



RIDAA

Repositorio Institucional
Digital de Acceso Abierto de la
Universidad Nacional de Quilmes



Universidad
Nacional
de Quilmes

Parra, Federico Leonel

Ingeniería de NaMu (Nanovesículas Multiefectoras). Preparación y caracterización estructural y funcional



Esta obra está bajo una Licencia Creative Commons Argentina.

Atribución - No Comercial 2.5

<https://creativecommons.org/licenses/by-nc/2.5/ar/>

Documento descargado de RIDAA-UNQ Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto de la Universidad Nacional de Quilmes de la Universidad Nacional de Quilmes

Cita recomendada:

Parra, F. L. (2020). *Ingeniería de NaMu (Nanovesículas Multiefectoras). Preparación y caracterización estructural y funcional. (Tesis de doctorado). Bernal, Argentina: Universidad Nacional de Quilmes. Disponible en RIDAA-UNQ Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto de la Universidad Nacional de Quilmes*
<http://ridaa.unq.edu.ar/handle/20.500.11807/2647>

Puede encontrar éste y otros documentos en: <https://ridaa.unq.edu.ar>

Ingeniería de NaMu (Nanovesículas Multiefectoras). Preparación y caracterización estructural y funcional

TESIS DOCTORAL

Federico Leonel Parra

fedeparra18@gmail.com

Resumen

El objetivo general de esta tesis doctoral fue diseñar racionalmente, preparar y caracterizar estructuralmente nanovesículas multiefectoras (NaMu), para luego testear su efecto modulador del sistema inmune, como vacunas profilácticas y/o agentes inmunoterapéuticos. Esto significa que puedan modificar las respuestas inmunitarias tras su aplicación, ya sea innatas (inespecíficas) o adaptativas (antígeno específicas: humoral, celular y de memoria). NaMu es el nombre particular con el que nosotros decidimos referirnos a un tipo de **vesículas de tamaño nanométrico que contienen en su estructura dos ligandos de receptores de reconocimiento de patrones (PRRs)**. Estas NaMu son, específicamente, nanoarqueosomas que contienen imiquimod (nanoARC-IMQ). Los nanoarqueosomas (nanoARC) son vesículas lipídicas (o liposomas) que se fabrican con lípidos extraídos de las arqueobacterias hiperhalófilas *Halorubrum tebenquichense*. El imiquimod (IMQ) es una molécula sintética con capacidad de modular la respuesta inmunitaria. Tanto los nanoARC como el IMQ son ligandos de (es decir, se unen selectivamente a) receptores específicos encontrados en células del sistema inmunitario (los PRRs). Los nanoARC son ligandos del Receptor *Scavenger A1* y el IMQ del receptor tipo Toll (TLR) 7. Hipotetizamos que, al combinar los dos ligandos en una sola plataforma (nanoARC-IMQ) lograríamos generar una respuesta inmune más potente que con los ligandos por separado e incluso mayor que la generada por otros compuestos comerciales.

Ingeniería de NaMu (Nanovesículas Multiefectoras)

Preparación y caracterización estructural y funcional

Lic. Federico Leonel Parra

TESIS DE DOCTORADO EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA | CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DESARROLLO EN
NANOMEDICINAS - UNIVERSIDAD NACIONAL DE QUILMES

Directora: Dra. Eder L. Romero

Tabla de contenido

1	Prólogo	- 5 -
2	Lista de abreviaturas	- 7 -
3	Resumen	- 13 -
4	Introducción	- 16 -
4.1	Nanomedicina	- 17 -
4.1.1	Definiciones preliminares	- 17 -
4.1.2	Sistemas de <i>delivery</i> (distribución) de fármacos	- 22 -
4.1.3	<i>Targeting</i> celular	- 26 -
4.1.4	Mecanismos de internalización de NP	- 28 -
4.2	Respuesta inmune	- 34 -
4.2.1	Biología del sistema inmunitario	- 34 -
4.2.2	Receptores de reconocimiento de patrones	- 42 -
4.2.2.1	Receptores tipo Toll (TLRs)	- 43 -
4.2.2.2	Receptores scavenger (RS)	- 46 -
4.3	Inmunoterapia, vacunas y adyuvantes de vacunación	- 49 -
4.3.1	Definiciones generales	- 49 -
4.3.2	Vacunas: historia, clasificación y nuevos desafíos	- 51 -
4.3.3	¿Cómo funcionan las vacunas?	- 58 -
4.3.4	Adyuvantes de vacunación	- 59 -
4.3.5	Vacunas y adyuvantes basados en nanomateriales	- 63 -
4.4	Nanovesículas arqueolipídicas multiefectoras	- 67 -
4.4.1	Nanoarqueosomas (nanoARC):	- 67 -
4.4.1.1	Arqueobacterias y arqueolípidos: características distintivas	- 68 -
4.4.1.2	Arqueosomas (ARQ)	- 74 -
4.4.1.3	Técnicas de preparación y caracterización de nanoARC	- 78 -
4.4.2	Imidazoquinolinas agonistas a TLR7	- 80 -
4.5	Objetivos generales y específicos de esta tesis doctoral	- 87 -
5	Diseño y caracterización de nanoarqueosomas con imiquimod (nanoARC-IMQ) dirigidos a macrófagos	- 89 -
5.1	Objetivos	- 90 -

5.2	Introducción	- 91 -
5.2.1	Problemas asociados a las formulaciones de IMQ	- 91 -
5.2.2	Hacia una formulación estable y poco tóxica de IMQ	- 92 -
5.2.3	El dilema <i>in vitro</i> – <i>in vivo</i>	- 94 -
5.3	Materiales y métodos	- 96 -
5.3.1	Materiales	- 96 -
5.3.2	Crecimiento de arqueobacterias, extracción y caracterización de arqueolípidos polares totales	- 96 -
5.3.3	Preparación del antígeno total de <i>Leishmania amazonensis</i>	- 97 -
5.3.4	Preparación de nanoARC-IMQ y LIPO-IMQ	- 97 -
5.3.5	Caracterización de las nanovesículas	- 99 -
5.3.5.1	Cuantificación de fosfolípidos e imiquimod	- 99 -
5.3.5.2	Tamaño y potencial ζ de nanovesículas	- 99 -
5.3.5.3	Polarización generalizada (GP) y anisotropía de fluorescencia (FA) de nanovesículas	- 99 -
5.3.5.4	Microscopía electrónica de crio-transmisión (Crio-TEM)	- 100 -
5.3.6	Ensayos <i>in vitro</i> sobre células de macrófagos J774 A.1	- 101 -
5.3.6.1	Células utilizadas	- 101 -
5.3.6.2	Ensayo de viabilidad celular	- 101 -
5.3.6.3	Visualización de cambios morfológicos	- 102 -
5.3.6.4	Liberación de citoquinas pro-inflamatorias	- 103 -
5.3.7	Ensayos <i>in vivo</i> en ratones de laboratorio	- 103 -
5.3.7.1	Animales y esquemas de inmunización	- 103 -
5.3.7.2	Reacción de hipersensibilidad retardada (DTH)	- 104 -
5.3.7.3	Respuesta humoral	- 105 -
5.3.7.4	Medición de IFN gamma	- 105 -
5.3.7.5	Determinación de citoquinas intracelulares IL-10 e IL-12	- 106 -
5.3.7.6	Análisis de marcadores de superficie de esplenocitos	- 106 -
5.3.7.7	Ensayo de proliferación de linfocitos	- 107 -
5.3.8	Análisis estadístico	- 107 -
5.4	Resultados	- 108 -
5.4.1	Estructura de las nanovesículas	- 108 -
5.4.2	Fluidez y orden de las bicapas de las nanovesículas	- 111 -
5.4.3	Citotoxicidad de las nanovesículas e inducción de TNF- α e IL-6 en macrófagos de ratones J774 A.1	- 112 -
5.4.4	Reacción de hipersensibilidad retardada (DTH)	- 115 -

5.4.5	Títulos de IgG sistémicos e isotipos de IgG antígeno-específicos _____	- 116 -
5.4.6	Producción de IFN- γ y citoquinas IL-10 e IL-12 por esplenocitos de ratones ____	- 117 -
5.4.7	Marcadores superficiales de esplenocitos _____	- 118 -
5.4.8	Linfoproliferación de esplenocitos _____	- 120 -
5.5	Discusión _____	- 121 -
6	<i>Aplicación de nanoARC-IMQ como terapia inmunomoduladora contra enfermedad de Chagas en fase aguda</i> _____	- 127 -
6.1	Objetivo _____	- 128 -
6.2	Introducción _____	- 129 -
6.2.1	Enfermedad de Chagas _____	- 129 -
6.2.2	Terapias tradicionales contra la enfermedad _____	- 132 -
6.2.3	Las posibilidades de los nanoARC-IMQ _____	- 133 -
6.3	Materiales y métodos _____	- 134 -
6.3.1	Extracción de arqueolípidos polares totales y preparación de nanovesículas ____	- 134 -
6.3.2	Infección de ratones y esquemas de tratamiento _____	- 134 -
6.3.3	Evaluación de la eficacia del tratamiento _____	- 135 -
6.3.4	Perfil serológico _____	- 135 -
6.3.5	Evaluación del daño muscular _____	- 136 -
6.3.6	Determinación de niveles de citoquinas _____	- 137 -
6.3.7	Análisis estadísticos _____	- 137 -
6.4	Resultados _____	- 138 -
6.4.1	Caracterización de nanoarqueosomas _____	- 138 -
6.4.2	Eficacia anti- <i>T. cruzi</i> _____	- 138 -
6.4.3	Respuesta de anticuerpos específica contra <i>T. cruzi</i> _____	- 140 -
6.4.4	Evaluación de daño tisular _____	- 141 -
6.4.5	Niveles de IFN- γ y TNF- α _____	- 144 -
6.5	Discusión _____	- 146 -
6.6	Conclusiones _____	- 152 -
7	<i>Agonistas de TLRs nanoparticulados: limitando el uso de antibióticos veterinarios y mucho más</i> _____	- 153 -
7.1	Objetivos _____	- 154 -
7.2	Introducción _____	- 156 -

7.2.1	Nanotecnología en veterinaria _____	- 156 -
7.2.2	Utilizando la inmunidad innata para activar las respuestas inmunes adaptativas _____	- 160 -
7.2.3	Problemas de toxicidad sistémica en la administración de agonistas a TLRs y cómo solucionar esto con nanopartículas _____	- 163 -
7.2.4	Las nanopartículas reducen la toxicidad de los agonistas de TLRs y proveen <i>targeting</i> endosómico _____	- 164 -
7.2.5	Nuevos desafíos de la inmunización veterinaria _____	- 167 -
7.3	Inmunoterapéuticos veterinarios basados en sistemas de <i>delivery</i> nanoparticulados de agonistas de TLRs _____	- 169 -
7.3.1	Animales de producción _____	- 175 -
7.3.1.1	Vacunos _____	- 175 -
7.3.1.2	Aves de corral _____	- 179 -
7.3.1.3	Cerdos _____	- 186 -
7.3.1.4	Peces _____	- 187 -
7.3.2	Mascotas _____	- 189 -
7.3.2.1	Caballos _____	- 189 -
7.3.2.2	Gatos _____	- 190 -
7.3.2.3	Perros _____	- 191 -
7.4	Discusión y conclusiones _____	- 194 -
8	<i>Epílogo</i> _____	- 199 -
9	<i>Bibliografía</i> _____	- 204 -

1 Prólogo

Primero quiero aclarar que mientras escribo las últimas (o primeras) páginas de este texto aún sigo siendo un estudiante de doctorado (o *doctorando*, en la jerga de los pasillos de la ciencia). Un doctor, en el estricto significado, no es un médico ni un abogado. A diferencia de dichas profesiones (y sin desmerecimiento alguno) para ser realmente un doctor (un ser conocido internacionalmente como PhD, Philosophy Doctor) hace falta hacer un trabajo de investigación de posgrado en un tema específico y novedoso que dure por lo menos tres años, que lleve a la publicación de artículos en revistas científicas con arbitraje y que culmine con la escritura de *la tesis de doctorado* (un documento extenso que describe todo el trabajo realizado durante esos años). Muchos escriben su tesis con el objetivo de recibirse y al fin ser doctores (como sacándose un peso de encima, como habiendo llegado al fin al punto ese que parecía que nunca se iba a llegar, como siguiendo por impulso un camino ineludible). Creo que la tesis es una historia y, por lo tanto, merece ser contada de esa manera... con emociones de todo tipo. El doctorado es, a veces, frustrante, desolador, triste, vertiginoso, austero, pero es, sin dudas, gratificante. Y la cantidad de cosas que uno aprende son innumerables. Por eso en estas breves líneas quiero agradecer a mis compañeros del labo (Centro de Investigación y Desarrollo en Nanomedicinas de la UNQ, para ser más precisos), con quienes compartí estos años de trabajo y pasamos momentos excelentes (algunos no tanto, pero la mayoría sí). Le dedico estas líneas a Jair, Juli, Yami, Noe, Stefi y Aye; y tampoco me olvido de Lety, Pri, Pau y María José, pero sobre todo a Eder (Romero), mi directora. Me guió, me mentoreó, me acompañó, me presionó y me recontra retó cuando tuvo que hacerlo; y más que nada, me enseñó casi todo lo que aprendí. Quiero demostrarle mi gratitud también a Patricia P., con quien hicimos unos cuantos experimentos en el IMPAM de la Facultad de Medicina de la UBA. Con ella aprendí todo sobre el Chagas. Y no me olvido de Mónica V., que siempre estuvo dispuesta a recibirme y trabajar en conjunto en la Academia Nacional de Medicinas y, sobre todo, me instruyó prácticamente en todo lo que refiere al uso de la citometría de flujo.

Ahora, sin dejar de lado el criterio y la especificidad que caracterizan a la ciencia, intentaré narrar de forma atractiva para el lector esto que considero una gran historia y que se conoce como *doctorado*. Mi historia empezó en 2014, cuando me recibí de biotecnólogo en UADE y entré como pasante al laboratorio de nanomedicinas de la UNQ. Me presenté a la beca de doctorado de CONICET y me “salió” (como solemos decir) en diciembre de 2014, para arrancar en abril de 2015. Ese fue el verdadero comienzo de mi *doctorado*, que pasaré a desarrollar en las próximas (250 aprox.) páginas. La idea es que cualquier persona que quiera leerlo pueda entenderlo, ya sea un biólogo, un docente jubilado, un técnico químico, un abogado o un periodista. Para eso está la ciencia, para darla a conocer.

Posdata del prólogo: agradezco de corazón a mi madre y a mi padre y con más amor que nunca a mi novia (futura esposa si Dios quiere). Agradezco a Dios, por estar en el aquí y ahora, porque no cualquiera tiene la posibilidad de estudiar, trabajar y hacer lo que le realmente le gusta: no todo es meritocracia, como algunos nos quieren hacer creer. Espero darle a todo el conocimiento adquirido en estos años un uso que contribuya al bien común y al desarrollo sostenible en mi querido país. Apuesto por la Argentina, aunque me digan que me vaya a Europa.

2 Lista de abreviaturas

Células, receptores y citoquinas

AR: receptor de adenosina

CD: célula dendrítica

CLR: receptores tipo lecitina C

CPA: célula presentadora de antígeno

DAMP: patrones moleculares asociados al daño

IFN: interferón, puede ser α (alfa), β (beta) o γ (gamma)

Ig: inmunoglobulina o anticuerpo, puede ser tipo A, D, E, G o M

IL: interleucina o interleuquina, hay distintos tipos: IL-1, IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-12, IL-13, IL-17

IRF3: factor regulador del interferón 3

LB: linfocitos B o células B

LT: linfocito T

LTc: linfocito T citotóxico o CD8+

LTh: linfocito T helper o CD4+, pueden ser Th1, Th2 o Th17

MHC: complejo mayor de histocompatibilidad, puede ser I o II

NF- κ B: factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras κ (kappa) de las células B activadas

NK: células *Natural Killer*

NLR: receptores tipo NOD

PAMP: patrón molecular asociado a patógenos

pCD: célula dendrítica plasmacitoide

PRR: receptor de reconocimiento de patrón

RS: receptor *scavenger*

TCR: receptor de célula T

TGF- β : factor de crecimiento transformante β (beta)

TLR: receptores tipo Toll

TNF- α : factor de necrosis tumoral α (alfa)

Lípidos

APT: arqueolípidos polares totales

BPG: sn-2,3-di-O-fitanil-1-fosfoglicerol-3-fosfo-sn-di-O-fitanilglicerol

Chol: colesterol

DPPC: dipalmitoilfosfatidilcolina

DPPG: dipalmitoilfosfatidilglicerol

DSPC: diestearoilfosfatidilcolina

EDC: 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida

HSCP / SPC: fosfatidilcolina de soja hidrogenada / fosfatidilcolina de soja no hidrogenada

PC: fosfatidilcolina

PG: 2,3-di-O-fitanil-sn-fosfatidilglicerol

PGP-Me: 2,3-di-O-fitanil-sn-glicerol-1-fosfo-(3'-sn-glicerol-1'-metilfosfato)

PL: fosfolípidos

SDGD-5: 1-O-[α -D-manosa-(2'-SO₃H)-1'→2')- α -D-glucosa]-2,3-di-O-fitanil-sn-glicerol

SDGD-5-PA: 1-O-[α -D-manosa-(2'-SO₃H)-1'→2')- α -D-glucosa]-2,3-di-O-fitanil-ácido fosfatídico-sn-glicerol

Liposomas y nanopartículas

ARQ: arqueosomas

ISCOM™: complejos de inmuno-estimulación

LIPO: liposomas convencionales

LIPO-IMQ: liposomas con imiquimod encapsulado

nanoARC: nanoarqueosomas

nanoARC-IMQ: nanoarqueosomas con imiquimod encapsulado

NP: nanopartícula

PLGA: ácido poli(láctico-co-glicólico)

TLR-NP: agonista de TLR nanoparticulado, es decir, que ha sido encapsulado en una NP.

VLP: partículas recombinantes similares a virus (*virus-like particles*)

Moléculas pequeñas

AMPc: adenosín monofosfato cíclico

ARN / ADN: ácido ribonucleico / desoxirribonucleico

BZ: n-bencil-2-nitro-1-imidazolacetamida o benznidazol

CpG-ADN: ADN con secuencias repetitivas de citosina-fosfato-guanina no metilado

CpG-ODNs: oligodeoxinucleótidos sintéticos con secuencias de citosina-fosfato-guanina no metilados

IMQ: imiquimod

LTA: ácido lipoteicoico bacteriano

MPLA: lípido A monofosforilado derivado del LPS

OVA: ovoalbúmina

PEG: polietilenglicol

Poli I:C: ácido poliinosínico:policitidílico

Reactivos y materiales

ABTS: ácido 2'2-azino-bis-(3-etilbenzotiazol-6-sulfónico)

BSA: albúmina sérica bovina

CFSE: éster de succinimidil-carboxifluoresceína

CK: creatina quinasa

ConA: concanavalina A

DMSO: dimetilsulfóxido

FITC: isotiocianato de fluoresceína

ISA 763: Montanide™ ISA 763 AVG

ISA: ácido isoesteárico

LDH: lactato deshidrogenasa

LH: ácido láctico

LPS: lipopolisacárido bacteriano

MTT: bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio

PBS: buffer fosfato salino

PBST: buffer fosfato salino con 0,05% de Tween 80

PBST-BSA: buffer fosfato salino con 0,05% de Tween 80 y 0,1% de BSA

PE: ficoeritrina

PerCP: complejo de clorofila-proteína peridina

PMA: forbol-12-miristato-13-acetato

RPML: medio de cultivo Roswell Park Memorial Institute 1640

SFB: suero fetal bovino

TLA: antígeno total de *Leishmania amazonensis*

Tris-HCl: buffer Tris-HCl 10 mM con 0,9% p/p de NaCl y pH 7,4.

Técnicas y análisis estadísticos:

ANOVA: análisis de la varianza

DE: desvío estándar

DLS: dispersión dinámica de la luz

DO: densidad óptica

EE: error estándar

ELISA: ensayo de inmunoabsorción ligado a enzima

FA: anisotropía de fluorescencia

GP: polarización generalizada

TEM: microscopía electrónica de transmisión. Su variante, crio-TEM es por criofractura

Inmunizaciones y vías de administración

i.d.: vía intradérmica

i.m.: vía intramuscular

i.p.: vía intraperitoneal

i.v.: vía intravenosa

p.i.: post-infección

s.c.: vía subcutánea

Varios

CICUAL: Comité Institucional de Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio

DDS: Sistema de *delivery* (distribución) de fármacos (*Drug Delivery System*, en inglés)

EMC: endocitosis mediada por clatrina

EPR: efecto de permeabilidad y retención aumentada

FCA: adyuvante completo de Freund

FDA: Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos
<https://www.fda.gov/about-fda/fda-en-espanol>

FIA: adyuvante incompleto de Freund

HBsAg: antígeno de superficie de la hepatitis B

ROS: especies reactivas de oxígeno

3 Resumen

Pienso en esta sección no solo como un resumen, sino como la contraportada de un libro. Uno de los elementos más importantes. Un texto que se escribe para persuadir a los lectores a que efectivamente compren ese libro. De la misma manera, en este resumen de la tesis les comento los puntos más relevantes del trabajo de todos estos años, de modo tal de persuadirlos a continuar con la lectura. Lo bueno, a diferencia de un libro, es que no tienen que comprarla.

Primero que nada, el objetivo general de esta tesis doctoral fue diseñar racionalmente, preparar y caracterizar estructuralmente nanovesículas multiefectoras (NaMu), para luego testear su efecto modulador del sistema inmune, como vacunas profilácticas y/o agentes inmunoterapéuticos. Esto significa que puedan modificar las respuestas inmunitarias tras su aplicación, ya sea innatas (inespecíficas) o adaptativas (antígeno específicas: humoral, celular y de memoria). NaMu es el nombre particular con el que nosotros decidimos referirnos a un tipo de **vesículas de tamaño nanométrico que contienen en su estructura dos ligandos de receptores de reconocimiento de patrones (PRRs)**. Estas NaMu son, específicamente, nanoarqueosomas que contienen imiquimod (nanoARC-IMQ). Los nanoarqueosomas (nanoARC) son vesículas lipídicas (o liposomas) que se fabrican con lípidos extraídos de las arqueobacterias hiperhalófilas *Halorubrum tebenquichense*. El imiquimod (IMQ) es una molécula sintética con capacidad de modular la respuesta inmunitaria. Tanto los nanoARC como el IMQ son ligandos de (es decir, se unen selectivamente a) receptores específicos encontrados en células del sistema inmunitario (los PRRs). Los nanoARC son ligandos del Receptor *Scavenger A1* y el IMQ del receptor tipo Toll (TLR) 7. Hipotetizamos que, al combinar los dos ligandos en una sola plataforma (nanoARC-IMQ) lograríamos generar una respuesta inmune más potente que con los ligandos por separado e incluso mayor que la generada por otros compuestos comerciales.

Para comentarlo de manera más ordena, divido a este resumen en tres partes.

