h.** CN, control negativo; CP, control positivo (células tratadas con etanol al 50%); A25, 25 µg/mL de Adyuvax; A50, 50 µg/mL de Adyuvax; A100, 100 µg/mL de Adyuvax; R10, 10 µg/mL de R-848; R20, 20 µg/mL de R-848. HD-11 en forma ovoide (Flecha verde), forma en huso (Flecha roja), apoptóticas (Flecha azul) y con vacuolas (Triangulo azul). Micropartículas de Adyuvax (Triangulo negro). Las fotografías son representativas de dos experimentos independientes (n=4). Magnitud 40x.

#### ANEXO 4: Tratamiento con ADNasa

Las muestras de ARN extraídas fueron tratadas con ADNasa y analizadas por electroforesis en gel de agarosa al 1.2% después de una reacción PCR punto final (Figura Anexo 4). Se observó que esas muestras tratadas no amplificaron productos de PCR (Figura Anexo 4, lado izquierdo), evidenciando que el ADN genómico contaminante fue digerido por el tratamiento en el tiempo aplicado. Por su parte, las muestras de ARN no tratadas con ADNasa (Figura Anexo 4, lado derecho) generaron amplicones, lo cual demostró la presencia de ADN genómico contaminante.



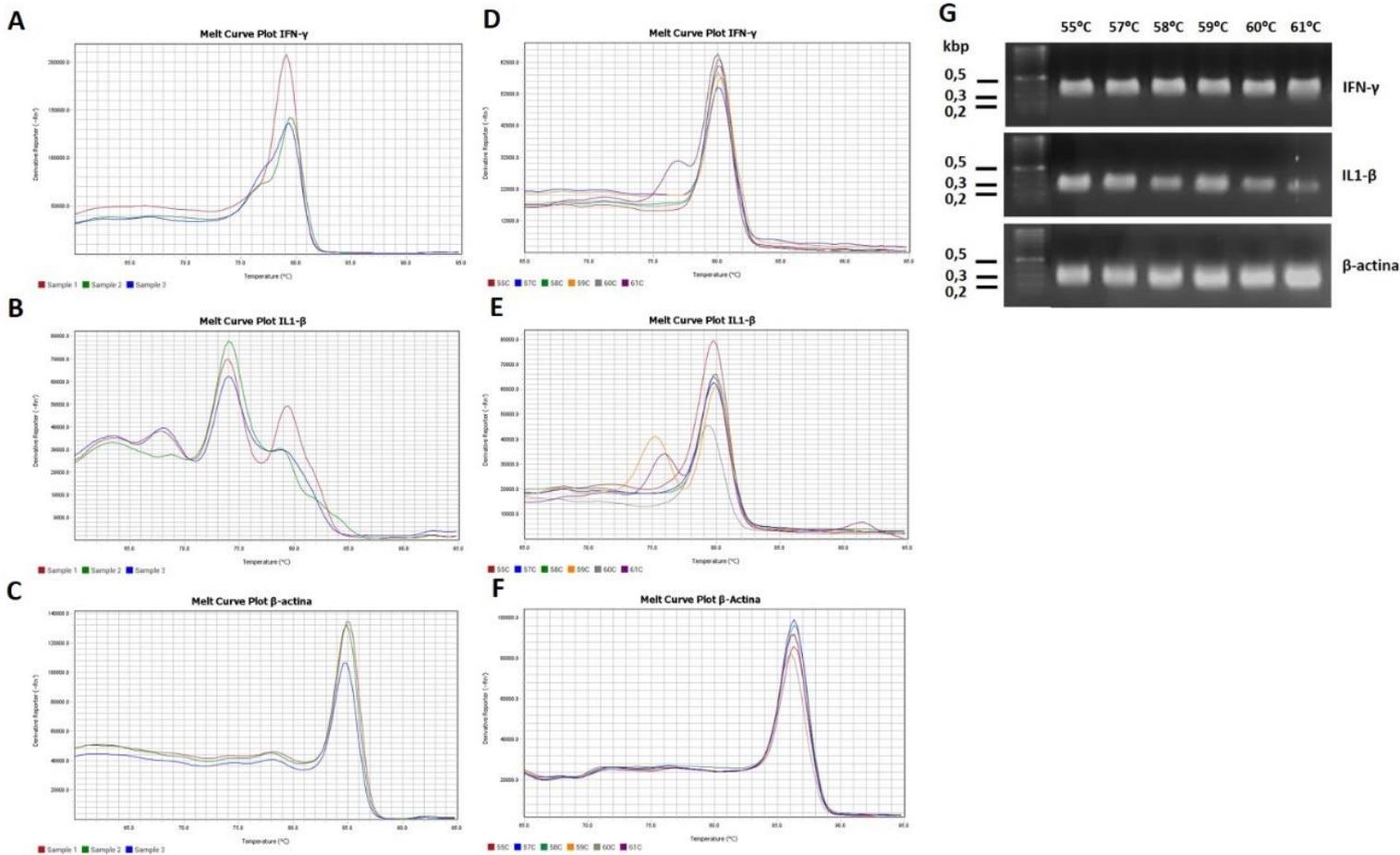
**Figura Anexo 4. Evaluación por PCR de contaminación con ADN genómico en muestras de ARN.** Electroforesis de productos de PCR punto final a partir de ARN total tratados o no con enzima ADNasa (*DNase*, en inglés). La línea superior indica tratado con enzima (+ *DNase*) o sin tratar (- *DNase*). Carril M, marcador de peso molecular de 1 kbp; carril 1, ARN amplificado con *primers* IFN- $\gamma$ ; carril 2, ARN

amplificado con *primers* IL-1 $\beta$ . kbp, kilopares de bases. Digestión a 37°C por 40 min.