En primer lugar, lo que refiere al diseño racional y preparación de las NaMu. Teniendo esto en cuenta lo anterior, el primer objetivo de este trabajo fue diseñar racionalmente el modo más eficiente de preparar los nanoARC-IMQ, es decir, de incorporar al IMQ dentro de estas nanovesículas lipídicas. Esto no es menor, ya que el IMQ es una molécula con la que resulta complejo trabajar. Es prácticamente insoluble en agua o cualquier otro sistema acuoso de pH neutro; también es poco soluble en muchos compuestos orgánicos normalmente utilizados para disolver otras moléculas insolubles en agua (como cloroformo, metanol, dimetilformamida, dimetilsulfóxido); es, por el contrario, soluble en ácidos orgánicos de cadena larga, como el ácido isoesteárico, el láctico, el oleico y el linoleico. Finalmente, logramos incorporar una buena proporción de IMQ dentro de los nanoARC de manera relativamente sencilla, aprovechando las cualidades distintivas de los lípidos de las arqueobacterias. Esto lo cuento con sumo detalle en la **sección 5**.

En segundo lugar, me refiero a las pruebas de funcionalidad. Una vez obtenidos los nanoARC-IMQ de manera reproducible, testeamos su capacidad de modular la respuesta inmune. Primero, de manera *in vitro* y como adyuvantes de vacunación profiláctica y posteriormente como vacuna terapéutica. En la **sección 5** describo los resultados de las pruebas en los que usamos nanoARC-IMQ como adyuvantes de vacunación profiláctica, en combinación con antígenos de *Leishmania amazonensis*, en ratones de laboratorio. Vimos que nuestra formulación fue capaz de generar una respuesta inmune humoral mayor (y celular similar) a la obtenida con el potente adyuvante comercial MONTANIDE™ ISA 763 A VG (una emulsión agua-en-aceite no mineral), y mucho más pronunciada que el IMQ solo, que los nanoARC sin IMQ, e incluso que liposomas preparados con lípidos convencionales extraídos de organismos eucariotas y que contenían IMQ (LIPO-IMQ). Luego realizamos experimentos en ratones de laboratorio para probar la eficacia de los nanoARC-IMQ como terapia ante una infección aguda con *Trypanosoma cruzi* (parásito causante de la enfermedad de Chagas). Observamos que los nanoARC-IMQ tuvieron un efecto realmente positivo en los ratones infectados, disminuyendo su mortalidad, la carga de parásitos en sangre, y mejorando su aspecto corporal, en comparación con aquellos tratados con IMQ solo o nanoARC vacíos. Y lo más

remarcable fue que el tratamiento con nanoARC-IMQ disminuyó significativamente el daño muscular en los ratones, lo que no fue logrado con el clásico medicamento benznidazol (una de las dos drogas que se encuentran actualmente en uso para contrarrestar la enfermedad de Chagas). Verán los experimentos y los resultados concretos dispuestos en la **sección 6**.

En la tercera parte de este resumen dedico unas breves líneas a comentar sobre el trabajo de investigación que realizamos, junto con mi directora, en el último tiempo de esta tesis. No es un trabajo experimental de mesada sino de investigación bibliográfica. Pretendimos, con esto, estudiar las posibles aplicaciones de distintas formulaciones nanotecnológicas que incorporan ligandos de TLRs (como los nanoARC-IMQ) en el campo veterinario. Así, en la **sección 7** analizamos los trabajos de los últimos 5 años en los que se han aplicado nano-inmunomoduladores veterinarios, para evaluar la perspectiva y la posibilidad de utilizar nuestras nanovesículas en esta área particular. Encontramos una buena cantidad de artículos publicados en los que describen el diseño, caracterización y uso de diferentes tipos de formulaciones nanoparticuladas que incorporan ligandos de TLRs. En particular nanopartículas poliméricas que incorporan oligodeoxinucleótidos sintéticos con secuencias CpG (CpG-ODNs), ligandos del TLR9, han sido ampliamente probadas como vacunas profilácticas en aves de corral. Algunos de esos tipos de nanopartículas también se han utilizado para tratar enfermedades no infecciosas. Sin embargo, el camino recorrido en veterinaria es más corto que en medicina humana y tan solo hemos encontrado dos productos comerciales que utilizan nanopartículas con un ligando de TLR, a pesar de que sí es notable que existen todavía grandes dificultades para llevar los descubrimientos nanotecnológicos del laboratorio al mercado.

4 Introducción

En este capítulo llevo adelante una reseña de los temas indicados que permitirán al lector seguir de cerca (y sin perderse) este camino. De una manera sencilla (pero sin dejar de lado la profundidad necesaria) explico todo lo que se tiene que tener en cuenta para comprender el desarrollo de este trabajo. Esta introducción va de lo general a lo particular, comenzando con definiciones sobre nanotecnología y sus aplicaciones en medicina, siguiendo con los conceptos biológicos de la respuesta inmunitaria y terminando con lo particular de mi trabajo doctoral.

4.1 Nanomedicina

4.1.1 Definiciones preliminares

El término nanotecnología (*nano* en griego significa enano) refiere a la construcción y utilización de estructuras funcionales que tengan por lo menos una dimensión en el rango de los nanómetros (lo que equivale a la milmillonésima parte de un metro, o alternativamente 10^{-9} metros). Para darse una idea, el ancho de un cabello mide aproximadamente 50000 nanómetros (nm), una bacteria puede llegar a tener un tamaño de 1000 nm, una proteína entre 1 y 20 nm y un átomo individual 0,25 nm (K. K. Jain, 2017). Los materiales, en escala nanométrica, exhiben propiedades fisicoquímicas únicas, que los hacen ideales para aplicarlos y producir de grandes avances en materia de energía, electrónica, comida y agricultura (Etheridge et al., 2013). Por estas propiedades y, además, porque los nanomateriales son similares en escala a las moléculas y a los sistemas biológicos, la nanotecnología es potencialmente útil también para aplicaciones médicas (Kim et al., 2010). Nanomedicina se define, por consiguiente, como la aplicación de la nanotecnología en el campo de la medicina e implica, en un amplio alcance, el uso de nanopartículas (NPs) o nanodispositivos para diagnóstico y terapéutica para el cuidado de la salud (K. K. Jain, 2017).

Un nanomaterial, según la definición adoptada por la Unión Europea, es: *"un material natural, secundario o fabricado que contenga partículas, sueltas o formando un agregado o aglomerado y en el que el 50 % o más de las partículas en la granulometría numérica presente una o más dimensiones externas en el intervalo de tamaños comprendido entre 1 nm y 100 nm"*. Y, además, debe considerarse un nanomaterial aquel que tenga *"una superficie específica por unidad de volumen superior a $60 \text{ m}^2/\text{cm}^3$ "* (European Commission, 2011). De la misma manera, según la Iniciativa Nacional de Nanotecnología de los Estados Unidos *"la nanotecnología es la comprensión y el control de la materia a nanoescala, en dimensiones entre aproximadamente 1 y 100 nanómetros"* (U.S. National Nanotechnology Initiative, s. f.). Sin embargo, las definiciones de nanotecnología y nanomedicina continúan

siendo un área de controversia y debate. Si bien, en un principio éstas se restringían hasta los 100 nm, se han observado comportamientos fisicoquímicos distintivos en nanomateriales con dimensiones mayores a los 100 nm y algunos autores proponen extender el rango de tamaño considerado para el área de nanomedicina (K. K. Jain, 2017). Por ejemplo, tomar 300 nm como el mejor tamaño para abarcar el comportamiento fisiológico único de los nanomateriales (Etheridge et al., 2013) o incluso extender el límite hasta 1000 nm *“porque hasta éste límite no solo se obtienen resultados novedosos, sino que se requieren técnicas químicas y de fabricación novedosas y científicamente exigentes”* (V. Wagner et al., 2006).

El gran conocimiento adquirido en las últimas décadas sobre las propiedades fisicoquímicas, así como de la performance de los nanomateriales en sistemas biológicos, ha generado un mayor interés por sus aplicaciones médicas (Howard, 2016). La mayor parte de los nanomateriales que se investigan en esta área son NPs y las principales familias de NPs son nanoesferas -con una estructura homogénea en toda la partícula- y nanocápsulas -con una estructura de esfera hueca- (K. K. Jain, 2017). Ambos tipos de NPs pueden estar fabricadas de diferentes materiales. Las NPs orgánicas o *“soft”* están construidas con materia blanda: liposomas, micelas, emulsiones, dendrímeros y nanoestructuras poliméricas o proteicas. Las NPs inorgánicas o *“hard”* son NPs metálicas, cerámicas o *quantum dots* (QDs) (Etheridge et al., 2013). En la **Figura 1** se muestran distintos ejemplos. Los QDs son NPs semiconductoras que tienen sus tres dimensiones confinadas entre 1 y 10 nm (C. J. Murphy & Coffey, 2002); los dendrímeros son polímeros esféricos altamente ramificados con arquitectura *core-shell* (núcleo/cubierta), con tamaños que pueden promediar los 5 – 20 nm (Gupta & Perumal, 2014); NPs de plata color amarillo de tamaño cercano a los 10 nm se pueden obtener fácilmente a partir de una reacción controlada con nitrato de plata y borohidruro de sodio (Solomon et al., 2007); las micelas poliméricas son moléculas con estructuras de *core-shell* formadas por copolímeros de bloques anfifílicos¹, que

¹ Los copolímeros en bloques son sustancias formadas por macromoléculas constituidas por bloques dispuestos en una secuencia lineal. Los anfifílicos consisten en macromoléculas formadas por bloques lipófilos unidos a bloques hidrófilos (Pasquali et al., 2005).

pueden tener tamaños de alrededor de entre 50 y 200 nm (Croy & Kwon, 2006); los liposomas están compuestos por fosfolípidos, que se autoensamblan para formar esferas de bicapas lipídicas que rodean un núcleo acuoso. De acuerdo al método de preparación y materiales utilizados su tamaño puede variar entre los 50 y los 1000 nm (Pattni et al., 2015); las NPs de sílice mesoporosas, con poros controlados de entre 2 y 50 nm, han ganado popularidad en los últimos años en el campo de la nanomedicina (Narayan et al., 2018).

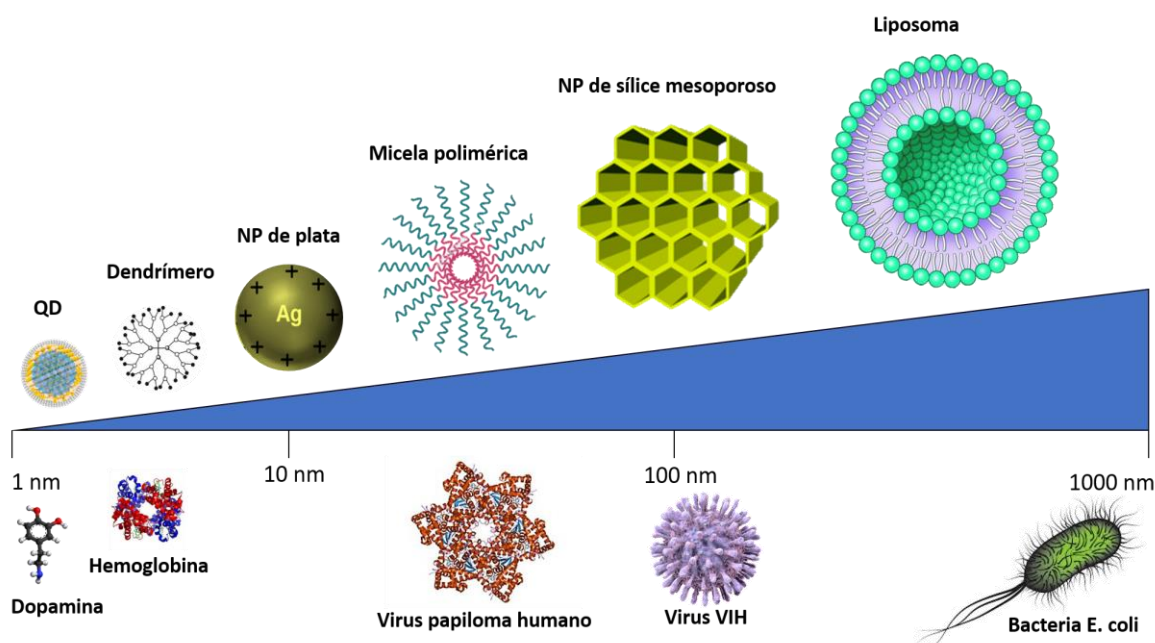


Figura 1: esquema con ejemplos de distintos tipos de NPs y compuestos naturales en un rango entre 1 y 1000 nm. Los dibujos no están hechos a escala. Para realizar el esquema se tomaron ilustraciones e información de (Croy & Kwon, 2006; Gupta & Perumal, 2014; K. K. Jain, 2017; C. J. Murphy & Coffer, 2002; Narayan et al., 2018; Pattni et al., 2015; Solomon et al., 2007), Wikipedia.com y BioRender.com

Existen ciertos fenómenos característicos de la escala nanométrica que provocan que los nanomateriales desplieguen propiedades distintivas. Uno de ellos es la gran relación área superficial/volumen que presentan los nanomateriales, que puede ser varios órdenes de magnitud más grande que la de los materiales macroscópicos. Para visualizarlo, se puede explicar de la siguiente manera: si partimos un cubo de 1 cm en 10^{21} cubos que tengan cada uno 1 nm de lado, esto resultará en la misma masa y volumen total que el cubo de 1 cm, pero el área superficial se incrementará por un factor de 10 millones. De esta manera la superficie de un nanomaterial es

mucho más reactiva, porque muchos más átomos se encuentran en contacto con el medio que los rodea, y, así, por ejemplo, puede ser recubierta con una gran cantidad de moléculas (Kim et al., 2010). Además, en la escala nanométrica los llamados efectos cuánticos rigen el comportamiento y las propiedades de las partículas. Las propiedades de los materiales dependen del tamaño en este rango de escala. Así, cuando el tamaño de las partículas se hace a nanoescala, propiedades como el punto de fusión, la fluorescencia, la conductividad eléctrica, la permeabilidad magnética y la reactividad química cambian en función del tamaño de la partícula (U.S. National Nanotechnology Initiative, s. f.).

Es por eso por lo que, por ejemplo, nanomateriales metálicos de distintos tamaños, formas o composiciones exhiben distintas propiedades ópticas, magnéticas y electrónicas. Los cambios en la dispersión de la luz por NPs de oro de distintos tamaños pueden aprovecharse para diseñar biosensores para diagnóstico de enfermedades (Rosi & Mirkin, 2005). NPs de hierro con propiedades magnéticas naturales pueden ser modificadas y utilizadas para aplicaciones de imágenes moleculares y detección de células cancerosas (J. H. Lee et al., 2007). Los nanocristales hacen uso de la alta solubilidad que ocurre en la nanoescala para la disolución de drogas poco solubles ampliamente utilizadas en la industria farmacéutica (Junghanns & Müller, 2008). Las propiedades biológicas únicas de algunas NPs, como la buena capacidad para circular por el torrente sanguíneo y extravasarse a través de las barreras endoteliales de los tejidos y entrar en las células por endocitosis (para más detalles sobre endocitosis ir a sección 4.1.4) (Blanco et al., 2015) hacen de éstas excelentes opciones para ser utilizadas como *carriers*² de fármacos para disminuir la toxicidad y aumentar la eficacia en pacientes (Howard, 2016). Además, la gran área superficial de las NPs permite funcionalizar su superficie con moléculas para dirigirlas a tejidos o células determinadas o para

² La traducción literal de la palabra *carrier* es “portador”, pero realmente no suena bien y no hace referencia a lo que queremos denotar, por lo tanto, dejamos el término literal en inglés, haciendo alusión a que una NP tiene la capacidad de encapsular o “cargar” una sustancia y “transportarla” hacia un sitio determinado.

evitar su reconocimiento por el sistema fagocítico mononuclear (SFM) (Davis et al., 2008).

Si bien hasta el año 2000 la mayoría de las nanomedicinas aprobadas para el uso en humano fueron productos terapéuticos, en las últimas décadas ha habido un incremento marcado en el número de dispositivos médicos, siendo los más destacados los nanodispositivos para pruebas *in vitro* e imágenes *in vivo* (Etheridge et al., 2013). NPs de oro son utilizadas en los ensayos inmunológicos de flujo lateral para pruebas rápidas de embarazo, ovulación y virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) (V. Wagner et al., 2006). Las nanomedicinas terapéuticas comerciales o que están en fases avanzadas de investigación clínica son, en su gran mayoría, de administración endovenosa para el tratamiento de diferentes tipos de tumores y cerca del 80% entran en el grupo de nanomedicinas *soft*. Las principales son liposomas, seguidos por NPs poliméricas; aunque también se ha extendido el uso de dendrímeros y NPs de oro (Etheridge et al., 2013; Kim et al., 2010).

Algunos autores señalan que la “era de la nanomedicina” comenzó en el año 2000 (Howard, 2016; V. Wagner et al., 2006). A partir de ese momento las actividades de patentamiento e investigación en el campo se multiplicaron, poco más de 200 compañías fueron identificadas con actividades de nanomedicina (Etheridge et al., 2013; V. Wagner et al., 2006). Sin embargo, los primeros productos comercializables fueron aprobados en la década del '90. Ambisome®, la formulación de anfotericina B liposomal para el tratamiento de infecciones fúngicas sistémicas fue aprobada en Europa, en el año 1990 (Allen & Cullis, 2013), mientras que la formulación liposomal de doxorubicina (Doxil®) fue la primera aprobada por la Administración de Alimentos y Medicamentos de Estados Unidos (FDA) para el tratamiento de tumores sólidos en el año 1995 (Bobo et al., 2016). Howard considera incluso que las proteínas recubiertas con polietilenglicol (PEG) deben incluirse dentro de la categoría de nanomedicinas. En este caso, Adagen® (adenosina deaminasa para el tratamiento de enfermedades de inmunodeficiencia) y Oncaspar® (asparaginasa para el tratamiento de leucemia) fueron aprobadas en

1990 y 1994, respectivamente. A partir de allí, otros productos como Depocyt® (liposomas con citarabina para el tratamiento del cáncer), Estrasorb® (NPs micelares con estradiol para terapia menopáusica) o Rapamune® (sirolimus nanocrystalino como inmunosupresor) –solo por nombrar algunos– han sido sacados al mercado (V. Wagner et al., 2006). Cabe destacar que el sector de desarrollo más explotado ha sido siempre el de “distribución de fármacos”, conocido comúnmente como *drug delivery* (V. Wagner et al., 2006).

4.1.2 Sistemas de *delivery* (distribución) de fármacos

Cuando hablamos de sistemas de distribución de fármacos (DDS³) nos referimos a partículas, compuestas principalmente por lípidos y/o polímeros, que se asocian a una droga, con el objetivo de mejorar algunas de las propiedades farmacológicas de la misma droga en su formato libre. Según (Allen & Cullis, 2004), un DDS puede ayudar a:

- a) mejorar la solubilidad de una droga hidrófoba de difícil formulación;
- b) reducir o eliminar el problema de toxicidad asociado a la extravasación accidental de un fármaco en un tejido;
- c) proteger la droga y prevenir degradación prematura, funcionando como un reservorio que libera al fármaco de forma controlada;
- d) alterar la farmacocinética de una droga evitando su rápida eliminación renal;
- e) evitar que la droga se disperse extensivamente por todo el cuerpo y disminuir los efectos adversos en tejidos sensibles;
- f) aumentar la concentración del fármaco en los tejidos enfermos valiéndose de algunas propiedades biológicas de los mismos o a partir de su funcionalización con ligandos determinados.

Los DDS basados en NPs incluyen principalmente liposomas, emulsiones, micelas y complejos polímero-droga o lípido-droga.

³ DDS: *Drug Delivery System* en inglés

Las vesículas lipídicas fueron primero descritas por Bangham en 1965 (Bangham, Standish, & Watkins, 1965; Bangham, Standish, & Weissmann, 1965; Bangham & Horne, 1964), luego fueron nombradas por primera vez con el nombre de liposomas por Weissman (Sessa & Weissmann, 1968), y ya en 1971 Gregoriadis propuso su uso como DDS (Gregoriadis et al., 1971; Gregoriadis & Ryman, 1971). Están compuestos por fosfolípidos que derivan o basan su estructura en lípidos de membranas biológicas, que son moléculas anfifílicas, es decir, que tienen una cabeza hidrófila y dos cadenas hidrófobas apolares. Cuando los fosfolípidos son dispersados en una cantidad excesiva de agua (más del 50% en peso), asumen una estructura única de configuración laminar que se puede visualizar como una membrana (bicapa de fosfolípidos apilada), rodeada de agua (Papahadjopoulos & Kimelberg, 1974) **(Figura 2A)**. Las bicapas lipídicas comprenden dos entornos físicamente muy diferentes. Su interior es una región lipófila relativamente homogénea de cadenas de hidrocarburos que interactúan principalmente a través de fuerzas de van der Waals atractivas y fuerzas estéricas repulsivas, que actúa como una barrera de permeabilidad. Por otro lado, los grupos de las cabezas hidrófilas de los lípidos están sujetos a fuertes interacciones entre sí, con el medio acuoso circundante, y con bicapas cercanas. Interacciones estéricas, fuerzas dipolares y electrostáticas (específicamente puentes de hidrógeno fuertemente asociados) contribuyen a determinar el estado físico de la bicapa y estabilizan esta organización (Israelachvili et al., 1980). La habilidad de los fosfolípidos para formar partículas cristalinas líquidas de láminas plegadas concéntricas (liposomas) está relacionada con la temperatura de transición (T_m , temperatura de fusión de las cadenas de hidrocarburos). Cuando se encuentran en ambientes donde la temperatura es mayor a su T_m , están en estado fluido, mientras que en ambientes donde la temperatura es menor a su T_m , están en estado gel. Los fosfolípidos naturales, que están generalmente por encima de este punto de transición a temperatura ambiente, forman estas estructuras espontáneamente (Papahadjopoulos & Kimelberg, 1974). Debido a la presencia de un núcleo acuoso y una bicapa lipídica, los liposomas tienen la capacidad de incorporar tanto

moléculas hidrófilas (queda atrapadas en el interior acuoso) como lipófilas (se insertan en la bicapa).

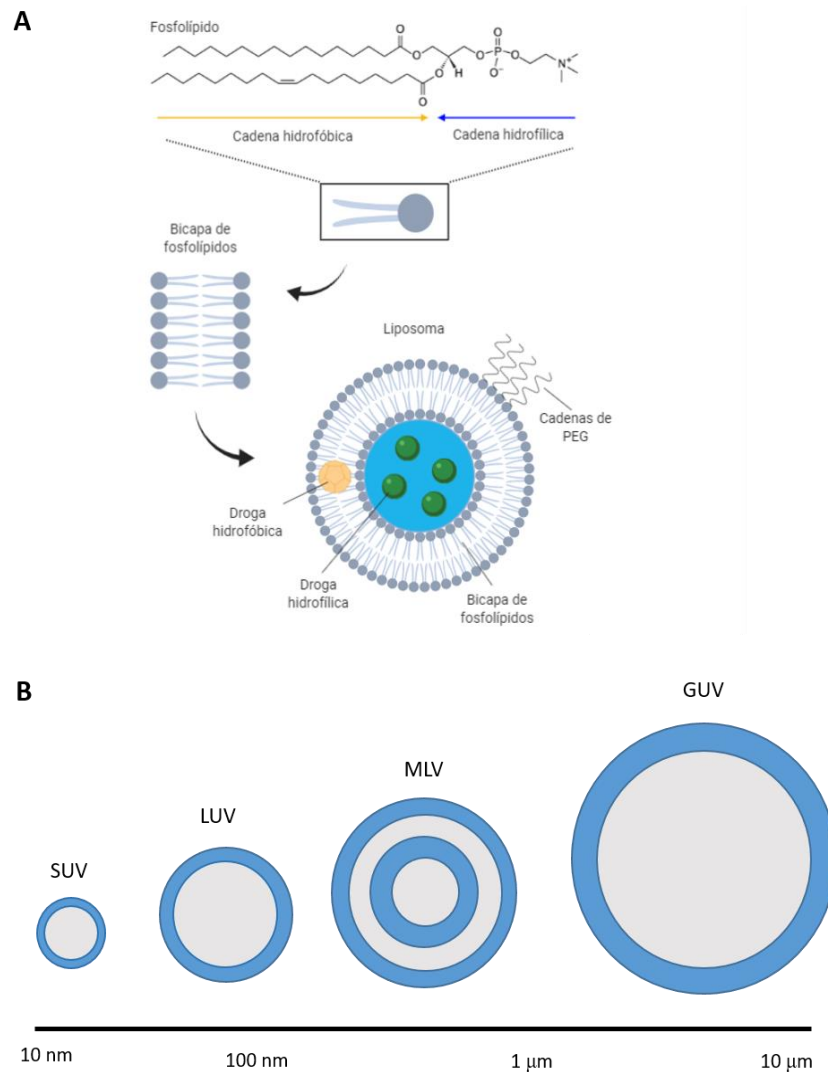


Figura 2: fosfolípidos y liposomas. Ilustración esquemática de la estructura del fosfolípido fosfatidilcolina, su auto-ensamblaje en forma de bicapa y su posterior transformación en liposoma unilamelar (A). En el esquema se presenta un liposoma que puede contener una droga hidrófila en su interior acuoso o una droga hidrófoba dentro de su bicapa de fosfolípidos, además de estar funcionalizado con polietilenglicol (PEG). En el panel B se muestra la clasificación de liposomas según tamaño y lamellaridad: pequeños unilamelares (SUV), grandes unilamelares (LUV), multilamelares (MLV) o gigantes unilamelares (GUV) (Deshpande et al., 2013; Nogueira et al., 2015; Pattni et al., 2015).

Algunas de las ventajas del uso de liposomas como DDS (Pattni et al., 2015; Sercombe et al., 2015):

- × Facilidad de preparación: se autoensamblan, por lo que no requieren síntesis química;
- × Biocompatibilidad: se preparan con materiales biodegradables, no tóxicos y que se asemejan a estructuras moleculares presentes en los organismos;
- × Versatilidad: se pueden modificar una amplia gama de propiedades fisicoquímicas y biofísicas para controlar sus características biológicas;
- × Alta capacidad de encapsulación: debido a su gran relación área superficial/volumen pueden incorporar grandes cantidades de fármacos.

Algunos de los efectos que se pueden lograr usando liposomas como DDS (Pattni et al., 2015; Sercombe et al., 2015):

- × Mejora de la solubilidad de los fármacos encapsulados;
- × Prevención de la degradación química y biológica de los agentes bajo condiciones de almacenamiento y durante la administración;
- × Reducción de los efectos secundarios inespecíficos y la toxicidad de medicamentos encapsulados, mejorando así su eficacia y índice terapéutico; direccionamiento a órganos, tejidos o células específicas.

Los liposomas pueden clasificarse de distintas formas, de acuerdo a su tamaño, lamellaridad, composición o forma de preparación. El tamaño y la lamellaridad va a depender principalmente del método de síntesis y homogeneización utilizados para su preparación. Por ejemplo, se pueden obtener vesículas multilamelares (MLV), con distribución heterogénea del tamaño, vesículas gigantes unilamelares (GUV), vesículas grandes unilamelares (LUV) o vesículas pequeñas unilamelares (SUV), con homogeneidad de tamaño (**Figura 2B**) (Nogueira et al., 2015; Pattni et al., 2015). Basados en su composición, los liposomas pueden ser convencionales (preparados a partir de lípidos sintéticos o naturales cargados neutral o negativamente, como la fosfatidilcolina [PC], la fosfatidilserina [PS], el fosfatidilglicerol [PG] o el colesterol [Chol], por ejemplo); pueden estar cargados positivamente (llamados catiónicos, muy utilizados para encapsulamiento de ácidos

nucleicos); pueden estar funcionalizados y responder a estímulos (pH, temperatura, campo magnético, etc.); pueden tener moléculas acopladas capaces de reconocer células específicas (anticuerpos monoclonales, péptidos, glicoproteínas, carbohidratos, entre otros); o pueden ser de larga circulación (STEALTH) (Immordino et al., 2006). Esto último se ha logrado con la inserción del polímero PEG en la superficie liposomal para estabilizarla estéricamente e inhibir la unión de proteínas del suero. Los liposomas STEALTH no son reconocidos por el SFM, lo que permite aumentar su tiempo de circulación en sangre (Allen et al., 1989).

La aplicación de liposomas en el campo de la medicina ofrece nuevas perspectivas para lograr tratamientos más efectivos en una vasta gama de condiciones patológicas. Los liposomas se han utilizado como *carriers* de fármacos incorporando una amplia variedad de compuestos terapéuticos y agentes de diagnóstico (Sercombe et al., 2015). Además, dada su biocompatibilidad y versatilidad, los liposomas se pueden utilizar como adyuvantes de vacunación, tanto profiláctica como terapéutica, ya sea mejorando la distribución de antígenos⁴ incorporados o activando respuestas inmunes específicas (Schwendener, 2014).

4.1.3 Targeting celular

El diseño racional de un DDS normalmente busca transportar un compuesto activo en un *carrier* nanoparticulado con la intención de aumentar su acumulación en un sitio específico del cuerpo que se encuentra enfermo (lo que se conoce como *targeting*⁵). Históricamente, se han descrito dos tipos de *targeting*, el activo y el pasivo, refiriendo a nanomedicinas que están equipadas con ligandos en su superficie (activo) o no (pasivo) (van der Meel et al., 2016). El *targeting* pasivo produce una distribución diferencial de las nanomedicinas en el organismo de

⁴ El término antígeno se usa para describir cualquier sustancia que el sistema inmunitario adaptativo puede reconocer y a la que puede responder (es decir que genera una respuesta inmune [es inmunogénico]). No solo proteínas, glucoproteínas o ácidos nucleicos de patógenos sino también otras estructuras químicas como fármacos y metales (K. Murphy & Weavear, 2017).

⁵ *Target* se traduce al español como “blanco” o “diana”, pero la traducción así no es muy amena a la lectura, por lo que prefiero seguir escribiéndolo en inglés.

manera espontánea, que depende solo de las propiedades fisiopatológicas del tejido apuntado y de lograr que las nanomedicinas tengan un tiempo de circulación prolongado (Torchilin, 2011). El mecanismo de *targeting* pasivo más explotado es el que se produce por el efecto de permeabilidad y retención aumentada (EPR⁶) en la cercanía de células cancerígenas. El efecto EPR se basa en una mayor permeabilidad en el endotelio vascular (debido a fenestraciones de entre 200-2000 nm), y a una disminución en el drenaje linfático, que evita el recambio rápido del fluido intersticial en la zona tumoral (Bertrand et al., 2014). De este fenómeno de acumulación diferencial en el tejido tumoral, hacen uso formulaciones como Doxil®, logrando disminuir significativamente los efectos adversos de la doxorubicina libre para el tratamiento de tumores sólidos, como sarcoma de Kaposi (A. A. Gabizon, 2001). El *targeting* activo (o *targeting* mediado por ligandos) se basa en la incorporación de ligandos de afinidad en la superficie de las NPs. Potencialmente, cuando las NPs se encuentran con una célula que expresa en su superficie un receptor al que el ligando es afín, quedan retenidas y son internalizadas. De esta forma, las NPs tenderían a acumularse en las células que expresan el receptor correspondiente (Kunjachan et al., 2014). Aunque, en teoría, esto puede mejorar el *targeting* de las NPs y la actividad terapéutica, se cree que, en el caso de muchas patologías, el *targeting* activo está sujeto a la misma localización fisiológica que las NPs sin ligandos y, por lo tanto, tiene un perfil de distribución y acumulación similar. Sin embargo, el *targeting* activo puede ofrecer ventajas en términos de captura celular una vez que la NP llega al tejido apuntado (van der Meel et al., 2016). A tal fin, los ligandos se seleccionan para unirse a moléculas de superficie o receptores sobre-expresados en órganos, tejidos, células o dominios subcelulares enfermos (Bertrand et al., 2014). Una estrategia clásica de *targeting* activo es la incorporación en liposomas de moléculas de folato adosadas a los fosfolípidos, para realizar un *delivery* de agentes quimioterapéuticos a células tumorales que típicamente sobre-expresan el receptor de folato (A. Gabizon et al., 2004). A pesar de que un gran número de NPs sin ligandos han pasado pruebas clínicas o está en fases clínicas

⁶ EPR: *enhanced permeation and retention*

de desarrollo, hay muy pocas NPs con ligandos que han progresado en este sentido (Allen & Cullis, 2013). La mayoría son NPs basadas en lípidos que incorporan ligandos afines al receptor de transferrina (RTf, sobre-expresado en un rango amplio de células tumorales), como la proteína transferrina o fragmentos de anticuerpos anti-RTf (van der Meel et al., 2016). El progreso lento hacia ensayos clínicos de las NPs con ligandos, comparados con las moléculas terapéuticas tradicionales o liposomas para targeting pasivo, está relacionado con los costos altos de desarrollo (fabricación, obtención de anticuerpos, controles de calidad y propiedad intelectual) (Lammers et al., 2012). En este contexto cobran relevancia aquellas estrategias de manufactura que priorizan la sencillez estructural con ligandos superficiales que carezcan de la complejidad estructural de una proteína.

Uno de los mayores desafíos que tiene el *delivery* con NPs es cómo lograr administrar agentes terapéuticos para llegar a sitios dentro de las células (específicamente a moléculas intracelulares). Para lograr esto, el fármaco transportado, una vez que ha alcanzado a la célula en cuestión debe atravesar eficientemente la barrera de su membrana plasmática. Es esencial, por lo tanto, conocer el o los mecanismos mediante los cuales el material nanoparticulado ingresa a la célula.

4.1.4 Mecanismos de internalización de NP

Como primer punto, hay que señalar que la membrana celular es impermeable a macromoléculas con masa mayor de 1 kDa (una proteína como la hemoglobina, por ejemplo, tiene una masa molecular de 64 000 g/mol, es decir, 64 kDa). Sin embargo, las células poseen una variedad de mecanismos de internalización activa que permiten ingresar material micro y nanoparticulado a su interior (Bareford & Swaan, 2007). Todos ellos involucran la formación de vesículas intracelulares a partir de la invaginación de la membrana plasmática (Iversen et al., 2011). Aunque hay distintas variantes, este proceso, por el cual el material que está en el medio externo de una célula interacciona con su membrana plasmática e ingresa a su interior, es denominado de manera general como **endocitosis** (Sahay et al., 2010). La

endocitosis es la principal vía de transporte de las NPs a través de la membrana celular y es clasificada en fagocitosis y pinocitosis (Kou et al., 2013) (**Figura 3**).

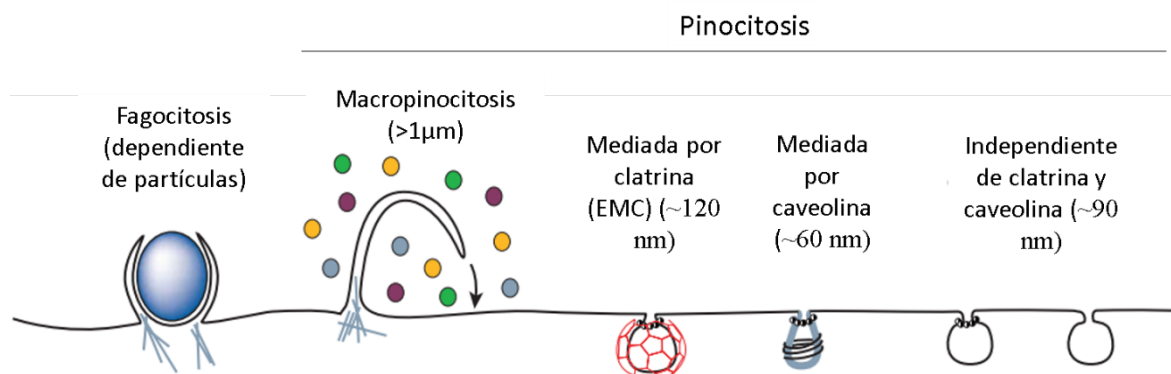


Figura 3: vías de entrada de macromoléculas a las células. La fagocitosis está típicamente restringida a células especializadas del sistema inmune, mientras que la pinocitosis ocurre en todas las células por al menos cuatro mecanismos diferentes: macropinocitosis, endocitosis mediada por clatrina (EMC), endocitosis mediada por caveolina y endocitosis independiente de clatrina y caveolina. Las vías endocíticas difieren con respecto al tamaño de la vesícula endocítica, la naturaleza de la carga (ligandos, receptores y lípidos) y el mecanismo de formación de vesículas. Esquema tomado de (Conner & Schmid, 2003).

La fagocitosis es utilizada principalmente por células del sistema inmune innato. La pinocitosis es llevada a cabo por todos los tipos celulares y se subdivide (según una gran mayoría de autores) en endocitosis mediada por clatrina (EMC), endocitosis mediada por caveolina, endocitosis independiente de clatrina/caveolina y macropinocitosis (Yameen et al., 2014). Y, asimismo, dentro de los independientes de clatrina/caveolina se encuentran los mecanismos dependientes y los independientes de dinamina. Vale la pena resaltar que, históricamente, la más estudiada ha sido la EMC, y los trabajos realizados sobre los demás mecanismos han arrojado conclusiones que revelan un conocimiento realmente limitado sobre la endocitosis en general (Iversen et al., 2011).

En fin, lo que es seguro es que el mecanismo endocítico involucrado en la captura del material particulado depende del tamaño, geometría y superficie del mismo, y es el que definirá también su posterior tráfico y localización final intracelular (S. Zhang et al., 2015). El destino del material endocitado, por lo tanto, dependerá de la vía endocítica utilizada por la célula.

La fagocitosis es un mecanismo de ingesta de partículas de más de 500 nm, dependiente de receptores de membrana presentes principalmente en células fagocíticas profesionales, que capturan partículas extrañas, células apoptóticas y microorganismos infecciosos como parte de la respuesta inmune innata y adaptativa y para mantener la homeostasis (Flannagan et al., 2012). Los receptores de estas células organizan el avance de la membrana plasmática y el citoesqueleto de actina alrededor de las partículas, formando compartimentos unidos a la membrana intracelular llamados fagosomas (Swanson, 2008). Luego los fagosomas se fusionan con los lisosomas, donde las partículas contenidas serán destruidas por acidificación y lisis enzimática. Teniendo en cuenta esto último, si se quiere mantener la integridad de una NP y su carga, será necesario evitar el paso final de destrucción lisosomal asociada a este mecanismo de internalización (Kou et al., 2013).

La macropinocitosis, por su parte, es un mecanismo endocítico también mediado por actina, pero en el cual las células internalizan un fluido o solutos extracelulares a través de vesículas grandes (diámetro de 0,2-10 μm) conocidas como macropinosomas (Swanson, 2008), que se generan normalmente en regiones muy rizadas de la membrana plasmática (Doherty & McMahon, 2009). A diferencia de la fagocitosis, no necesita de unión a receptores de membrana, sino que ocurre habitualmente en respuesta a factores de estimulación (Lim & Gleeson, 2011) y generalmente es la vía por la cual se internalizan partículas de tamaño micrométrico (Yameen et al., 2014). Una vez formado, el macropinosoma lleva adelante un proceso de maduración, que no es común para todos los tipos celulares. Su contenido puede ser degradado en el endosoma/lisosoma tardío o reciclado de nuevo en la membrana plasmática (Lim & Gleeson, 2011).

La EMC es el mecanismo principal para la internalización de macromoléculas y constituyentes de la membrana plasmática en la mayoría de los tipos celulares (Bareford & Swaan, 2007). En la EMC, la unión de un ligando con su correspondiente receptor de membrana desencadena la formación de un entramado poliédrico de clatrina en la superficie citosólica de la membrana celular, lo que ayuda

a deformar la membrana en una invaginación de ~150 nm que luego se fusionará generando vesículas recubiertas de clatrina. La vesícula resultante tendrá un diámetro de 100-120 nm; que al cabo de 5 a 10 minutos se fusionará con endosomas y finalmente con lisosomas entrando en una ruta de degradación (Sahay et al., 2010; Yameen et al., 2014). La endocitosis dependiente de caveolina implica el ensamblaje de capas de caveolina en horquilla en el lado citosólico de la membrana plasmática, formando una estructura en forma de matraz de ~50-80 nm de diámetro (llamadas caveolas) (S. Zhang et al., 2015). Las vesículas recubiertas de caveolina se mueven a través del citoplasma, luego la carga vesicular se transfiere a orgánulos tubulares más complejos (caveosomas) y desde este punto, los contenidos se entregan a compartimentos subcelulares (no lisosomales), como retículo endoplásmico, aparato de Golgi o mitocondrias, escapando así a la ruta degradativa (Bareford & Swaan, 2007). En comparación con la EMC, este mecanismo es más lento y está mediado por vesículas más pequeñas (Kou et al., 2013). Es importante destacar que hay autores que sugieren que los caveosomas son, en realidad, artefactos que se forman específicamente en células que sobre-expresan diferentes construcciones de caveolina-1, y que las caveolas que se desprenden se fusionan con los endosomas acidificados normales, pudiendo transferir material a los lisosomas (Hayer et al., 2010; Scita & Di Fiore, 2010). Esto es particularmente importante ya que la endocitosis de NPs mediada por caveolas (que se transfieren a caveosomas) ha sido normalmente considerada como una ruta que puede evitar la degradación lisosomal de las partículas y parece no ser exclusivamente así (Iversen et al., 2011). Un resumen de las vías de internalización de partículas más estudiadas se muestra en la **Figura 4**.

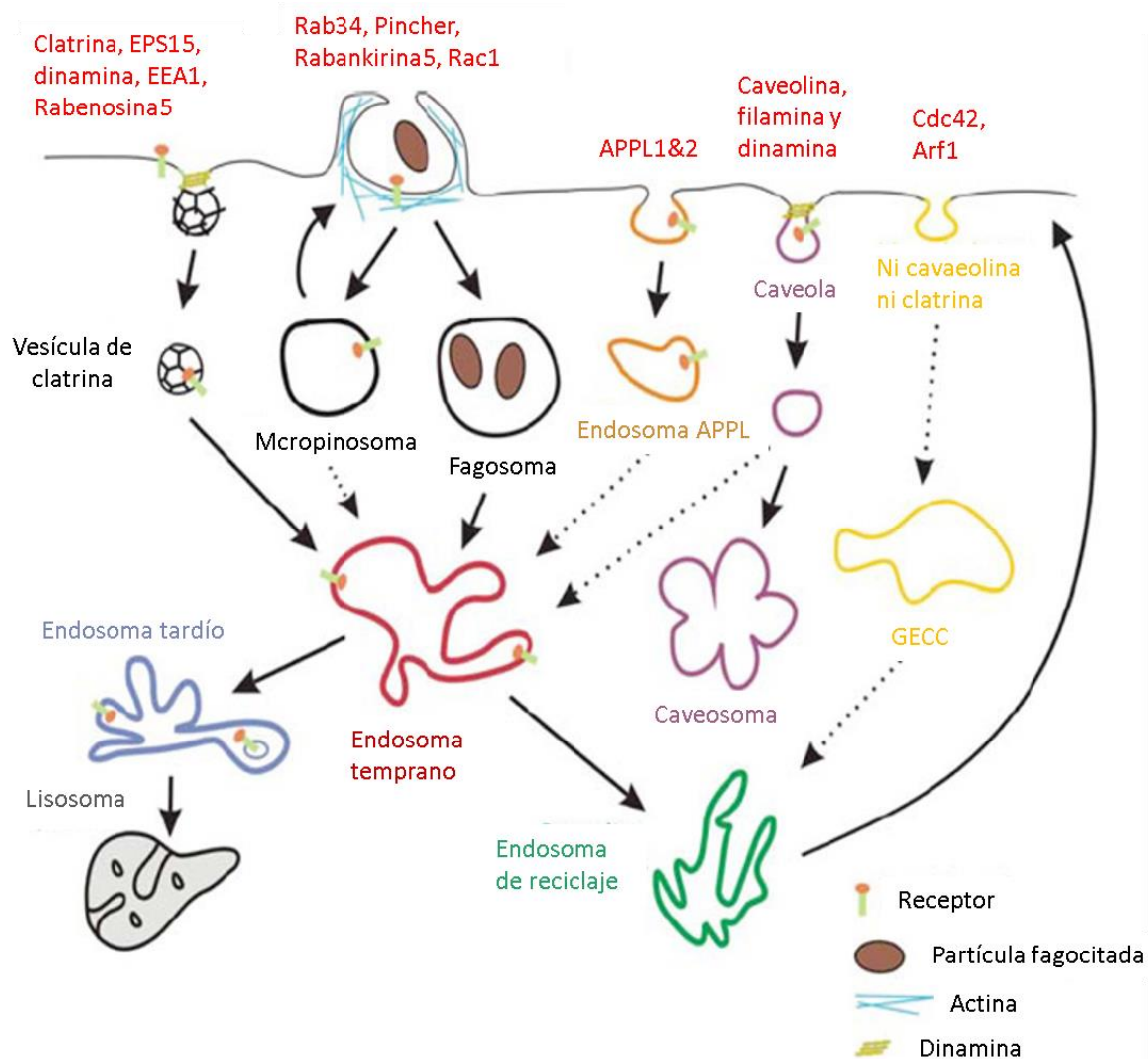


Figura 4: vías de internalización de macromoléculas y subsecuente procesamiento. En esta figura están esquematizadas las principales vías de internalización celular y las proteínas involucradas en cada una de ellas. Después de la unión del ligando, los complejos ligando/receptor pueden internalizarse a través de macropinocitosis, endocitosis mediada por clatrina, caveolina o por vías independientes de clatrina y caveolina u otras proteínas (APPL, por ejemplo). La partícula que ingresa a través de cada ruta endocítica se puede transportar a una serie de compartimentos intracelulares, como los endosomas tempranos, desde donde se puede reciclar a la superficie celular (a través del endosoma de reciclaje) o dirigirse a compartimentos degradativos (endosoma tardío-lisosoma), lo que afecta el resultado de la señalización. Modificado a partir de (Forth Institute of Molecular Biology & Biotechnology, s. f.).