### **ANEXO 5: Optimización de condiciones del RT-PCR para citocina**

Las condiciones iniciales usadas para desarrollar la metodología de RT-PCR para cuantificación relativa se realizó de acuerdo a Nang y colaboradores (33), usando 20  $\mu$ mol de *primers* y 2  $\mu$ l de ADNc, sin tratamiento con ADNasa. Los análisis de las curvas de *melting* mostraron que para el gen IL-1 $\beta$  se evidenció inespecificidad por la presencia de varios picos (Figura Anexo 5B), donde IFN- $\gamma$  y  $\beta$ -actina si mostraron un solo pico (Figura Anexo 5A,C), no siendo estas condiciones óptimas. Con ello, se realizaron evaluaciones de las temperaturas de alineamiento (55, 57, 58, 59, 60 y 61°C) en el RT-PCR usando como referencias los genes de IFN- $\gamma$ , IL-1 $\beta$  y  $\beta$ -actina (Tabla 5). Los análisis de las curvas de *melting* de las reacciones RT-PCR realizadas con el ADNc sintetizado a partir del ARN tratado con ADNasa mostraron un solo pico con todas las temperaturas de alineamiento evaluadas en el caso del gen de la  $\beta$ -actina (Figura Anexo 5 F). Para el caso del gen de IFN- $\gamma$ , se observó más de un pico a 61°C (Figura Anexo 5 D) y con el gen IL-1 $\beta$  se observaron 2 picos con las temperaturas de alineamiento de 59 y 61°C, donde los picos adicionales no específicos corresponderían a dímeros de *primers* por que estos aparecieron alrededor de 75°C (Figura Anexo 5 E). Se realizó electroforesis en gel de agarosa con los productos PCR de las reacciones RT-PCR para verificar la especificidad y robustez de las condiciones evaluadas para cada gen en este ensayo, donde se observaron bandas únicas (Figura Anexo 5 G). Las bandas obtenidas con

IL-1 $\beta$  no fueron tan robustas sugiriendo un ajuste en las condiciones de ciclaje para mejorar la robustez.

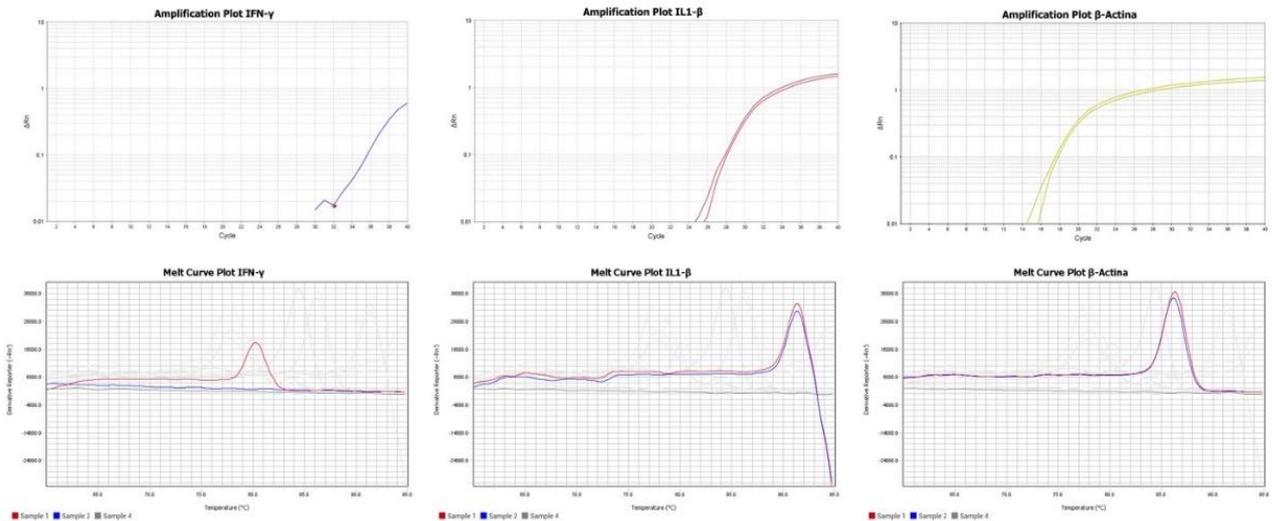


**Figura Anexo 5. Evaluación de especificidad analizando las curvas melting mediante RT-PCR en gradiente.** Se realizó análisis de las curvas de *melting* obtenida para cada temperatura de alineamiento evaluada. (A) Curvas *melting* de IFN- $\gamma$ , (B) curvas *melting* de IL-1 $\beta$ , (C) curvas *melting* de  $\beta$ -actina, todos ellos con 20  $\mu$ mol de primers y 2  $\mu$ l de ADNc. (D) Curvas *melting* de IFN- $\gamma$ , (E) curvas *melting* de IL-1 $\beta$ , (F) curvas *melting* de  $\beta$ -actina, RT-PCR en gradiente usando 10  $\mu$ mol de primers y 1  $\mu$ l de ADNc previamente tratado con ADNasa por 40 min. (G)