Teniendo en mente todo lo anterior, una de las ventajas más importantes que provee el *targeting* activo es que favorece la endocitosis mediada por receptor, tanto de la NP como de su contenido, permitiendo su ingreso en el interior celular. Como la entrada a la célula se hace comúnmente mediante el sistema vesicular endo-lisosomal, esta estrategia solo será válida si la molécula terapéutica es capaz de

sobrevivir (o escapar) al entorno ácido y rico en enzimas de los endosomas y lisosomas (Allen & Cullis, 2013).

4.2 Respuesta inmune

4.2.1 Biología del sistema inmunitario

El rol del sistema de defensa de un organismo (sistema inmune, inmunitario o inmunológico), dice Kennedy, es simplemente difícil: eliminar agentes patogénicos⁷. Para llevar a cabo esa ardua tarea, el sistema inmune hace uso de dos componentes, o brazos de defensa: el innato (o no específico) y el adaptativo (o específico). Los componentes inespecíficos del sistema actúan sin un reconocimiento preciso del patógeno, mientras que los otros tienen una especificidad exquisita. Y, aunque son distintos, estos dos brazos interactúan a muchos niveles, y los numerosos elementos del sistema están intrincadamente interrelacionados (Kennedy, 2010). Ambos funcionan de manera integrada. El sistema inmune innato activa al sistema inmune adaptativo en respuesta a las infecciones; mientras que el sistema inmune adaptativo utiliza los mecanismos efectores de la inmunidad innata para eliminar a los microorganismos invasores (Toche, 2012).

A continuación, señalo las características básicas de ambos componentes.

Sistema inmune innato	Sistema inmune adaptativo
Primera línea de defensa	Inmunidad duradera
Respuesta rápida	Respuesta tardía
Especificidad limitada	Alta especificidad
Presente en todos los organismos multicelulares	Presente en vertebrados y peces cartilaginosos

⁷ Existen cuatro amplias categorías de microorganismos causantes de enfermedades, patógenos o agentes patogénicos: virus; bacterias y arqueobacterias; hongos; y los organismos eucariotas unicelulares y multicelulares llamados colectivamente parásitos (K. Murphy & Weavear, 2017).

Las **respuestas innatas** forman la primera línea de defensa ante una infección, no son específicas para un patógeno en particular y no requieren de un período de inducción prolongado. En primer lugar, se encuentran **las barreras anatómicas y químicas**. Los epitelios (la piel y los revestimientos de las estructuras tubulares del cuerpo - el tracto respiratorio, urogenital y gastrointestinal) imponen una barrera física y química entre el medio interno y el mundo externo que contiene patógenos. Física porque las células se encuentran adheridas entre ellas por uniones estrechas, que efectivamente forman un sello contra el ambiente externo. Y, además, el epitelio interno secreta una sustancia viscosa llamada mucus, que puede evitar el ingreso de microorganismos o expulsarlos. Pero también química, ya que los epitelios producen una amplia variedad de sustancias que son microbicidas o que inhiben el crecimiento microbiano (enzimas de la piel, lágrimas, sudor, saliva o gástricas, pH del estómago). Una infección comienza recién cuando un patógeno rompe una de las barreras anatómicas del hospedador y entonces algunos mecanismos inmunológicos innatos empiezan a actuar inmediatamente (K. Murphy & Weavear, 2017).

Lo primero que se encuentra un patógeno una vez que ha atravesado las barreras epiteliales es otro componente importante de la inmunidad innata conocido como **sistema de complemento**, o complemento. Consiste en un conjunto de más de 30 proteínas presentes en el plasma sanguíneo y otros fluidos corporales, que se activa a partir de la identificación de la superficie del patógeno. Conduce a la generación de potentes mediadores pro-inflamatorios (anafilotoxinas), opsonización y lisis dirigida de la superficie patogénica (a través del ensamblaje de poros penetrantes de membrana conocidos como el complejo de ataque de membrana) (Dunkelberger & Song, 2010). La opsonización se refiere a recubrir un patógeno con proteínas del complemento (opsoninas) para que pueda ser más fácilmente absorbido y destruido por las células fagocitarias, que son el tercer componente del sistema innato (K. Murphy & Weavear, 2017).

Las **células fagocíticas** (células fagocitarias o fagocitos) son los otros componentes del sistema innato, y se encargan de reconocer patógenos, fagocitarlos y posteriormente destruirlos en el interior celular (como verán aquí se conecta lo que expliqué en la sección anterior sobre la fagocitosis y los fagosomas). Las células fagocitarias se encuentran debajo de las barreras epiteliales y están listas para engullir y digerir los microorganismos invasores que han sido marcados por el complemento para su destrucción. Estos fagocitos también inician la siguiente fase de la respuesta inmunológica innata, induciendo una respuesta inflamatoria que recluta nuevas células fagocitarias y moléculas efectoras circulantes al lugar de la infección (K. Murphy & Weavear, 2017). Esta línea de defensa depende exclusivamente de receptores celulares que reconocen características que son comunes para muchos microorganismos, y que se distinguen de los componentes internos del hospedador. Los macrófagos son la familia más importante de células fagocíticas. Maduran de modo continuo a partir de monocitos que circulan en la sangre y emigran para residir en casi todos los tejidos del cuerpo. No solo matan organismos invasores, sino que también ayudan a inducir inflamación mediante la secreción de citoquinas y quimiocinas⁸. Los neutrófilos (o polimorfonucleares), la segunda familia más importante de fagocitos, tienen una vida breve y abundan en la sangre, pero no en tejidos sanos normales. Cumplen una función clave en la inmunidad innata porque pueden reconocer, ingerir y destruir muchos patógenos sin la ayuda de una respuesta inmunitaria adaptativa (K. Murphy & Weavear, 2017). Posterior a la fagocitosis del microorganismo invasor, los neutrófilos llevan a cabo su destrucción mediante sus gránulos que contienen enzimas presentes en los lisosomas y fagolisosomas (Toche, 2012).

⁸ Las citoquinas (o citocinas) y quimiocinas son proteínas secretadas por las células inmunes en respuesta a microorganismos o antígenos, con funciones de crecimiento, diferenciación y activación celular, que regulan y determinan la naturaleza de las respuestas inmunes. Ejemplos de citoquinas son las interleuquinas (IL) y los interferones (IFN).

Los macrófagos, junto con las células dendríticas (CDs) componen los principales grupos de células presentadoras de antígeno (CPA). Tienen la capacidad de presentar antígenos procesados a linfocitos T (LT) inmaduros y activarlos por primera vez, formando un enlace crucial entre la respuesta inmune innata y la adaptativa (K. Murphy & Weavear, 2017). Las CDs se originan en la médula ósea y migran por la sangre a todos los tejidos del cuerpo y en forma directa a órganos linfáticos periféricos. Se conocen dos grandes clases: las CDs convencionales, que participan en forma más directa en la presentación de antígeno y activación de células T indiferenciadas; y las CDs plasmacitoides (pCD), que responden particularmente a infecciones virales y producen grandes cantidades de IFNs y citoquinas pro-inflamatorias, pero no parecen ser tan importantes a la hora de activar células T indiferenciadas. Las CDs comparten con los macrófagos la capacidad de reconocer e ingerir patógenos mediante receptores de patrones de patógenos y son muy activas en la captación de antígenos por fagocitosis (K. Murphy & Weavear, 2017). Otro tipo de células del componente innato son las células *Natural Killer* (NK), una subclase de linfocitos que circulan en la sangre y se encargan de controlar varios tipos de tumores e infecciones microbianas al limitar su propagación y el posterior daño tisular. Las NK son también células reguladoras, involucradas en interacciones recíprocas con CDs, macrófagos, LT, linfocitos B (LB) y células endoteliales (Vivier et al., 2008). Producen grandes cantidades de IFN gamma (INF- γ), que potencian la función fagocítica de los macrófagos (Natarajan et al., 2002), y ejercen su mecanismo de muerte en células infectadas o tumorales mediante la secreción de gránulos citotóxicos de granzimas y perforinas (K. Murphy & Weavear, 2017). Las otras células que forman parte del sistema inmune innato son los mastocitos, los eosinófilos y los basófilos. Estas son células efectoras especializadas que desempeñan un papel fundamental en la defensa contra los parásitos y en las reacciones alérgicas inflamatorias. Sin embargo, también son fundamentales en otras respuestas inmunológicas innatas y adaptativas, gracias a su interacción con otras células del sistema inmunológico (Rigoni et al., 2018).

En todo este complejo entramado celular, las citoquinas y quimiocinas secretadas en respuesta a estímulos extracelulares producen respuestas inmediatas en las

células a las que afectan, uniéndose a receptores específicos (ya sea de manera autocrina, paracrina o endocrina)⁹. Influyen de manera diversa sobre la conducta celular y tienen funciones clave en el control del crecimiento, del desarrollo, de la diferenciación funcional y de la activación de leucocitos¹⁰ (K. Murphy & Weavear, 2017).

Las **respuestas adaptativas** solo están presentes en vertebrados y peces cartilaginosos y se basan en la expansión de muchos clones de células efectoras antígeno-específicas (Dempsey et al., 2003). Es decir, son altamente específicas para el patógeno particular que las indujo y pueden también proporcionar protección duradera. Las células involucradas en el componente adaptativo son los linfocitos. Hay dos clases de este tipo de respuestas: las mediadas por anticuerpos (humorales) y las mediadas por células (celulares), y son llevadas a cabo por LB y LT, respectivamente (Toche, 2012).

La **inmunidad humoral** constituye el principal mecanismo de defensa frente a infecciones bacterianas. En este tipo de respuestas, los LB que residen y circulan en los ganglios linfáticos y en el bazo se activan al encontrar un antígeno, para secretar anticuerpos. Los anticuerpos o inmunoglobulinas (Igs) son proteínas que poseen una región constante, que determina su clase (G, A, M, D y E) y funciones biológicas, y una región variable de unión al antígeno (Abbas et al., 2016). Las Igs circulan en el torrente sanguíneo y penetran los otros fluidos corporales, donde se unen específicamente al antígeno extraño que ha estimulado su producción, valiéndose de la región variable. La unión del anticuerpo inactiva a los virus y a las toxinas microbianas al bloquear su capacidad de unirse a los receptores en las células hospedadoras y también marca la destrucción de los patógenos invasores, principalmente al facilitar que las células fagocíticas del sistema inmune innato los ingieran (K. Murphy & Weavear, 2017). Un LB activado se torna posteriormente en

⁹ Autocrina: efecto sobre la misma célula que libera la citoquina; paracrina: las citoquinas afectan la conducta de células adyacentes; endocrina: algunas citoquinas afectan la conducta de células distantes, aunque esto depende de su vida media en sangre (K. Murphy & Weavear, 2017).

¹⁰ El concepto “leucocitos” o glóbulos blancos, incluye a diversas células sanguíneas: neutrófilos, eosinófilos, basófilos, monocitos y linfocitos.

una CPA, que presenta el antígeno a su LT *helper* (LTh) específico, quien secreta citoquinas. La presencia de moléculas coestimuladoras como el ligando CD40, así como la secreción de citoquinas inducen un cambio de isotipo en el LB. Este cambio de clase o isotipo depende del tipo de citoquina secretada por el linfocito. Los LTh de tipo 2 (Th2) secretan IL-4 que induce secreción por parte del LB de IgE y los LTh de tipo 1 (Th1) secretan INF- γ e IL-12 que inducen secreción de IgG (Toche, 2012).

La **inmunidad celular** constituye el principal mecanismo de defensa contra microorganismos intracelulares (virus y algunos parásitos, por ejemplo) promoviendo la destrucción de éstos por células fagocíticas o eliminando las propias células infectadas. Los LT se dividen en dos subpoblaciones principales: LT CD4+ (o *helper*, LTh), cuya principal función es la secreción de citoquinas, y LT CD8+ (o citotóxicos, LTc), que eliminan células infectadas y tumorales (Toche, 2012). En las respuestas celulares, los LT no activados (*naïve* o vírgenes) que circulan en los ganglios linfáticos reaccionan directamente contra un antígeno extraño que se les presenta en la superficie de una CPA, lo reconocen a través de su receptor (TCR) y son activados, proliferando y diferenciándose a LT efectores y de memoria (Abbas et al., 2016). Los LT efectores son los que migran hacia los sitios de infección o inflamación encontrando el antígeno para el cual son específicos. Allí, la subpoblación de LTh secreta citoquinas que activan a los macrófagos para eliminar microorganismos fagocitados e inducen al LB a diferenciarse y secretar anticuerpos que se unen a los antígenos. Por su parte, los LTc efectores antígeno-específicos (también activados por las citoquinas secretadas por LTh) matan a las células infectadas (Toche, 2012). Existen distintos subgrupos de LT CD4+, que pueden distinguirse de acuerdo con su capacidad de secretar patrones determinados de citoquinas, generando respuestas inmunes diferenciales frente a distintos tipos de antígenos (O'Garra et al., 1998). Los subgrupos principales son los Th1 y Th2, de los cuales ya dimos un primer pantallazo más arriba. Ambos provienen de un linaje común de LT CD4+ que se diferencian hacia Th1 en presencia de IL-12, amplificados por IFN gamma (INF- γ) y hacia Th2 en presencia de IL-4 (Abbas et al., 2016). La diferenciación de LT CD4+ hacia linfocitos Th1 es estimulada por bacterias intracelulares, virus y algunos parásitos. Los linfocitos Th1 secretan INF-

y, factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) e IL-2. El INF- γ activa a los macrófagos e incrementa la secreción de IL-12, la fagocitosis y eliminación de microorganismos, y también estimula a los LB a secretar IgG, que actúa opsonizando los microorganismos tornando más eficiente la fagocitosis (Toche, 2012). La diferenciación de LT CD4⁺ hacia linfocitos Th2 es estimulada por la presencia de alérgenos y helmintos, que inducen la secreción de IL-4. Estos linfocitos secretan IL-4 e IL-13, que induce el cambio de clase en el LB hacia la producción de anticuerpos de tipo IgE (que media la inmunidad anti-helmintos y contrarresta las reacciones alérgicas), y también IL-5, que induce la activación de eosinófilos y mastocitos, células que también pueden producir elevados niveles de IgE (Romagnani, 1994). Asimismo, la producción de factores de diferenciación y crecimiento de células B por linfocitos Th2 puede explicar en parte por qué ciertas respuestas inmunes son predominantemente humorales, mientras que las reacciones de hipersensibilidad retardada, asociadas a respuestas celulares, son fácilmente atribuibles a las células Th1 (Mosmann & Coffman, 1989). La capacidad de las citoquinas para estimular diferentes mecanismos efectores y, por lo tanto, respuestas inmunes diferenciales, se ve también reforzada por la producción de citoquinas por cada subgrupo, que van regulando de forma cruzada la función y el desarrollo de cada uno (O'Garra & Murphy, 1994). Por ejemplo, el IFN- γ producido por las células Th1 inhibe el desarrollo de las células Th2 (Fitch et al., 1993) y las respuestas humorales, mientras que la producción de IL-4 e IL-10 por las células Th2 inhibe el desarrollo de Th1, así como la activación de macrófagos y la actividad bactericida (Sher & Coffman, 1992). Finalmente, otro subgrupo de linfocitos descritos más recientemente es el de Th17, siendo el factor de crecimiento transformante beta (TGF- β) y la IL-6 los responsables de su diferenciación a partir de LT vírgenes (Veldhoen et al., 2006). La diferenciación de los Th17 está caracterizada por la secreción de IL-17, la cual gatilla efectos pro-inflamatorios tisulares y reclutamiento de neutrófilos, cuyo rol fisiológico está relacionado con la defensa contra algunos microorganismos (como *Klebsiella pneumoniae*, *Borrelia burgdorferi* y *Candida albicans*), aunque se ha postulado que los Th17 también jugarían un rol importante en el desarrollo de enfermedades autoinmunes

(esclerosis múltiple, artritis reumatoide y psoriasis, entre otras) (Jäger & Kuchroo, 2010; Stockinger & Veldhoen, 2007).

En la **Figura 5** se muestra un esquema resumido con los dos brazos de combate del sistema inmune.

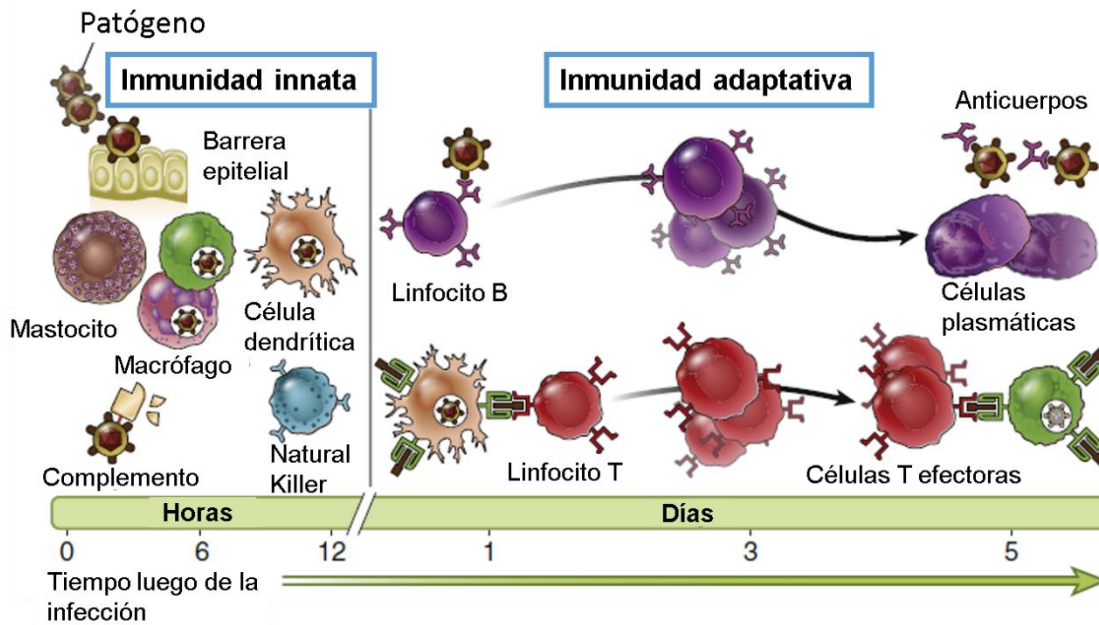


Figura 5: mecanismos principales de la respuesta inmune innata y adaptativa. La inmunidad innata proporciona los primeros mecanismos de defensa contra las infecciones. Algunos de ellos, como las barreras epiteliales, previenen las infecciones, y otros, como los macrófagos, las células Natural Killers y el sistema del complemento, los eliminan. Los mecanismos inmunes adaptativos tardan más en desarrollarse y están mediados por los linfocitos y sus productos. Los anticuerpos producidos por linfocitos B activados (o células plasmáticas) bloquean las infecciones y eliminan a los patógenos, mientras que los linfocitos T erradican a los microbios intracelulares. Esta cinética es una aproximación y puede variar en diferentes infecciones. Imagen adaptada de (Abbas et al., 2016).

Como se puede observar, las citoquinas cumplen un rol esencial en el sistema, ya que participan prácticamente en todas las facetas de la inmunidad e inflamación, incluida la inmunidad innata, la presentación de antígenos, la diferenciación en la médula ósea, el reclutamiento y la activación celular y la expresión de las moléculas de adhesión. El tipo de citoquinas que se producen en respuesta a una infección determinará inicialmente si se desarrolla (o no) una respuesta inmune y, posteriormente, qué tipo de respuesta será y, por consiguiente, qué tipo de células se verán involucradas (Borish & Steinke, 2003).

4.2.2 Receptores de reconocimiento de patrones

Todas las células que se encuadran dentro del sistema inmune innato comparten la característica de tener receptores invariables. Estos son llamados **receptores de reconocimiento de patrones** (PRRs) y, como su nombre lo indica, reconocen patrones comunes de muchos microorganismos, que se conocen como patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs) (K. Murphy & Weavear, 2017). Los PAMPs son, en realidad, estructuras moleculares (lípidos, carbohidratos, ácidos nucleicos o proteínas) presentes específicamente en patógenos (es decir, no se encuentran en las células hospedadoras y, por lo tanto, son considerados como "no propias"). Son estructuras generalmente esenciales para su viabilidad y, conservadas evolutivamente y, por lo tanto, menos sujetas a cambios que harían más difícil su reconocimiento por parte de las células inmunitarias (Zaru, 2019). Al ser reconocidos, los PAMPs inducen la expresión de un conjunto de señales endógenas en la forma de citoquinas inflamatorias y efectoras y quimiocinas, que controlan el reclutamiento de linfocitos a los sitios de infección y regulan la activación de mecanismos efectores apropiados (Medzhitov & Janeway, 1998). Los PRRs son un elemento clave del sistema inmune innato. Se expresan principalmente en CDs y macrófagos, pero también se encuentran en otras células inmunes y no inmunes (Zaru, 2019). Los PRRs pueden localizarse en la superficie celular, en compartimentos intracelulares, en el citoplasma o incluso secretados en el torrente sanguíneo y en fluidos tisulares. Las funciones principales de estos receptores incluyen: opsonización, activación de las cascadas de complemento y coagulación, fagocitosis, activación de vías de señalización pro-inflamatorias e inducción de apoptosis (Janeway & Medzhitov, 2002). Hay varios subgrupos y se pueden ordenar según su especificidad de ligando, función, localización y/o relaciones evolutivas. Los PRRs que se unen a membranas incluyen las familias de receptores tipo Toll (TLRs) y de receptores de lectina de tipo C (CLRs), así como también al supergrupo de receptores *scavenger* (RS). Los PRRs citoplasmáticos incluyen las familias de receptores de tipo NOD (*dominio de oligomerización por unión de nucleótidos*) (NLRs) y de receptores de tipo RIG-I (*genes inducibles por ácido retinoico*) (RLRs) (Janeway & Medzhitov, 2002).

A continuación, hago una breve reseña sobre los TLRs y los RS, que servirá como puntapié inicial para comprender el diseño racional del trabajo desarrollado durante los años de esta tesis.

4.2.2.1 *Receptores tipo Toll (TLRs)*

El grupo de TLRs es el más estudiado de todos los PRRs. El primero de estos receptores transmembrana fue identificado a principios de la década de 1980 en la mosca de la fruta, *Drosophila melanogaster*, y luego, en la década de 1990, en mamíferos (Medzhitov et al., 1997; Rock et al., 1998). Las investigaciones iniciales de los TLRs permitieron comprender su papel esencial en la protección contra los agentes infecciosos y la conexión entre la inmunidad innata y la inmunidad adaptativa (Aderem & Ulevitch, 2000; Shizuo Akira et al., 2001); sin embargo, se ha demostrado también que están críticamente implicados en diferentes procesos biológicos, como la autoinmunidad, el cáncer y la diabetes (Dasu et al., 2010; M. Fischer & Ehlers, 2008; Pradere et al., 2014). Los TLRs se pueden dividir en dos tipos: aquellos situados en la membrana plasmática (TLR1, 2, 5, 6 y 10), que detectan componentes de la membrana microbiana, y aquellos situados en endosomas (TLR3, 7, 8 y 9), que detectan los ácidos nucleicos microbianos. La única excepción es el TLR4, que puede encontrarse tanto en la membrana plasmática como en los endosomas (Gangloff, 2012). Estos diez TLRs se expresan en macrófagos humanos, y en ratones se encuentran además los TLR11, 12 y 13, ninguno de los cuales está representado en humanos (Pandey et al., 2015).

Respecto a los TLRs de superficie: el TLR2 forma complejos asociándose con el TLR1 y 6 y reconoce la más amplia gama de ligandos (glicolípidos como el ácido lipoteicoico de bacterias Gram-positivas, lipomanan de micobacterias y estructuras de anclaje tipo GPI de *Trypanosoma cruzi*, entre otros); el TLR4 se asocia con la proteína soluble MD-2 para reconocer LPS de bacterias Gram-negativas; el TLR5 reconoce la flagelina de bacterias Gram-negativas; y del TLR10 poco se sabe, todavía no se conocen sus ligandos, aunque su función es presumiblemente anti-inflamatoria (Oosting et al., 2014). Respecto a los TLRs endosomales: el TLR3 reconoce al ARN de doble cadena (ARNdc) formado durante la replicación de los

virus de ARN de cadena positiva (por ejemplo, herpes simplex, influenza y Nilo occidental); el TLR4 en su versión endosomal puede ser activado por glicoproteínas virales; los TLR7 y 8 reconocen ARN viral de simple cadena (ARNsc); y el TLR9 reconoce ADN bacteriano no metilado con repeticiones de motivos citosina-fosfato-guanina (CpG) (Jiménez-Dalmaroni et al., 2016).

En lo que refiere al rol en el sistema inmune, es sabido que el reconocimiento de PAMPs por parte de TLRs puede resultar en la activación de dos vías de señalización. Todos los TLRs comparten un dominio intracelular conocido como *receptor Toll/IL-1* (TIR), pero éste puede unirse a dos proteínas adaptadoras distintas para desencadenar las dos vías de señalización. La vía dependiente del adaptador de *respuesta primaria a diferenciación mieloide 88* (MyD88), es común a todos los TLRs salvo al 3. MyD88 activa moléculas intermediarias como TRAF (*factor asociado al receptor de TNF*) o IRAK (*quinasa asociada al receptor de IL-1*), ya sea por sí sola o en combinación con otras proteínas adaptadoras como TIRAP (*proteína adaptadora que contiene el dominio TIR*) o MAP (*adaptador similar a MyD88*), y conduce a la activación y translocación del *factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas* (NF- κ B) y del factor de transcripción *proteína activadora 1* (AP-1), dando lugar a la inducción de citoquinas pro-inflamatorias (por ejemplo, IL-6 y TNF- α). La vía independiente de MyD88 es dependiente de la proteína TRIF (*adaptador inductor de interferón- β que contiene el dominio TIR*) y es esencial para las respuestas de TLR3 y TLR4. TRIF puede asociarse (o no) con otro adaptador, TRAM (*molécula adaptadora relacionada con TRIF*), para conducir a la activación del *factor de transcripción regulador de interferón* (IRF)3 y de NF- κ B, desencadenando la producción de IFNs tipo I (principalmente IFN- α y β), haciendo uso, como MyD88, de factores como TRAF e IRAK. Asimismo, los TLR7/8 y 9 activan la vía dependiente de MyD88 de una manera alternativa, ya que, al mismo tiempo que inducen a NF- κ B y AP-1, también lo hacen con IRF7, provocando la producción de IFNs tipo I¹¹ y citoquinas pro-

¹¹ Basados en el tipo de receptor al cual se unen, los interferones han sido agrupados en tres clases. Tipo I: los mejor caracterizados son el IFN- α y el IFN- β (Saldana, 2019). Tipo II: el IFN- γ es el más

inflamatorias (Cell Signaling Technology Inc., 2014; Dowling & Mansell, 2016; Gay & Gangloff, 2007). En la **Figura 6** se muestra un resumen de lo descrito anteriormente.

El resultado generado por la unión de agonistas¹² a TLRs es de una concentrada expresión y secreción de citoquinas y quimiocinas pro-inflamatorias (IFNs, TNFs, IL-1, IL-6, IL-12) por parte de las células del sistema inmune innato; lo que es de vital importancia para conectar con la respuesta adaptativa. Los IFNs, por ejemplo, actúan induciendo resistencia a la replicación viral, mediante el aumento de la expresión de MHC I en células infectadas, la activación de células dendríticas y macrófagos y la activación de células NK encargadas de destruir de modo selectivo células infectadas (K. Murphy & Weavear, 2017). Los TNFs son potentes activadores de los neutrófilos, mediando la adherencia, la quimiotaxis, la degranulación y el brote respiratorio. También interactúan con las células endoteliales para inducir moléculas de adhesión, permitiendo así la salida de los granulocitos hacia los focos inflamatorios. Asimismo, inducen la inmunidad antitumoral a través de efectos citotóxicos directos sobre las células cancerosas y estimulando las respuestas inmunes antitumorales. Estas citoquinas comparten numerosas actividades biológicas con las IL-1 (la familia de IL-1 presenta cuatro péptidos: IL-1 α , IL-1 β , el receptor antagonista de IL-1 [IL-1ra], e IL-18), aunque a diferencia de los TNFs, las IL-1 tienen efectos directos sobre los linfocitos: activan los LT aumentando la producción de IL-2 y la expresión de los receptores de IL-2 y aumentan la proliferación de LB e incrementan la síntesis de inmunoglobulinas. La IL-6, además de producir activación de los linfocitos (induce crecimiento y maduración de LT y diferenciación de LB en células plasmáticas y secreción de anticuerpos), comparte varias actividades con la IL-1, entre ellas la inducción de pirexia y la producción de proteínas de fase aguda. Por último, la IL-12 activa e

importante. Tipo III: son los más recientemente descubiertos, también conocidos como IFN- λ s (Wack et al., 2015).

¹² Un agonista es una sustancia capaz de unirse a un receptor celular y provocar un efecto en la célula, similar al generado por una sustancia fisiológica. Aquí lo utilizaremos como sinónimo de ligando.

induce la proliferación, citotoxicidad y producción de citoquinas de las células NK, así como la proliferación de los LTh y los LTc (Borish & Steinke, 2003).

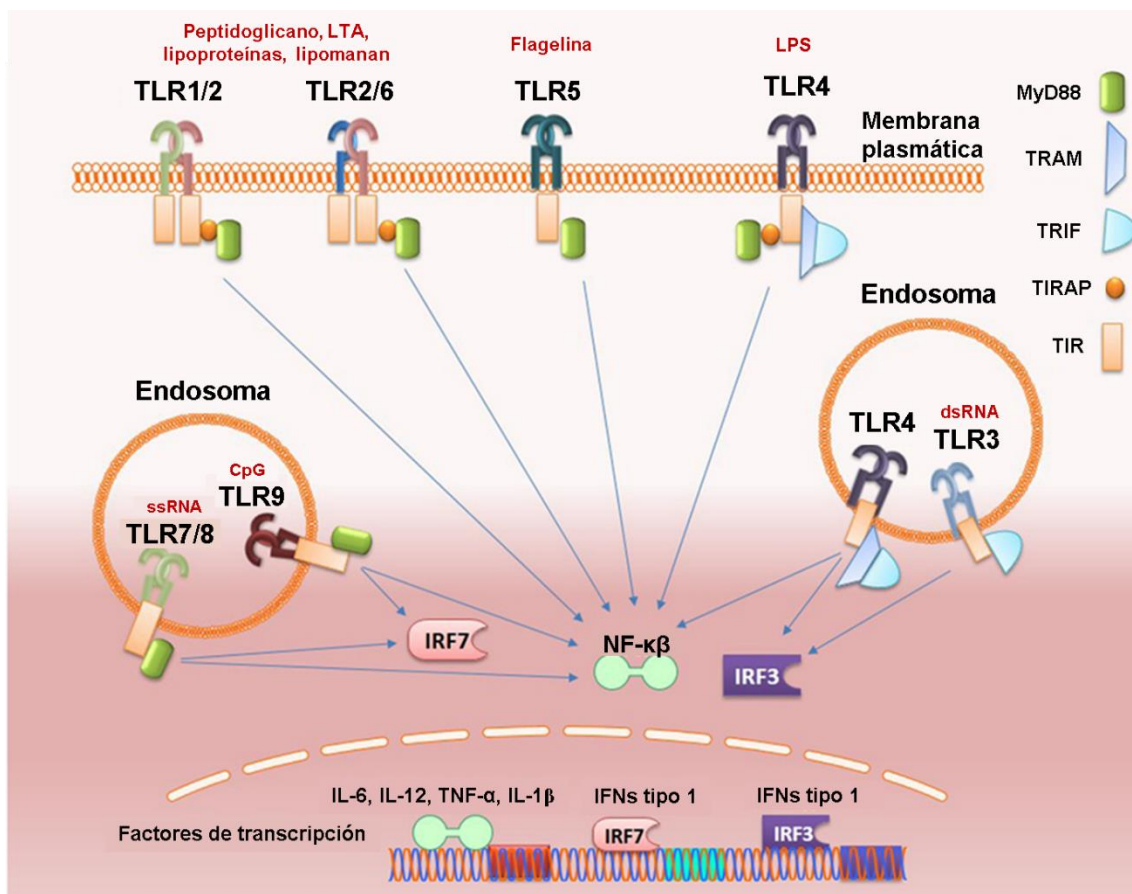


Figura 6: esquema resumido de las vías de señalización de TLRs. La activación de los TLRs puede proceder a través de la vía dependiente de MyD88 o dependiente de TRIF. La mayoría de los TLRs forman homodímeros al ser activados, mientras que el TLR2 también puede formar heterodímeros con TLR6 o 1. La unión de ligandos (señalados en rojo) culmina con la activación del factor de transcripción NF-κB y de factores reguladores de interferón (IRF), que inducen, respectivamente, la producción de citoquinas pro-inflamatorias y de IFNs de tipo 1. La activación de los TLRs endosomales 7 y 9 por medio de MyD88 activa al NF-κB y también al IRF7, que inducen, respectivamente, la producción de citoquinas pro-inflamatorias y de IFNs de tipo 1, mientras que la proteína adaptadora TRIF es reclutada por el TLR3 endosomal y el TLR4 que es endocitado al unirse al LPS. El TLR3 puede interactuar directamente con TRIF, mientras que la interacción TLR4-TRIF requiere a la molécula adaptadora TRAM y ambas activan al IRF3 que induce la producción de IFNs de tipo I. Esquema adaptado de (Zakeri & Russo, 2018). Para ver un esquema molecular más detallado y específico revisar la fuente (Cell Signaling Technology Inc., 2014).

4.2.2.2 Receptores scavenger (RS)

En segundo lugar, comentaré resumidamente sobre el supergrupo de RS, como fue llamado por (Zani et al., 2015). Éste comprende una amplia gama de proteínas integrales de membrana, cuya expresión está principalmente restringida a

macrófagos, CDs, células endoteliales seleccionadas y algunas otras células (Mukhopadhyay & Gordon, 2004). Existen 10 clases, nombradas A-J, y se las ha agrupado como un supergrupo (y no como una superfamilia) ya que tienen, entre ellas, poca o ninguna similitud de secuencia primaria (Zani et al., 2015). Los RS fueron identificados y descritos en los años '70 por Brown & Goldstein, como receptores en macrófagos encargados de internalizar y degradar lipoproteína de baja densidad oxidada, pero no nativa (Goldstein et al., 1979). La característica que une a este variado grupo de proteínas dentro del supergrupo RS es su capacidad para reconocer una gran variedad de ligandos comunes, entre los que se encuentran lipoproteínas modificadas, células apoptóticas, éster de colesterol, fosfolípidos, proteoglicanos, ferritina y carbohidratos (Zani et al., 2015). Es decir, los RS identifican y eliminan entidades no deseadas, a través del reconocimiento de moléculas propias modificadas o de moléculas no propias (PAMPs), y el mecanismo de internalización normalmente utilizado es la endocitosis simple, aunque en ciertos casos pueden estar implicados procesos de fagocitosis o macropinocitosis (Canton et al., 2013).

Dada su versatilidad funcional, los RS se ven involucrados tanto en el mantenimiento de la homeostasis como en la patogénesis de varias enfermedades; así como también tienen un rol central en las respuestas inmunes innatas (Canton et al., 2013; Zani et al., 2015). Entre sus funciones biológicas, los RS han sido relacionados con la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) en enfermedades cardiovasculares, con la promoción y regulación de la apoptosis, y con la regulación de respuestas pro-inflamatorias y la promoción de la angiogénesis en cáncer (Zani et al., 2015). El rol de los RS en la inmunidad innata ha sido descrito más ampliamente, relacionándose principalmente con el reconocimiento de ligandos exógenos, como lipopolisacárido (LPS) y ácido lipoteicoico (LTA) bacteriano, glicoproteínas virales, β -glicanos fúngicos y proteínas de parásitos (Mukhopadhyay & Gordon, 2004).

De todos los RS descritos, nuestro interés está particularmente puesto en el subtipo 1 de la clase A de RS (RS-A1). En esta clase se agrupan 5 miembros,

nombrados RS-A1, A3, A4, A5 y A6. Se ha demostrado que el RS-A1 es relativamente abundante en macrófagos, pero también se encuentra presente en células del músculo liso vascular y de tejidos endoteliales (Zani et al., 2015). Este receptor se une selectivamente a la región del lípido A del LPS, al LTA y a regiones CpG de ADN bacteriano (CpG-ADN) (Mukhopadhyay & Gordon, 2004) y también se ha descubierto que interactúa con el TLR4 para promover la fagocitosis de la bacteria Gram-negativa *Escherichia coli*, y con el TLR2 para la fagocitosis de la bacteria Gram-positiva *Staphylococcus aureus* (Amiel et al., 2009). Incluso, el RS-A1, al mediar la internalización de patógenos, mejora la respuesta inflamatoria mediada por el TLR3 endosomal (Mukhopadhyay et al., 2011). Una característica general de los RS es que interaccionan y pueden influenciar la señalización a través de otros PRRs, como los TLRs (Mukhopadhyay & Gordon, 2004).

4.3 Inmunoterapia, vacunas y adyuvantes de vacunación

4.3.1 Definiciones generales

De acuerdo con el Instituto Nacional del Cáncer de los Estados Unidos, “la **inmunoterapia** es un tipo de terapia biológica que utiliza sustancias para estimular o suprimir el sistema inmunitario para ayudar al cuerpo a combatir el cáncer, las infecciones y otras enfermedades” (National Cancer Institute - National Institutes of Health (NIH) - U.S. Government, s. f.). Los ingredientes activos de una inmunoterapia son inmunomoduladores, es decir, preparaciones, ya sea naturales, recombinantes o sintéticas, que tienen la capacidad de modificar la respuesta inmune.

La inmunoterapia puede ser activa o pasiva. La activa involucra el establecimiento de una respuesta inmune en el individuo para que éste pueda combatir una infección o, en el caso de un paciente con cáncer, las células tumorales. En la inmunoterapia pasiva (también llamada adoptiva), las moléculas inmunes (como anticuerpos) se administran a pacientes que no las producen por sí mismos para que éstos adopten una respuesta inmunológica que se ha desarrollado en un tubo de ensayo. Ambos enfoques pueden ser específicos o inespecíficos (National Cancer Institute, 2019). Aquí nos concentraremos en la inmunoterapia activa, pero a saber, la tipo pasiva incluye, por ejemplo, a los conocidos anticuerpos monoclonales (hay 9 anticuerpos de este tipo dirigidos a seis proteínas asociadas al cáncer que están aprobados para el tratamiento de neoplasias malignas sólidas y hematológicas) (Mellman et al., 2011).

Una **vacuna** es una preparación biológica que tiene el objetivo de aumentar la respuesta inmunitaria de un individuo contra una determinada enfermedad. Es, por lo tanto, un tipo de inmunoterapia activa específica (ya que está dirigida a una afección específica). Podemos distinguir entre dos tipos de vacunas.

Las vacunas preventivas o profilácticas, que normalmente (aunque de manera inexacta) se las llama vacunas (a secas), se diseñan para enfrentar infecciones agudas y tienen como objetivo conferir inmunidad a un individuo antes de la

replicación del agente infeccioso. Sin embargo, puede suceder que un agente patógeno establezca una infección crónica o latente en una persona, y aun en estos casos, se puede recurrir a la vacunación para desarrollar una respuesta inmunitaria. Estaríamos ante las llamadas **vacunas terapéuticas** (S. A. Plotkin, 2002). El VIH, los distintos herpesvirus y *Helicobacter pylori* son ejemplos de infecciones para las cuales se necesita la vacunación terapéutica (Ho, 1998; C. K. Lee et al., 1999; Stanberry, 1995). En este contexto, las enfermedades crónicas no infecciosas no han quedado al margen y en la actualidad hay ensayos clínicos orientados hacia el desarrollo de vacunas terapéuticas para combatir el cáncer, enfermedades autoinmunes, desórdenes inflamatorios y alergias (Delany et al., 2014).

Ya sea profiláctica o terapéutica, el ingrediente principal (clave e indispensable) de una vacuna es el (o los) ingrediente(s) activo(s), llamados **antígenos**, que son las partes de la vacuna que contienen porciones del organismo patógeno (o de la célula cancerosa), que han sido previamente debilitadas o destruidas, o que han sido sintetizadas mediante técnicas biotecnológicas de laboratorio (Oxford Vaccine Group, 2019). Si bien las vacunas comerciales tienen otros ingredientes (preservantes, estabilizantes, adyuvantes), el antígeno es el más importante, ya que será el que proveerá la inmunidad específica al sujeto vacunado.

Por el contrario, la **inmunoterapia activa inespecífica** utiliza agentes que ponen en marcha una respuesta inmunológica general, activando una amplia gama de células inmunes, en lugar de despertar selectivamente elementos a partir del uso de antígenos específicos. Este es el caso de moléculas como interleuquinas, interferones y otros agonistas de PRRs, así como del bacilo Calmette-Guérin (BCG) (National Cancer Institute, 2019). Este tipo de terapias han logrado un éxito limitado en la remisión de tumores, pero se espera que puedan alcanzar mejores resultados al ser combinadas racionalmente con las terapias tradicionales (quimioterapia, radioterapia y cirugía) (Lesterhuis et al., 2011).

Estrategias inmunoterapéuticas también son utilizadas para combatir enfermedades infecciosas; en este caso, los agentes inmunomoduladores más importantes son los anticuerpos –policlonales (combinan un amplio espectro de actividades) o

hiperinmunes (se obtienen de individuos inmunes con una mayor actividad contra un organismo específico)—, los IFNs y los factores estimulantes de colonias (CSFs)¹³ (Kak et al., 2012). En lo que respecta a enfermedades crónicas autoinmunes, por ahora, los enfoques pasivos específicos son los únicos que producen beneficios clínicos. Un ejemplo es el bloqueo de TNF con anticuerpos monoclonales (es una terapia aprobada para artritis reumatoide, enfermedad de Crohn, artritis psoriásica y espondilitis anquilosante) (Feldmann & Steinman, 2005).

4.3.2 Vacunas: historia, clasificación y nuevos desafíos

La vacunación (profiláctica) es una de las intervenciones sanitarias más exitosas y rentables jamás implementadas, y continúa teniendo un gran impacto en la prevención de enfermedades infecciosas en todo el mundo. A lo largo de los últimos decenios, por ejemplo, la vacunación ha logrado la erradicación de la viruela y la reducción de la incidencia mundial de la poliomielitis en un 99%. Algunas de las 25 enfermedades prevenibles mediante vacunación son: ántrax, sarampión, hepatitis B, rabia, virus del papiloma humano (VPH), fiebre tifoidea y tétanos (Organización Mundial de la Salud, 2013).

Para una larga y detallada historia sobre la vacunación recomiendo leer la primera parte de la sección 1 del libro “*Vaccines*” (S. A. Plotkin et al., 2012). A continuación, yo describo solo algunos de los hitos que me parecen más interesantes.

Si bien se atribuye a Edward Jenner ser el pionero de la inmunología y la “vacunología”¹⁴, dada su extensa investigación sobre la viruela a finales del siglo XVIII (Riedel, 2005), esto no está exento de controversias. Algunos registros sugieren que los chinos utilizaron técnicas de inoculación contra la viruela ya en el año 900 d.C. (Gross & Sepkowitz, 1998), y también textos que datan de mitad del

¹³ Un factor estimulante (o estimulador) de colonias es una sustancia que estimula la producción de células sanguíneas. Tres ejemplos son: el factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF), el factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF) y la promegapoyetina (National Cancer Institute - National Institutes of Health (NIH) - U.S. Government, s. f.).

¹⁴ Según el diccionario inglés, la palabra *vaccinology* (“vacunología”) refiere al campo de investigación y desarrollo en vacunas. En español no existe esa palabra en el diccionario.

siglo XVIII citan formas de inoculación contra la viruela utilizadas en China desde 1695 (Leung, 2011). Además, la “variación” –introducción del pus seco de las pústulas de la viruela en la piel de un paciente– fue practicada a intervalos regulares por la casta brahmán hinduista en la India en el siglo XVI (Major, 1954). Por lo tanto, aunque se desconoce el origen exacto, esta técnica parece haberse desarrollado en algún lugar de Asia Central a principios del segundo milenio para luego extenderse hacia el este a China y hacia el oeste a Turquía, África y Europa (S. A. Plotkin et al., 2012).

Lejos de estas banales disputas, lo que sí es seguro es que Jenner demostró fehacientemente mediante experimentación científica que la vacunación podría proteger contra la enfermedad sin transmitirla (Pasquale et al., 2015). Cerca del año 1796, popularizó de manera metodológica, lo que otros ya habían probado empíricamente: el virus de la viruela de la vaca (*cowpox*) inducía una respuesta inmune efectiva contra el virus humano (*smallpox*), causando solo leves infecciones en los pacientes inmunizados, y así proporcionaba protección cruzada contra la enfermedad (S. Plotkin, 2014). Después de eso, el primer gran avance fue el alcanzado por el trabajo de Louis Pasteur con microorganismos atenuados a finales de la década de 1870. El científico francés logró impartirles inmunidad a pollos utilizando una vacuna desarrollada a partir de la atenuación de cultivos de la bacteria del cólera (*Pasteurella multocida*) mediante acidificación; y, en paralelo, consiguió atenuar la bacteria del ántrax (*Bacillus anthracis*) para conferirle inmunidad a vacas y ovejas (Pasteur, 1880; Pasteur et al., 1881) (vale la pena señalar que, al mismo tiempo, Henry Toussaint había logrado la inmunidad al ántrax con una vacuna atenuada por filtración y ácido fenólico) (Bazin, 2011). Los experimentos de Pasteur con el cólera y el ántrax fueron los que dieron pie a una nueva era científica en la vacunación (S. A. Plotkin et al., 2012). La primera vacuna administrada sistemáticamente en humanos fue la de la rabia (con patógenos atenuados), en 1885 (Pasteur, 1885). El siguiente paso importante en este campo tuvo lugar en los Estados Unidos, cuando Salmon y Smith publicaron su trabajo de desarrollo de una vacuna a partir de bacterias *Salmonella* muertas por calor (Salmon & Smith, 1886a, 1886b). Aunque esta obra rindió resultados para los seres

humanos recién 15 años más tarde, su informe demuestra que las ideas de las vacunas con microorganismos vivos atenuados y muertos se desarrollaron casi simultáneamente (S. A. Plotkin et al., 2012). Este período creativo dio sus frutos más adelante con la creación de vacunas contra la fiebre tifoidea, la peste y el cólera (con microorganismos muertos). Luego, a principios del siglo XX, aparecieron los primeros toxoides (como resultado de la inactivación química de las toxinas de difteria y tétanos); T. Smith determinó en 1907 que los toxoides proporcionaban inmunidad a conejillos de indias (S. A. Plotkin et al., 2012). Más adelante, la vacuna contra la tuberculosis (BCG), se obtuvo luego de 13 años (y 230 pasajes) de atenuación en bilis de res, papas y glicerol a partir de una cepa de micobacterias obtenida de un bovino y estuvo disponible para uso humano en 1927 (Calmette et al., 1927). La primera vacuna combinatoria, DTP (difteria, tétanos, pertussis) estuvo disponible en 1948 (Edwards et al., 1999), y luego le siguieron las vacunas contra la poliomielitis (Salk et al., 1954) así como contra el sarampión, las paperas, la rubéola y la varicela (S. Plotkin, 2014). La primera vacuna recombinante (contra la hepatitis B), fue licenciada en 1986: Valenzuela y otros pudieron clonar el gen del antígeno de superficie de la hepatitis B (HBsAg) en levaduras (*Saccharomyces cerevisiae*) y en células humanas (McAleer et al., 1984; Valenzuela et al., 1982).