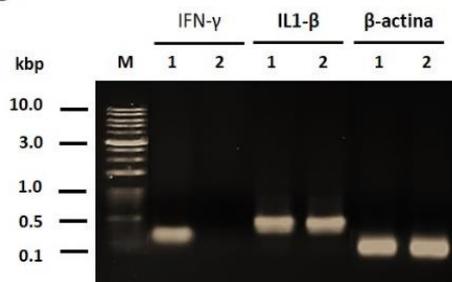
Electroforesis en gel de agarosa 2% de los productos de RT-PCR con la siguiente condición de ciclaje: 50°C/ 2 min, 95°C/ 2 min, 40 ciclos de 95°C/ 5 seg, 60°C/ 15 seg y 72°C/ 25 seg.

Se realizaron otras reacciones RT-PCR, modificando el tiempo en el paso de desnaturalización de 5 seg a 15 seg, la temperatura de alineamiento fijada en 60°C e incrementado el tiempo de alineamiento de 15 seg a 25 seg. Las curvas de amplificación y curvas *melting* obtenidas mostraron que esta condición de ciclaje fue más adecuada, donde el amplicón para el gen de IL-1 $\beta$  fue más robusto, y

**A**



**B**



manteniendo especificidad para los otros genes evaluados (Figura 6-A), y estos resultados fueron verificados por electroforesis en gel de agarosa (Figura 6-B)

**Figura Anexo 6. Evaluación de especificidad usando RT-PCR en gradiente.**

(A) Se realizó análisis de las curvas de *melting* obtenida con nuevas condiciones de ciclaje (50°C/ 2 min, 95°C/ 2 min, 40 ciclos de 95°C/ 15 seg, 60°C/ 25 seg y 72°C/ 25 seg), usado con los genes IFN- $\gamma$ , IL-1 $\beta$ , y  $\beta$ -actina, (B) Electroforesis en gel de agarosa 2% de los productos de RT-PCR donde se observa especificidad y robustez de los amplicones. Carril 1 (réplica 1), carril 2 (réplica 2). Marcador de peso molecular: 1 kbp DNA ladder.

Los resultados de los 2 ensayos realizados se obtuvieron con ARN tratado con ADNasa por 40 min, donde se evaluó también la variación de los valores Ct en las réplicas. Inicialmente, se compararon los tratamientos de ARN por 30 y 40 min respectivamente, usando como referencia el gen de  $\beta$ -actina. Se observó que usando 1  $\mu$ L de ambos ADNc tratados, sus valores Ct correspondientes tuvieron muy baja variación, evidenciado por la desviación estándar (0.11 y 0.26), y con coeficientes de variación (0.69 y 1.66) para 30 y 40 min de tratamiento con ADNasa, respectivamente. Asimismo, usando 2  $\mu$ L de ADNc el valor de desviación estándar (SD) se incrementó a 1.25 y coeficiente de variación (CV) a 8.75 para tratamiento por 30 min con ADNasa (Tabla 6). Entretanto, el ARN que fue previamente tratado por 40 min generó valores Ct menores, con SD de 0.35 y CV de 2.33, siendo valores próximos a los obtenidos usando 1  $\mu$ l de ADNc (Tabla 6). Con ello, se verificó que en reacciones de RT-PCR usando ADNc sintetizado a partir de ARN tratado con ADNasa por 40 min se obtienen valores Ct con poca variación entre sus réplicas. Con esta información, se realizó ensayo adicional incluyendo los genes IFN- $\gamma$ , IL-1 $\beta$  y  $\beta$ -actina con previo tratamiento del ARN por 50 min con ADNasa. Se verificó que los valores de SD y CV de los Ct obtenidos de los genes evaluados tuvieron

valores muy bajos (Tabla 6), siendo esta última condición que fue usada para todos los ensayos, junto con las nuevas condiciones de ciclaje.

Tabla 6. Efecto de tratamiento con ADNasa en la variación de los valores Ct

ADNasa	30 min		40 min		50 min			
Gen	$\beta$ -actina	IFN- $\gamma$	IL-1 $\beta$	iNOS				
ADNc	1 $\mu$ l	2 $\mu$ l	1 $\mu$ l	2 $\mu$ l	1 $\mu$ l	1 $\mu$ l	1 $\mu$ l	1 $\mu$ l
Promedio	15.92	14.36	15.64	15.01	18.98	39.18	29.86	23.96
SD $\pm$	0.11	1.25	0.26	0.35	0.21	0.025	0.19	0.22
CV%	0.69	8.71	1.66	2.33	1.11	0.06	0.64	0.91