Desde los primeros intentos, se han desarrollado y utilizado en la práctica clínica vacunas humanas contra varias docenas de patógenos virales y bacterianos de importancia mundial, y se siguen diseñando y probando muchas más vacunas en investigación (Strugnell et al., 2011). La verdadera edad de oro de la vacunología comenzó allá por el 1949, con el advenimiento de nuevas técnicas de cultivo celular y la posibilidad de propagar virus y bacterias *in vitro*. Actualmente, se utilizan nuevas tecnologías que parecen ofrecer mayor seguridad. El foco está puesto mayormente en purificar subunidades de microorganismos¹⁵, modificar antígenos genéticamente o vectorizarlos, ya que muchos patógenos apuntados son intracelulares y es difícil lograr inmunizaciones eficientes. Aun así, los métodos clásicos más antiguos, como

¹⁵ Las subunidades son componentes determinados de un microorganismo (normalmente proteínas o polisacáridos) capaces de inducir una respuesta inmune similar a la que se lograría con el agente infeccioso completo.

la atenuación e inactivación, siguen produciendo nuevas vacunas, como lo demuestra el caso de la vacuna zoster (S. A. Plotkin et al., 2012).

A partir de la historia, podemos observar que se han desarrollado distintos tipos de vacunas a lo largo del tiempo. Todas las que existen al día de hoy son principalmente de cuatro tipos: 1) patógenos vivos atenuados; 2) patógenos enteros inactivados (muertos); 3) toxinas bacterianas inactivadas (toxoides); y 4) subunidades (Ada, 2005). En la **Tabla 1** se resumen las características de cada tipo.

Las vacunas tradicionales (de patógenos vivos atenuados y patógenos inactivados) se basan en el concepto de “célula entera” y poseen una capacidad inmunoestimuladora intrínseca, que permite inducir una inmunidad protectora de larga duración (Kallerup & Foged, 2015). Sin embargo, una gran desventaja es que estos sistemas vivos tienen efectos adversos que en algunos casos son leves pero que pueden ser severos o incluso fatales (D. B. Huang et al., 2004) y pueden causar enfermedades en huéspedes inmunocomprometidos o mutar y volver a ser virulentas (Robinson & Amara, 2005). Es por esto que han aparecido nuevas estrategias para el desarrollo de vacunas, que progresivamente se van alejando del enfoque tradicional basado en células enteras y se van acercando a una tecnología más segura basada en subunidades, gracias, en parte, a la introducción de las plataformas de ADN recombinante. El desarrollo de vacunas conjugadas, de subunidades y de partículas recombinantes similares a virus no replicantes (VLP)¹⁶ ha tenido un enorme impacto en el campo de la vacunología (Rappuoli, 2007).

Tipo de vacuna	Ingrediente activo	Ventaja	Desventaja	Ejemplo
----------------	--------------------	---------	------------	---------

¹⁶ En inglés: *virus-like particles* (VLP). Partículas virales recombinantes que carecen de material genético y que, por lo tanto, no pueden replicarse, pero que mantienen su estructura proteica externa y, por consiguiente, son inmunogénicas.

Atenuadas	Patógeno debilitado	Respuesta inmune intensa y duradera	Pueden tener efectos adversos graves	Tuberculosis (BCG), fiebre amarilla
Inactivadas	Patógeno muerto	Más seguras que las atenuadas. Se evita la vuelta a la virulencia	Respuesta inmune menos eficaz. Se requieren varias dosis	Hepatitis A, poliomielitis
Toxoides	Toxinas bacterianas inactivadas	Altamente eficaces	Solo para patógenos c/toxinas	Difteria, tétanos
Subunidades	Uno o varios fragmentos subcelulares del patógeno	Puras, estables y seguras	Poco inmunogénicas. Requieren fuertes adyuvantes	Hepatitis B (HBsAg), Neumococo.

Tabla 1: tipos de vacunas. Características generales, ventajas, desventajas y ejemplos de cada una.

Las **vacunas atenuadas** están basadas en patógenos vivos atenuados, es decir, contienen versiones debilitadas en el laboratorio del patógeno original. Imitan la infección natural, lo que da lugar a una estrategia de vacunación eficaz, produciendo una fuerte respuesta celular y de anticuerpos. Por lo general, también se logra una protección a largo plazo, y a menudo basta con una sola inoculación. La atenuación del microorganismo da como resultado una versión no patógena del mismo, pero que sigue poseyendo todas las características originales (Clem, 2011). La atenuación se puede lograr a través de diferentes enfoques: usar un virus patógeno en un huésped diferente pero no patógeno para éste (el ejemplo de Jenner); utilizar

cepas atenuadas de origen natural (ejemplo el virus de la poliomielitis tipo 2); aplicar condiciones severas a una cepa de virus virulento (por ejemplo, la adaptación al frío del virus de la influenza) (Kallerup & Foged, 2015).

Las **vacunas inactivadas** se basan en patógenos muertos. La principal ventaja de las vacunas inactivadas sobre las vacunas atenuadas es la seguridad, ya que al estar muertos los patógenos, se evitan las preocupaciones relativas a la vuelta a la virulencia. Sin embargo, esto también constituye una gran desventaja, ya que la falta de replicación da lugar a una rápida eliminación del cuerpo, lo que disminuye la eficacia, en comparación con las vacunas vivas. Sin embargo, debido a que la mayoría de los componentes patógenos se conservan, siguen siendo más eficaces en comparación con las más recientes vacunas de subunidades. Un ejemplo de este tipo es la vacuna contra la hepatitis A Epaxal® de Crucell. Esta vacuna se basa en un virus de la hepatitis A (cepa RG-SB) que se inactiva mediante un tratamiento con formalina y se adsorbe a una formulación virosómica¹⁷, que constituye el sistema adyuvante (Bovier, 2008).

Los **toxoides**, si bien se agrupan como un tipo diferente, pueden considerarse una clase de vacunas de subunidades. Se generan contra algunas bacterias, donde las toxinas son los principales agentes causantes de enfermedades. Las toxinas se inactivan convirtiéndolas en versiones no tóxicas (toxoides), por ejemplo, mediante el tratamiento con formaldehído. Estos toxoides pueden ser usados con seguridad para propósitos de vacunación. El gran parecido del toxoide con la toxina permite que el sistema inmunológico neutralice y fije las toxinas naturales mediante la generación de anticuerpos anti-toxoides. Ejemplos de vacunas con toxoides son las diferentes vacunas contra la difteria y el tétanos (Kallerup & Foged, 2015).

Las **vacunas de subunidades** están compuestas por uno o varios péptidos/proteínas (recombinantes o aislados) o polisacáridos presentes en la estructura del patógeno objetivo (Dudek et al., 2010). En términos de seguridad y

¹⁷ Virosoma: vesícula unilamelar de fosfolípidos que contiene proteínas derivadas de virus (Daemen et al., 2005)

costo de producción, estas vacunas ofrecen ventajas considerables sobre las vacunas tradicionales, ya que están compuestas por componentes muy bien definidos y de gran pureza. Este enfoque da como resultado una ventaja de seguridad más atractiva debido a la falta de replicación y a la eliminación de material que puede iniciar respuestas indeseadas del huésped (Robinson & Amara, 2005). Las vacunas de subunidades pueden generarse a partir del aislamiento o síntesis de componentes de la superficie externa de microorganismos, como la vacuna del virus de la influenza, compuesta por las dos proteínas de superficie del virus como antígenos, la hemaglutinina y la neuraminidasa (Ada, 2005). Los antígenos de las vacunas también pueden ser producidos por medio de ingeniería genética (denominadas vacunas recombinantes). Las vacunas contra la hepatitis B, el VPH y la gripe (una marca) se producen mediante la inserción de un segmento del respectivo gen viral en el gen de una célula de levadura o un virus. Luego la célula de levadura o virus modificado produce el antígeno de superficie de la hepatitis B puro, la proteína de la cápside del VPH o la hemaglutinina de la gripe cuando crece. Otro gran grupo de vacunas de subunidades son las de polisacáridos, que están compuestas por largas cadenas de moléculas de azúcares que forman la cápsula superficial de ciertas bacterias. Las vacunas de polisacáridos puros están disponibles para tres enfermedades: neumococo, meningococo y *Salmonella typhi*. Dado que los anticuerpos inducidos con vacunas de polisacáridos tienen menos actividad funcional que los inducidos por antígenos de proteínas, una estrategia para superar este problema es mediante un proceso llamado conjugación, en el que el polisacárido se combina químicamente con una proteína (normalmente un toxoide) (Kallerup & Foged, 2015). Este enfoque se utiliza en la vacuna contra la *Haemophilus influenzae* tipo B (Centers for Disease Control and Prevention, 2015). Por último, muchas de las vacunas de subunidades de virus se generan disgregando el virus en cuestión, un proceso por el cual su estructura queda alterada, dando lugar a una mezcla de los diversos componentes virales (Kallerup & Foged, 2015).

En algunos casos, estos antígenos pueden ser suficientemente inmunogénicos por sí mismos (por ejemplo, la vacuna de subunidades para la influenza), sin embargo,

en muchos otros, los antígenos de subunidades altamente purificados carecen de muchas de las características patógenas intrínsecas, lo que hace que éstos sean débilmente inmunogénicos por sí mismos. En estas situaciones la co-administración de adyuvantes es requerida. La adición de adyuvantes no sólo permite la inducción de una respuesta inmune efectiva, sino que también proporciona el potencial para modular la respuesta inmune (O'Hagan et al., 2001; Reed et al., 2009). El uso de adyuvantes también puede reducir el número de administraciones o la dosis requerida (Kallerup & Foged, 2015). Volveré sobre este punto más adelante.

4.3.3 ¿Cómo funcionan las vacunas?

La efectividad de una vacuna radica en su capacidad de inducir protección a largo plazo, un sello de la inmunidad adaptativa que contrasta con las respuestas inmunitarias innatas, rápidas, pero de corta duración. La inmunidad a largo plazo es conferida por el mantenimiento de efectores inmunes antígeno-específicos y/o por la inducción de células inmunes de memoria que pueden ser suficientemente eficientes y reactivadas rápidamente en caso de re-exposición al patógeno (S. A. Plotkin et al., 2012). Estos efectores inducidos por las vacunas son esencialmente anticuerpos producidos por LB, (capaces de unirse específicamente a una toxina o a un patógeno) (Cooper & Nemerow, 1984). Otros efectores potenciales son los LTc y los LTh. Los LTc pueden limitar la propagación de agentes infecciosos al reconocer y destruir las células infectadas o al secretar citoquinas antivirales específicas y los LTh (Th1, Th2 y Th17) pueden contribuir a la protección a través de la producción de más citoquinas y proporcionar apoyo a la generación y mantenimiento de respuestas de los LB y LT CD8+ (Lin et al., 2010). Los LTh efectores son controlados por LT reguladores que participan en el mantenimiento de la tolerancia inmunológica (Sakaguchi et al., 2010). La mayoría de los antígenos y las vacunas desencadenan respuestas de las LB y LT, de tal manera que no hay razón para la clásica oposición entre respuesta de anticuerpos ("inmunidad humoral") y a respuestas de células T ("inmunidad celular"). Los LT CD4+ son necesarios para la mayoría de las respuestas de los anticuerpos, mientras que los

anticuerpos ejercen una influencia significativa en las respuestas de LT a los patógenos intracelulares (Igietsme et al., 2004).

La mayoría de las vacunas actuales median su eficacia protectora a través de la inducción de anticuerpos, específicamente anticuerpos séricos IgG altamente específicos (S. A. Plotkin et al., 2012).

La inducción de las respuestas de células B y T específicas requiere su activación por parte de CPA, esencialmente CDs, que deben ser reclutadas al sitio de reacción. Las CDs inmaduras patrullan por todo el cuerpo y cuando se exponen a patógenos, maduran, modulan receptores específicos de su superficie y migran hacia los ganglios linfáticos secundarios, donde se produce la inducción de las respuestas de las células T y B (S. A. Plotkin et al., 2012). Las CDs maduras inducen las respuestas a las vacunas al proporcionar señales específicas del antígeno y de co-estimulación necesarias para activar a las células T inmaduras (Palucka et al., 2010). Los antígenos contenidos en las vacunas deben proporcionar suficientes señales de peligro para desencadenar una reacción inflamatoria mediada por células del sistema inmunitario innato (Coffman et al., 2010). En muchas ocasiones, los antígenos por sí solos no son capaces de generar señales lo suficientemente potentes, por lo que las vacunas incluyen además sustancias que mejoran esencialmente las respuestas mediante la modulación de la inmunidad innata, que luego da forma a las respuestas adaptativas (Coffman et al., 2010; Iwasaki & Medzhitov, 2010). Estas sustancias se conocen como adyuvantes.

4.3.4 Adyuvantes de vacunación

Los adyuvantes –compuestos que aumentan la respuesta inmunológica específica contra los antígenos co-inoculados (Petrovsky & Aguilar, 2004)– han sido utilizados para mejorar la eficacia de las vacunas desde los años '20. El concepto nació en esa época a partir de las investigaciones de Ramon et al., que observaron que caballos que desarrollaron un absceso (sitio infectado e inflamado) en el lugar de inoculación del toxoide diftérico generaron títulos de anticuerpos específicos más altos, y, posteriormente descubrieron que un absceso generado por la inyección de

sustancias no relacionadas junto con el toxoide diftérico aumentaba la respuesta inmunológica contra el toxoide (Ramon, 1925, 1926). Luego en 1926 fue demostrada la capacidad adyuvante de los compuestos de aluminio (Glenny et al., 1926), en 1936 Freund desarrolló la famosa emulsión de agua y aceite mineral con micobacterias muertas (conocida como adyuvante completo de Freund, FCA) y posteriormente la versión sin micobacterias (adyuvante incompleto de Freund, FIA) (Freund et al., 1937; Stuart-Harris, 1969). Hasta ahora, se han identificado varios cientos de compuestos naturales y sintéticos con actividad adyuvante y aunque una gran variedad ha sido testeada en vacunas, la toxicidad es quizás el impedimento más importante para introducir la mayoría de esos adyuvantes en el uso humano (Vogel, 1998).

Los beneficios de incluir adyuvantes en las vacunas son muchos y los requisitos varían según las características deseadas de la vacuna (Schijns & Lavelle, 2011):

1) Los adyuvantes afectan fuertemente al inmunofenotipo y por consiguiente a la eficacia de la vacuna, es decir, pueden moldear la calidad de las respuestas inmunológicas. Por ejemplo, para algunos patógenos específicos que requieren diferentes tipos de reacciones inmunológicas para la eliminación de la enfermedad, algunos adyuvantes pueden inducir selectivamente subtipos determinados de LTh. Además, ciertos mecanismos de captación y procesamiento celular desencadenados por los adyuvantes facilitan la carga del antígeno en la vía del MHC I y la preparación de las respuestas de LTc. Esto es particularmente útil para aquellos antígenos pobremente inmunogénicos.

2) Los adyuvantes afectan el inicio, la fuerza y la duración de las respuestas inmunológicas. Pueden generar respuestas inmunológicas más rápidas y fuertes o aumentar la longevidad de las respuestas, lo que se requiere, por ejemplo, durante campañas de vacunación de emergencia después de algún brote.

3) Los adyuvantes pueden compensar la falta de respuesta inmunológica, mejorando la eficacia de las vacunas en los recién nacidos, los ancianos o las personas inmunodeprimidas.

4) Los adyuvantes pueden reducir la dosis de antígeno necesaria para la protección, algo particularmente útil en el caso de que el antígeno sólo esté disponible en cantidades limitadas. Dado que la producción de la nueva generación de vacunas de subunidades recombinantes suele ser costosa, la posibilidad de reducir la dosis requerida utilizando adyuvantes puede tener importantes ventajas económicas.

5) Los adyuvantes pueden facilitar el aumento de la estabilidad de la vacuna. Pueden hacer que la vacuna sea menos susceptible a la degradación que se produce durante el almacenamiento, o al ser inyectada, como resultado de las reacciones de degradación local.

6) Los adyuvantes pueden proporcionar una ventaja competitiva. Muchos adyuvantes inmunoestimuladores (ver definición más abajo) han sido patentados y han permitido el desarrollo de vacunas únicas, basadas en antígenos validados. Las vacunas patentadas pueden crearse mediante el acceso a adyuvantes patentados.

Aunque mucho se sabe de las ventajas que ofrecen los adyuvantes, la realidad es que el conocimiento sobre su modo de acción aun es limitado, en parte debido a que sus desarrollos han sido mayormente de carácter empírico. De a poco, con mayor implicación de la investigación básica, cada vez más se trata de comprender la relación entre las características de los adyuvantes y las consiguientes respuestas inmunológicas, aunque todavía estamos en una fase temprana para definir claramente el (o los) modo(s) de acción concreto(s) de los adyuvantes (Schijns & Lavelle, 2011). Y dada la gran cantidad de adyuvantes que están en fase de investigación clínica (Mbow et al., 2010) y muchos más que están en desarrollos pre-clínicos, también se han propuesto diversos criterios para clasificarlos.

Para clasificarlos aquí tomaremos dos artículos de revisión, uno que asigna a los adyuvantes en dos grupos amplios (particulados y no particulados) (Cox & Coulter, 1992, 1997), y otro que, siguiendo un criterio similar, los divide en inmunoestimuladores y sistemas de *delivery* (M. Singh & O'Hagan, 2002). En resumen, los **inmunoestimuladores** de Singh & O'Hagan son los que Cox & Coulter nombran como no particulados y su característica principal es que modulan la respuesta inmune por medio de la unión directa a receptores de CPA. En ese

grupo encontramos al lípido A monofosforilado (MPLA), derivado del LPS de la bacteria Gram-negativa *Salmonella minnesota*, que, al igual que el LPS, interactúa con el TLR4, dando lugar a la liberación de citoquinas pro-inflamatorias. Otro que entra dentro de esta clasificación es el CpG-ADN, que ejerce respuestas inmunes a partir de su unión al TLR9. Un tercer grupo de adyuvantes inmunoestimuladores son los glucósidos triterpenoides, o saponinas, derivados de la corteza de un árbol chileno, *Quillaja saponaria* (por ejemplo, QS-21 o Quil-A®). Las saponinas parecen funcionar principalmente a través de la inducción de citoquinas y se han utilizado ampliamente como adyuvantes en varias vacunas veterinarias. Entre los adyuvantes que funcionan como **sistemas de delivery (o particulados)** los autores agrupan a las sales de aluminio y calcio, a las emulsiones (agua-en-aceite [W/O] y aceite-en-agua [O/W]), a los complejos de inmuno-estimulación (ISCOMs), a las nano y micropartículas poliméricas y a los liposomas y sus derivados (Cox & Coulter, 1992, 1997; M. Singh & O'Hagan, 2002). Los adyuvantes particulados tienen dimensiones comparables a los patógenos para los que el sistema inmunológico evolucionó para combatir y su principal característica es que funcionan como reservorios del antígeno, pueden protegerlo de la degradación y potencialmente entregarlo en un sitio puntual, a una velocidad y duración determinada, para generar una respuesta inmune óptima (Akagi et al., 2012; M. Singh & O'Hagan, 2002).

Aun así, a pesar de los beneficios obvios, las décadas de investigación, los cientos de candidatos preclínicos, y la seguridad y eficacia comprobadas, sólo un puñado de adyuvantes están actualmente aprobados para la vacunación profiláctica en seres humanos: sales de aluminio, MF59, virosomas, AS03 y AS04 son los únicos licenciados¹⁸ (Rambe et al., 2015; Schijns & Lavelle, 2011). Las fallas de los

¹⁸ A modo de resumen: las sales de aluminio se han utilizado ampliamente durante más de 70 años y hasta hace poco representaban el único adyuvante aprobado en los EE.UU. Las emulsiones O/W de aceites minerales (MF59 y AS03) están autorizadas como adyuvantes en las vacunas contra la gripe en Europa. AS04, un adyuvante combinatorio, compuesto de MPLA adsorbido en alúmina, está aprobado para las vacunas contra la hepatitis B y el VPH en Europa y ha sido recientemente licenciado en los EE.UU. (Mbow et al., 2010). Los virosomas (vesículas tipo liposomas formadas por envolturas virales reconstituidas y lípidos convencionales, que carecen de material genético viral) se han utilizado para mejorar la respuesta inmunológica a las vacunas contra la hepatitis A y la gripe (Rambe et al., 2015).

adyuvantes durante las fases de desarrollo están relacionadas con el proceso de fabricación (falta de una formulación reproducible, impacto negativo en la estabilidad del antígeno) o a los eventos adversos sistémicos. Cabe destacar que el perfil de seguridad aceptable es diferente en el caso de vacunas terapéuticas o profilácticas. En la mayoría de los casos, las vacunas preventivas se administran a un gran número de personas sanas y niños en los primeros años de edad, por lo tanto, tienen que ser extremadamente seguras y bien toleradas (Mbow et al., 2010).

Una coincidencia que se encuentra entre estos autores es que los adyuvantes inmunoestimuladores también pueden incluirse en los sistemas de *delivery* (particulados) para mejorar el nivel de la respuesta. Además, la formulación de moléculas inmunomoduladoras en sistemas de *delivery* puede limitar los efectos adversos, al restringir la circulación sistémica del inmunomodulador (M. Singh & O'Hagan, 2002). Como regla general, dos o más adyuvantes con diferentes mecanismos de acción se pueden combinar para mejorar la potencia y el tipo de respuesta inmune al antígeno (Petrovsky & Aguilar, 2004). Un ejemplo es el FCA, que combina las propiedades inmunoestimuladoras de *Mycobacterium tuberculosis* (esencialmente de los péptidos TDM y MDP) junto con el efecto de depósito a corto plazo de las emulsiones W/O. Los liposomas, por ejemplo, son una plataforma versátil que se puede utilizar para incorporar diversas moléculas inmunomoduladoras (Cox & Coulter, 1997).

4.3.5 Vacunas y adyuvantes basados en nanomateriales

Los sistemas de *delivery* de antígenos nanoparticulados están diseñados con el objetivo de mejorar la captación de los antígenos por parte de las CPA y/o para obtener una liberación controlada o sostenida de los mismos y mejorar su presentación. Éstos ofrecen varias ventajas para la entrega de antígenos en comparación con la inoculación de antígenos solubles (Zhu et al., 2014):

- 1) Protegen a los antígenos de la degradación proteolítica *in vivo*, que generalmente hace que aumente la dosis de antígeno necesaria para la inmunización.
- 2) Proporcionan un perfil de liberación sostenida de los antígenos antes de su internalización por las CPA o dentro del compartimiento endo-lisosomal después de la internalización. De esta manera pueden proporcionar un depósito duradero de antígeno para reforzar el sistema inmunológico.
- 3) Mejoran la detección y absorción de los antígenos por parte de CPA, en comparación con los antígenos solubles. Además, la modificación de la superficie de los sistemas nanoparticulados con ligandos o anticuerpos que se dirijan a PRRs puede mejorar la entrega de antígenos a determinadas CPA mediante la *targeting* activo.
- 4) Permiten el suministro conjunto de diferentes componentes inmunoestimuladores junto con los antígenos, lo que puede servir para obtener un efecto inmune más potente.

Entre los adyuvantes licenciados que nombramos anteriormente, MF59 (de Novartis) es un sistema de *delivery* nanoparticulado, de 165 nm de diámetro, con la capacidad de reclutar neutrófilos, monocitos y CDs y aumentar la captación de antígenos. En particular, MF59 ha mostrado una actividad adyuvante más potente que la alúmina en la inducción de respuestas inmunes humorales y Th1 (Calabro et al., 2013; Vogel et al., 2009). Otros sistemas de *delivery* nanoparticulados que están siendo investigados en ensayos clínicos son: nanopartículas similares a virus (VLN) (de 15-30 nm), nanopartículas de ácido poli(láctico-co-glicólico) (PLGA) (de 100-200 nm), liposomas catiónicos, nanoemulsiones (de 400 nm), y el nanogel portador de colesterol (de 30-40 nm) (D. M. Smith et al., 2013).

De todos ellos, nos interesa particularmente enfocarnos en los liposomas, que son los sistemas que hemos utilizado para desarrollar todo el trabajo realizado en esta tesis.

Son varias las ventajas que encontramos al usar liposomas como adyuvantes. Se sabe que estos sistemas son seguros y bien tolerados, como lo demuestra el amplio

uso de medicamentos anticancerígenos y anti-infecciosos basados en liposomas aprobados, como Doxil® y AmBisome®. Además, debido a que los liposomas están a menudo compuestos por lípidos que se encuentran naturalmente en las membranas celulares, como PC y Chol, estas formulaciones son completamente biodegradables (Watson et al., 2012). Entre otras características relevantes, los liposomas son sistemas altamente versátiles, se pueden personalizar cuidadosamente para adaptarlos a los perfiles inmunes deseados combinándolos con inmunomoduladores y optimizando su composición, propiedades fisicoquímicas y modo de carga de antígenos (María José Morilla & Romero, 2016). Aún más, los liposomas pueden producirse industrialmente de forma masiva bajo buenas prácticas de manufactura y almacenarse durante largos períodos, manteniendo altas relaciones de masa antígeno/vesícula (Romero & Morilla, 2011).

En fin, los liposomas tienen la capacidad de incrementar la captura de los antígenos por parte de CPA y modular la liberación intra-citoplasmática o intra-lisosomal (para ser presentados por MHC I o MHC II e inducir respuestas diferenciales). Pueden co-encapsular varios antígenos o co-encapsular antígenos junto con moléculas inmunoestimuladoras. Pueden inducir la presentación de moléculas coestimuladoras y también proteger a los antígenos en ambientes hostiles (Caimi, 2019).

Los esfuerzos intensivos en el campo de la vacunación han dado lugar a una serie de diferentes adyuvantes basados en liposomas como parte de las vacunas comercializadas o probadas clínicamente contra varios patógenos diferentes durante los últimos 20 años. Sin embargo, solo 2 productos alcanzaron el mercado (Inflexal®, una vacuna contra influenza, y Epaxal®, contra la hepatitis A). Los virosomas, compuestos de membranas reconstituidas del virus de la gripe (lípidos y glicoproteínas de envoltura) complementados con el fosfolípido PC, han sido los componentes de esas vacunas, autorizadas desde 1997. Inflexal® V se comercializa en 43 países con más de 60 millones de dosis distribuidas. Otras vacunas liposomales compuestas de componentes más tradicionales y combinadas con moléculas inmunomoduladoras también están progresando hacia la aprobación

regulatoria. Por ejemplo, como terapia contra el cáncer de pulmón de células no pequeñas (Stimuvax®, Oncotheryon, compuesta por PC, PG, Chol y MPLA) y como prevención de la malaria (RTS,S/AS01, GlaxoSmithKline, compuesta por PC, PG, Chol, MPLA y QS-21) (Watson et al., 2012).

La elección del lípido utilizado y el método de fabricación resultan fundamentales en el diseño de la formulación, ya que influyen en las propiedades fisicoquímicas de los liposomas formados, lo que se traslada a su efecto como compuesto adyuvante: se sabe que la captura celular, el procesamiento del antígeno y su presentación están parcialmente influenciadas por estas características de los liposomas (De Temmerman et al., 2011).

Existen una variedad de factores fisicoquímicos que se deben tener en cuenta en el diseño de los liposomas. Entre ellos podemos mencionar: a) la composición de los lípidos, que puede afectar la fluidez de las bicapas (Liu et al., 2001), b) el tamaño de la vesícula, que influye en la eficacia del adyuvante liposomal, pudiendo polarizar las respuestas inmunes hacia un perfil de citoquinas Th1 o Th2 (Brewer et al., 1998, 2004; Carstens et al., 2011; Mann et al., 2009), y c) la ubicación del antígeno y la carga liposomal que influyen en su actividad adyuvante (Henriksen-Lacey et al., 2010; Hussain et al., 2014).

Como pueden ver, a la hora de diseñar un adyuvante liposomal muchos factores deben ser tenidos en cuenta. Si bien uno no podría predecir con total exactitud el éxito o fracaso de una nueva formulación, queda claro que un diseño racional mejorará ampliamente las posibilidades de éxito.

4.4 Nanovesículas arqueolipídicas multiefectoras

En mi trabajo de doctorado propusimos diseñar un sistema de *delivery* nanoparticulado que contenga no uno, sino dos ligandos de receptores de CPA, con la idea de utilizarlo como un potente adyuvante de vacunación, que module la respuesta inmune o como un agente inmunoterapéutico por sí mismo. Esto se lograría utilizando un tipo muy particular de liposomas, los nanoarqueosomas (nanoARC), para encapsular imiquimod (IMQ).

Continuando con el hilo de lectura de la sección anterior, verán que la idea de esta tesis no es descabellada. Además de todas las propiedades y características mencionadas anteriormente sobre los liposomas, la co-encapsulación de ligandos de PRRs y antígenos ha sido ampliamente investigada. Los agonistas de TLRs y NLRs como el MPLA, oligodeoxinucleótidos CpG (CpG-ODNs), el ácido poliinosínico:policitidílico (poli I:C) y el dipéptido de muramilo (MDP) se han incorporado comúnmente en vacunas experimentales basadas en liposomas (Christensen et al., 2009; Didierlaurent et al., 2017; Wilson et al., 2009; Zaks et al., 2006).

La combinación de estos nanoARC (ligandos de un RS) con IMQ (ligando de un TLR) nos permitiría obtener, a priori, una formulación capaz de inducir una fuerte respuesta inmune, ya que, aprovechando la capacidad del RS-A1 para endocitar sus ligandos vía endocitosis simple, el IMQ se concentraría en el sitio intracelular donde se encuentra el TLR7 (los endosomas y endo-lisosomas).

En esta sección paso a describir los dos ligandos que componen nuestro sistema de *delivery* nanoparticulado.

4.4.1 Nanoarqueosomas (nanoARC):

Los arqueosomas (ARQ) son un tipo de vesículas lipídicas similares a los liposomas pero que se preparan con lípidos extraídos de arqueobacterias. En nuestro caso, utilizamos como fuente de lípidos a las arqueobacterias *H. tebenquichense*, aisladas y caracterizadas por el grupo de trabajo del Centro de Investigación y Desarrollo en

Nanomedicinas (CIDeN) de la Universidad Nacional de Quilmes (UNQ). Nosotros, particularmente, le dimos el nombre genérico de nanoarqueosomas (nanoARC), ya que las vesículas preparadas tienen un tamaño nanométrico, pero en otros trabajos de investigación y en bibliografía se suelen encontrar indistintamente como ARQ. Hablaremos en las siguientes páginas sobre las arqueobacterias, los ARQ, y lo que los hace tan interesantes.

4.4.1.1 Arqueobacterias y arqueolípidos: características distintivas

La clasificación biológica del árbol de la vida hasta ahora más aceptada es la propuesta por Carl Woese y colaboradores, que divide a todos los organismos en tres grupos en la categoría más alta: Bacteria, Archaea y Eukarya. Esta teoría asume que todos los seres vivos provienen de la temprana divergencia de un supuesto progenitor (progenote) en los tres dominios primarios. Para formularla, Woese se basó en las diferencias encontradas en la secuencia del ARN ribosomal de la subunidad menor. Él mismo explicaba los argumentos para la reestructuración del anterior sistema de dos imperios (formados por los grupos Eukariota y Prokariota) de esta manera: “la base de la sistemática ha cambiado; los criterios fenotípicos clásicos están siendo sustituidos por criterios moleculares. Las secuencias moleculares pueden revelar relaciones evolutivas de una manera y en una medida que los criterios fenotípicos clásicos, e incluso las funciones moleculares, no pueden” (Woese et al., 1990). Aun así, hay varios autores que discuten esta teoría (Cavalier-Smith, 1998; Hug et al., 2016; Ruggiero et al., 2015), pero no es el objetivo de este trabajo ahondar en esas discusiones.

Uno podría pensar que si las arqueobacterias están siendo agrupadas en un dominio diferente a las bacterias (aunque a priori parecerían ser un tipo de bacterias), eso debe deberse a que realmente cada grupo tiene características particulares con las que se distinguen del otro.

En cuanto a sus fenotipos generales, las arqueobacterias se asemejan a las bacterias ordinarias, y durante mucho tiempo se han considerado como tales. Sin embargo, en términos de un criterio estrictamente genealógico, las arqueobacterias no pueden considerarse en absoluto como bacterias ordinarias. No muestran más relación con

las bacterias ordinarias que con las células eucarióticas (Woese & Fox, 1977). A pesar de su parecido superficial con las bacterias ordinarias, las arqueobacterias difieren de ellas profundamente en muchos aspectos y, aunque se sabe relativamente poco, ya son evidentes algunos puntos específicos (Woese & Fox, 1977):

- Las paredes celulares de las arqueobacterias (a diferencia de las bacterias) carecen por completo de peptidoglicano. Las estructuras son, en cambio, extremadamente variadas y todas las principales líneas contienen al menos un género cuya pared es una cubierta proteica simple y regular.
- La maquinaria traduccional de las arqueobacterias presenta ARN de transferencia y ribosomales característicos, con algunas semejanzas, pero a la vez diferencias respecto a bacterias y eucariotas.
- Todas las arqueobacterias conocidas provienen de hábitats "especializados" o "extremos". Por eso se las conoce a todas como extremófilas. El tema de su clasificación estricta es algo que está en continua investigación (Williams et al., 2017), pero para simplificarlo, podemos decir que hay un gran grupo que son **halófilas extremas** (viven en salinas), otras que son **metanógenas** (habitan ambientes carentes de oxígeno y elevadas temperaturas), y otras **termófilas extremas** (encontradas a muy altas temperaturas) (Kates, 1993).
- Las arqueobacterias tienen lípidos análogos a los principales grupos de lípidos que se encuentran en otros organismos (glicolípidos, fosfolípidos, etc.). Pero éstos, en vez de enlaces tipo éster tienen enlaces éter, y las cadenas rectas de carbono son reemplazadas por cadenas de isoprenoides ramificadas.

Me detengo en la estructura lipídica ya que es lo más importante a destacar para este trabajo. Las principales diferencias entre los lípidos de arqueobacterias con bacterias y eucariotas pueden apreciarse en la **Figura 7 y Figura 8**.

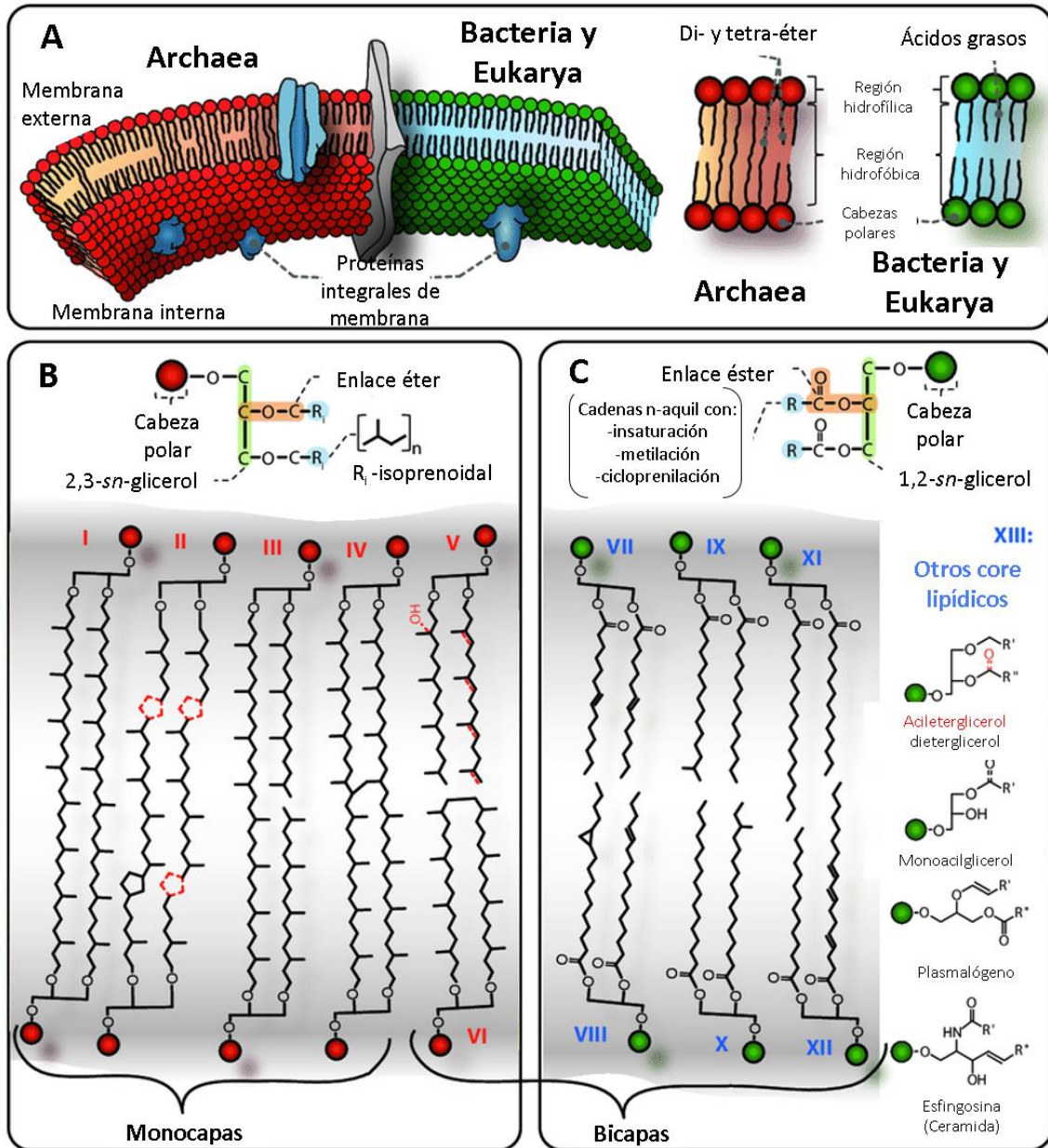


Figura 7: estructuras de lípidos polares de membranas de Archaea, Bacteria y Eukarya. Se muestran las membranas citoplasmáticas de arqueobacterias (en rojo), bacterias y eucariotas (en verde), y sus componentes principales (A). Las diferentes estructuras químicas de los lípidos del dominio Archaea y Bacteria/Eukarya se presentan junto con los lípidos centrales (core) más prominentes encontrados en estos organismos. Lípidos core típicos para Archaea: I- glicerol dialquil glicerol tetra-éter (GDGT) sin anillos de ciclopentano, II- GDGT con anillos de ciclopentano; III- glicerol trialquil glicerol tetra-éter (GTGT); IV- GDGT en forma de H; V- arqueol con posible hidroxilación o insaturación; VI- arqueol macrocíclico (B); lípidos core para Bacteria: diacilglicerol (DAG) que contiene distintas combinaciones de ácidos grasos (VII a X); lípidos core típicos para Eukarya: DAG que contiene diversas combinaciones de ácidos grasos (XI y XII); y otros tipos de core lipídicos (XIII) (C). Adaptado de (Kellermann, 2012).

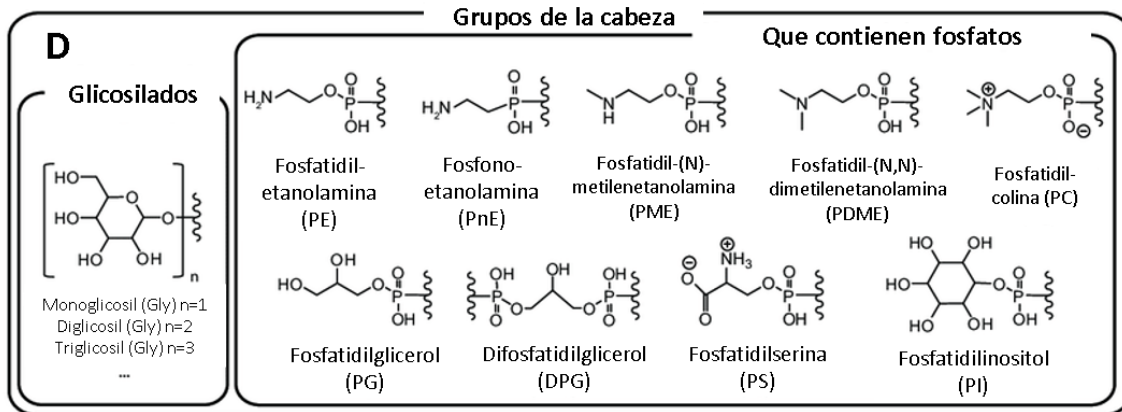


Figura 8: típicos grupos de la cabeza polar de los lípidos polares encontrados en Archaea, Bacteria y Eukarya. Los grupos polares más reconocidos son los que contienen fosfatos, entre ellos, fosfatidiletanolamina, fosfatidilserina y fosfatidilcolina. Adaptado de (Kellermann, 2012).

Los esqueletos hidrocarbonados de los lípidos de arqueobacterias son éteres de cadenas isoprenoides, mayormente fitanilos (20 C) y biftanilos (40 C), llamados arqueoles o lípido di-éter (2,3-di-O-difitanil-*sn*-glicerol) y caldarqueoles o lípido tetra-éter (2,2'-3,3'- tetra-O-dibifitanil-*sn*-diglicerol), respectivamente, unidos en una configuración *sn*-2,3 al glicerol (G. Dennis Sprott, 1992). En contraste, los lípidos de los dominios Eukarya y Bacteria son ésteres de cadenas de ácidos grasos lineales unidos en configuración *sn*-1,2 al glicerol, denominados glicerofosfolípidos (Kates & Kushwaha, 1995).

Los isoprenoides están involucrados en una amplia gama de funciones, y se encuentran tanto en las arqueobacterias como en bacterias, a diferencia de los ácidos grasos, cuya biosíntesis parece estar subdesarrollada en las arqueas (y en algunos organismos incluso ausente). El rasgo más divergente que se encuentra en la base de la división de los lípidos es la espina dorsal de glicerofosfato. El dominio Archaea contiene glicerol-1-fosfato como fracción de glicerofosfato mientras que las bacterias dependen de glicerol-3-fosfato (S. Jain et al., 2014).

Estas peculiares características hacen que los arqueolípidos presenten algunas ventajas respecto a sus pares bacterianos y eucariotas. Por ejemplo: los arqueolípidos polares son más resistentes a la hidrólisis en un amplio rango de pH, dado que las uniones éteres son más difíciles de hidrolizar que las uniones ésteres. Las cadenas isoprenoides son menos lábiles a la oxidación, en tanto la

configuración *sn*-2,3 otorga una resistencia a hidrólisis por fosfolipasas estero-específicas (G.Dennis Sprott et al., 1997).

Como dijimos anteriormente, en general, las arqueas prosperan en ambientes extremos. Los microorganismos halófilos extremos (o hiperhalófilos) se encuentran típicamente en las salinas a lo largo de las costas y los lagos hipersalinos, y se agrupan en la familia *Halobacteriaceae*. Muchos miembros de *Halobacteriaceae* se caracterizan por la presencia de pigmentos rojizo-anaranjados, llamados bacterioruberinas, en la membrana citoplasmática, que ayudan a eliminar la radiación UV y proteger las células de los efectos nocivos de la luz solar (Corcelli & Lobasso, 2006). Éstas viven en ambientes con concentraciones salinas que pueden exceder los 250 - 300 g/L (Oren, 1994). ¡El agua salada de los mares y océanos tiene en promedio una concentración de sales de 35 g/L!

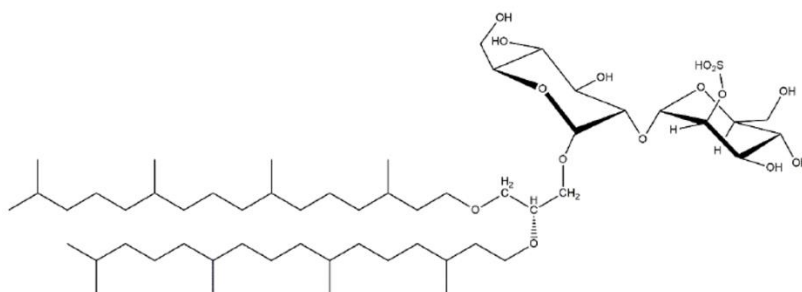
H. tebenquichense es una especie de arqueobacteria hiperhalófila, aislada por primera vez en el lago Tebenquiche, en el desierto de Atacama, Chile (Lizama et al., 2002). Posteriormente, en el 2003, investigadoras del CIDeN de la UNQ aislaron una cepa de *H. tebenquichense* de Salina Chica, Península de Valdés en la provincia de Chubut, Argentina. Los arqueolípidos polares totales (APT)¹⁹ se extrajeron mediante el método de Blight & Dyer y se caracterizaron mediante cromatografía en capa delgada (TLC) mono- y bi-dimensional (utilizando tinciones específicas) (María J. Morilla & Romero, 2011) y espectrometría de masa por ionización electrospray (ESI-MS) (Gonzalez et al., 2009), y se compararon contra los datos bibliográficos de composición lipídica de arqueobacterias halófilas extremas (Corcelli & Lobasso, 2006). Los cinco lípidos identificados fueron (**Figura 9**):

a) El sulfoglicolípido **SDGD-5**, 1-O-[α -D-manosa-(2'-SO₃H)-1'→2')- α -D-glucosa]-2,3-di-O-fitanil-sn-glicerol;

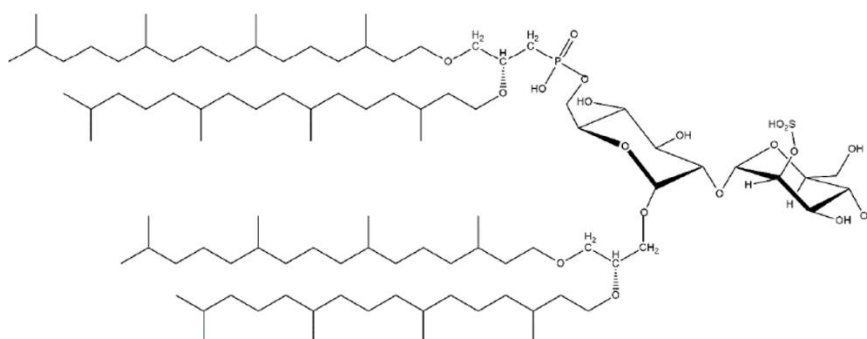
¹⁹ Los lípidos pueden clasificarse (según su polaridad) como polares y no polares (neutros). Los polares son aquellos que poseen una polaridad apreciable, o incluso carga eléctrica, y en los que se suele distinguir una región hidrófoba y una hidrófila. Estos son los que se describieron más arriba (glicerofosfolípidos, glicosilglicerolípidos, esfingofosfolípidos, esfingoglicolípidos). Los no polares son aquellos que no tienen carga eléctrica ni polaridad. Entre ellos se encuentran los ácidos grasos de más de 12 carbonos, los esteroides, los carotenoides, las ceras, los tocoferoles, etc.

- b) La cardiolipina glicosilada **SDGD-5-PA**, 1-O-[α -D-manosa-(2'-SO₃H)-1'→2')- α -D-glucosa]-2,3-di-O-fitanil-ácido fosfatídico-sn-glicerol;
- c) La cardiolipina **BPG**, sn-2,3-di-O-fitanil-1-fosfoglicerol-3-fosfo-sn-di-O-fitanilglicerol.
- d) El fosfolípido arqueol **PG**, 2,3-di-O-fitanil-sn-fosfatidilglicerol;
- e) El fosfolípido arqueol **PGP-Me**, 2,3-di-O-fitanil-sn-fosfatidilglicerofosfato metiléster;

a) SDGD-5



b) SDGD-5-PA



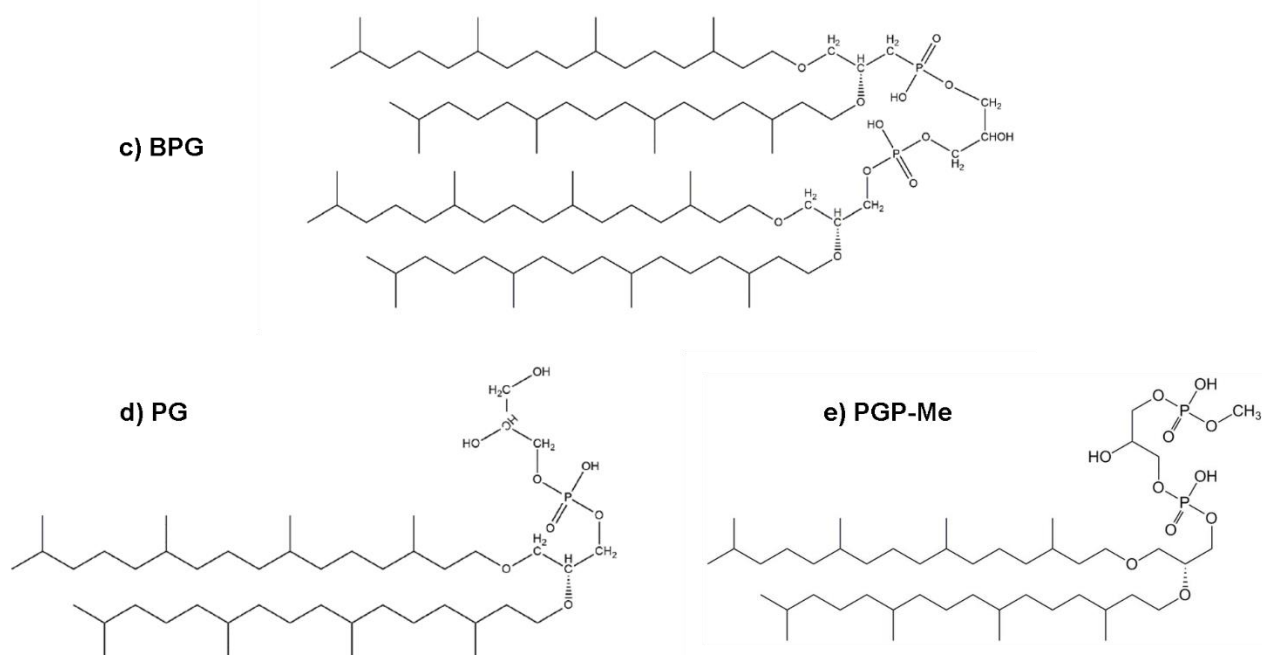


Figura 9: estructura química de los arqueolípidos polares totales extraídos del arquea hiperhalófila *H. tebenquichense*.

Estos APT fueron utilizados para preparar los nanoARC desarrollados en esta tesis.

4.4.1.2 Arqueosomas (ARQ)

Los ARQ, así como los liposomas, son nanovesículas, pero preparadas a partir de APT en vez de lípidos polares provenientes de organismos eucariotas o bacterianos. Se pueden encontrar en forma de bicapa (si se fabrican exclusivamente a partir de arqueoles o con mezclas lipídicas que contienen arqueoles y lípidos no arqueobacterianos), de monocapa (si se fabrican exclusivamente a partir de lípidos bipolares caldarqueoles) o como combinación de monocapas y bicapas (si están hechas de caldarqueoles y arqueoles u otros lípidos monopolares) (Kaur et al., 2015). Al igual que para los liposomas, la fase lamelar de los ARQ se genera por auto-asociación de los APT en medios acuosos que, tras un pequeño *input* de energía se sellan en forma de nanovesículas. Sin embargo, la relación de sección transversal cadena hidrocarbonada/grupo cabeza polar de los APT es aproximadamente el doble de la correspondiente de glicerofosfolípidos, lo que hace

a la superficie de los ARQ altamente entrópica, con una tensión superficial que es la mitad que la de los liposomas (Kitano et al., 2003; K. Yamauchi et al., 1997). Finalmente, la permeabilidad de los ARQ a protones y cationes sodio es aproximadamente tres veces menor que la de liposomas; la presencia de los arqueoles macrocíclicos o caldarqueoles en ARQ minimiza su permeabilidad al agua y pequeños solutos (Mathai et al., 2001; Van De Vossenberg et al., 1999).

La introducción de los ARQ al mundo de la vacunología se debió a los estudios realizados por Sprott y colaboradores a fines de los años '90 (G.Dennis Sprott et al., 1997). Luego, la utilización de ARQ como adyuvantes de vacunación se fue extendiendo de a poco a otros grupos de trabajo.

En lo que respecta a su efecto sobre la respuesta inmune, es sabido que ciertos ARQ aumentan el reclutamiento y activación de CPA como CDs y macrófagos (Lakshmi Krishnan et al., 2001; Tolson et al., 1996), inducen la expresión de moléculas coestimuladoras y generan respuestas de LT CD8+ aún en ausencia de LT CD4+ (Lakshmi Krishnan et al., 2001), tres estímulos importantes que otros sistemas vesiculares como liposomas, niosomas e ISCOMs no son capaces de inducir. Luego de su administración subcutánea inducen respuestas Th1, Th2 y LT CD8+ en forma antígeno-dependiente en superior magnitud a las inducidas por liposomas convencionales (Lakshmi Krishnan et al., 2001; G. D. Sprott et al., 2004). Adicionalmente, los ARQ generan memoria inmunológica incluso en ausencia de inflamación visible, a pesar de que la inflamación en la respuesta innata es la que conlleva a la aparición de la respuesta adaptativa (Dudani et al., 2002). Por ejemplo, ARQ preparados con APT de *Haloferax volcanii* y *Methanobrevibacter smithii* activan CDs en ausencia de producción de IL-12, relacionada con la respuesta inflamatoria inicial (G. D. Sprott et al., 2004). Las propiedades adyuvantes de los ARQ son independientes de la presencia de LPS, ya que, como dijimos, los mismos están ausentes en las arqueas (Eckburg et al., 2003); esto remarca otra diferencia entre ARQ y liposomas: para ejercer un efecto adyuvante sobre células del sistema inmune no deben agregarse inmunoestimuladores a los ARQ, lo que sí debe hacerse para generar repuesta utilizando liposomas. Asimismo, ARQ preparados

con APT de la metanógena *M. smithii* (conteniendo un 40% de caldarqueoles y un 30% en peso de arquetidilserina) son potentes inductores de adyuvancia debido a su particular interacción con las CPA (Lakshmi Krishnan et al., 2001). Estos ARQ inducen la expresión de moléculas coestimuladoras en CPA, lo que conduce a la liberación de citoquinas y otros reguladores inmunológicos (Lakshmi Krishnan & Sprott, 2008). ARQ conteniendo el antígeno OVA y el agregado de CaCl_2 también generaron adyuvancia luego de su administración intranasal en ratones induciendo respuestas de anticuerpos anti-OVA IgA en sueros, heces, bilis y muestras de lavado vaginal y nasal (Patel et al., 2007).

Si bien el mecanismo de inducción de la respuesta inmune no está del todo elucidado, se ha propuesto que los diversos grupos de la cabeza polar pueden facilitar interacciones inmunomoduladoras únicas con las CPA (G. D. Sprott et al., 2003).

Las ventajas en la utilización de ARQ como sistemas de vehiculización de agentes terapéuticos, con respecto a liposomas convencionales, radican en dos cuestiones: su elevada tasa de internalización celular (Higa et al., 2012; L. Krishnan & Sprott, 2003) y su estabilidad estructural. Dadas las características propias de los APT extraídos de arqueobacterias extremófilas, nanovesículas preparadas con estos lípidos, tendrán también características distintivas. Las cadenas isoprenoides completamente saturadas otorgan estabilidad frente a la degradación oxidativa (Benvegnu et al., 2009). Los enlaces éter son más estables que los ésteres en un amplio rango de pH (Patel et al., 2000). La estereoquímica inusual *sn* 2,3 de glicerol disminuye el ataque de las fosfolipasas liberadas por otros organismos (Patel et al., 2000; G. D. Sprott et al., 1996). La estructura ramificada de las cadenas alquil ayuda a reducir la temperatura de fusión y la permeabilidad de la membrana lo que confiere alta estabilidad térmica (Brown et al., 2009; Caimi et al., 2017; Choquet et al., 1992; G. D. Sprott et al., 1996). Por otra parte, con respecto a la seguridad y biocompatibilidad al aplicarlos como vacunas, los ARQ han demostrado ser bien tolerados y relativamente seguros en modelos de ratones de laboratorio, ya que no se detectaron anticuerpos anti-lípidos significativos ni hemólisis cuando se los

inyectó por vía subcutánea (Patel et al., 2002). Aún más, aunque hay arqueobacterias que son mesófilas y habitan en el cuerpo humano (intestino delgado, piel), a diferencia de bacterias y hongos, no se han identificado especies de patógenas hasta la fecha (Cavicchioli et al., 2003; Gill & Brinkman, 2011).

En nuestro grupo de investigación, utilizando los APT de *H. tebenquichense* preparamos vesículas de diámetro nanométrico y carga superficial negativa, que llamamos genéricamente nanoarqueosomas. Los nanoARC son seguros y tienen actividad adyuvante tras su administración subcutánea, generando títulos de anticuerpos similares a los obtenidos con la alúmina, sin generar inflamación ni irritación (Gonzalez et al., 2009). Fueron probados como vacunación profiláctica contra la enfermedad de Chagas y protegieron a animales modelo de un desafío letal con *Trypanosoma cruzi* (Higa et al., 2013) y también en combinación (mezclados) con la proteína modelo OVA, como adyuvantes de vacunación tópica, dando excelentes resultados en modelos de ratones (Caimi et al., 2017). La capacidad adyuvante de los nanoARC se debe a su elevada captura por CPA (Higa et al., 2016), que es varias veces mayor que la de liposomas preparados con fosfolípidos convencionales, tanto sintéticos como derivados de soja. Los trabajos de Julia Altube demostraron que su captura está mediada por el RS-A1 en macrófagos, debido a la presencia del arqueolípido con doble carga negativa PGP-Me, componente mayoritario de los lípidos polares (Altube, 2018; Altube et al., 2016). Debido a su alta tasa de captura, el RS de hemoglobina CD163 y los RS-A de clase 1 y 2 han atraído considerable interés como receptores para el *targeting* activo a macrófagos (Graversen et al., 2012; N. K. Jain et al., 2013).

En suma, sabemos que una nanovesícula que contenga APT de *H. tebenquichense*, en particular PGP-Me, será un eficiente agente para el *delivery* de material encapsulado a células que expresen RS-A1. Si ese material encapsulado es proteico (un antígeno, por ejemplo) puede además desencadenar una respuesta inmune. Aún más, si ese material encapsulado es una molécula inmunoestimuladora, podría desencadenar una fuerte respuesta inmune incluso en ausencia de un antígeno proteico.

4.4.1.3 Técnicas de preparación y caracterización de nanoARC

NanoARC y liposomas se pueden preparar de manera de obtener vesículas monodispersas con diámetros en el rango de los 100 a 200 nm utilizando las mismas técnicas de preparación y de caracterización fisicoquímica.

Una de las técnicas más utilizadas para la fabricación de nanovesículas es la hidratación de la película lipídica o el método de Bangham (Torchilin & Weissig, 2003). Brevemente, este método implica la disolución del lípido en un disolvente orgánico, la evaporación del disolvente y la dispersión de la película de lípidos obtenida, en medios acuosos. El agente terapéutico (molécula activa, antígeno proteico u otro) que se desea incorporar puede incluirse en los medios acuosos (para moléculas hidrófilas) o en la película de lípidos (para moléculas hidrófobas). Una de las desventajas de esta técnica es que la eficacia de encapsulación de las drogas solubles en agua es baja (5% -15%). Además, este método produce MLV grandes y no homogéneos que requieren procesos de sonicación o extrusión para generar LUV pequeños y homogéneos (Bozzuto & Molinari, 2015). Para asegurar el tamaño deseado, la lamellaridad y las propiedades de homogeneidad de los liposomas fabricados con esta técnica, se requiere un procesamiento de homogenización de tamaños. Los métodos más comunes para esto son la sonicación, la extrusión y la homogeneización a alta presión. La sonicación se usa para reducir el tamaño de las vesículas al dar energía a la suspensión de lípidos. Esto se puede obtener aplicando una irradiación ultrasónica a las suspensiones de MLV (Woodbury et al., 2006). El método de extrusión de membrana reduce el tamaño de los liposomas (LUV o MLV) haciéndolos pasar a través de un filtro de membrana con un tamaño de poro definido (Berger et al., 2001).

Los parámetros, que incluyen la forma, el tamaño, las características de la superficie y la lamellaridad, influyen fuertemente en el comportamiento biológico de los liposomas. Por lo tanto, deben caracterizarse ampliamente antes de su uso para garantizar el rendimiento *in vitro* e *in vivo*.

Varias técnicas están disponibles para la determinación y distribución del tamaño, entre las más aplicadas se incluyen la dispersión dinámica de la luz (DLS)

(Ostrowsky, 1993) y distintas técnicas de microscopía (Ruozi et al., 2011). Por ejemplo, usando tinción negativa y/o liofilización para microscopía electrónica de transmisión (TEM), TEM por criofractura (crio-TEM) y análisis de resonancia magnética nuclear (Bozzuto & Molinari, 2015). La técnica de DLS mide las fluctuaciones en la intensidad de la luz dispersada en función del tiempo. Éstas ocurren porque las partículas en una suspensión (por ejemplo, liposomas) experimentan un movimiento browniano aleatorio debido a las colisiones entre las partículas suspendidas y las moléculas del disolvente. El análisis de las fluctuaciones de intensidad permite la determinación de la distribución de los coeficientes de difusión de los liposomas, que se convierten en una distribución de diámetro hidrodinámico mediante la ecuación de Stokes-Einstein. DLS es un método simple y rápido que permite obtener como datos primarios el tamaño promedio (*Z average*) de las partículas y el índice de polidispersidad (PDI) (Hallett et al., 1991). El PDI indica el grado de variación de los valores de tamaños obtenidos y por lo tanto es un indicador de la homogeneidad de tamaños en la población; valores de PDI cercanos a 0 indican una población monodispersa, mientras que valores más cercanos a 1 indican una población altamente polidispersa. Por el contrario, las técnicas de microscopía electrónica, tales como TEM y crio-TEM proporcionan una determinación precisa del tamaño de los liposomas, ya que permiten la visualización de liposomas individuales y pueden resolver partículas de tamaño variable. El resultado es información exacta sobre el perfil de la población de liposomas en toda la gama de tamaños (Frederik & Hubert, 2005).

La carga adquirida por una partícula o molécula en un medio dado es su potencial ζ (potencial Zeta) y surge de la carga superficial y la concentración y tipos de iones en la solución. Dado que las partículas de carga similar se repelerán entre sí, las que tengan cargas elevadas resistirán la floculación y la agregación durante periodos más largos, haciendo que dichas partículas sean más estables. El potencial ζ es una medida de la magnitud de la repulsión o atracción entre las partículas. Si todas las partículas en suspensión tienen una gran diferencia de potencial ζ , mayor a +30 mV o menor a -30 mV, las cargas superficiales generan repulsión y no habrá tendencia a la agregación. Sin embargo, si las partículas tienen

valores bajos de potencial ζ , entre -30 y +30 mV, entonces no habrá fuerzas necesarias para evitar la agregación de las partículas. Por lo tanto, la medición de esta variable es relevante para evaluar y predecir la estabilidad de una formulación nanovesicular, por ejemplo, durante su almacenamiento (Hunter et al., 2001).

Hasta aquí, vimos todo lo referente a los nanoARC: sus características y sus modos de preparación y de caracterización. A continuación, veremos lo referente a nuestro segundo ligando de PRR, la imidazoquinolina IMQ.

4.4.2 Imidazoquinolinas agonistas a TLR7

Las imidazoquinolinas son moléculas sintéticas con estructura química análoga a los nucleósidos, similares a una base nitrogenada, pero sin la pentosa (**Figura 10**). El Imiquimod (así como el Resiquimod o el Gardiquimod) es un tipo de imidazoquinolina, su fórmula química es 1-(2-metilpropil)-1H-imidazo[4,5-c]quinolina-4-amina, su fórmula molecular es $C_{14}H_{16}N_4$ y su masa molar es 240,3 g/mol (Slade et al., 1998). Este tipo de moléculas fueron originalmente diseñadas como potenciales compuestos antivirales, y su descubrimiento y modo de síntesis fue patentado en el año 1987 (Gerster, 1987). Si bien el IMQ fue aprobado por primera vez en 1997, como tratamiento como verrugas genitales, formulado como una crema al 5% comercializado como Aldara™ (3M Pharmaceuticals, Saint Paul, MN, EE.UU.), recién en los años subsiguientes se fueron dilucidando todos sus mecanismos de acción. Al ser su estructura análoga a un nucleósido, y, por lo tanto, semejante al ARN viral, ejerce su acción a partir de su acoplamiento al TLR7 u 8 endosomal de CPA. Es decir, el IMQ es un ligando de TLR7 y 8, y partir de su unión a esos receptores induce la producción y secreción de citoquinas pro-inflamatorias e IFNs del tipo A, lo que a su vez incrementa los niveles de LTc y NK en el sitio de aplicación y genera una respuesta inmune potente (Bubna, 2015).

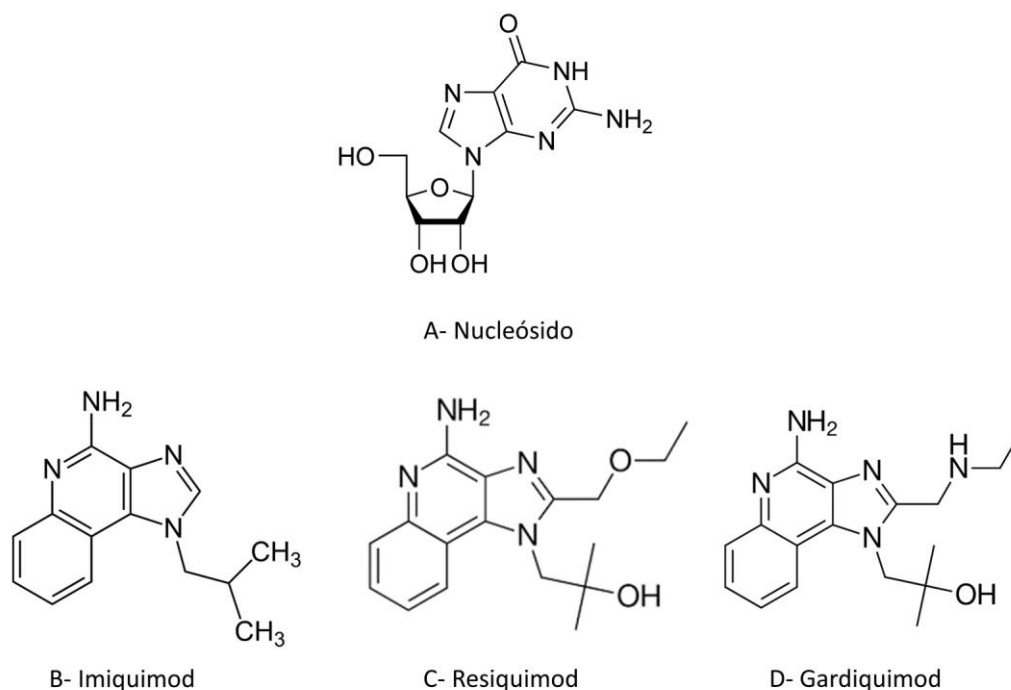


Figura 10: estructura química de un nucleósido (A) e imidazoquinolinas sintéticas análogas (B, C y D).

El IMQ es una molécula hidrófoba, altamente insoluble en sistemas acuosos, e incluso en ambientes ácidos: su solubilidad llega a ser tan solo de 1 mg/mL a pH cercanos a 2. La concentración de la crema comercial es de 5% (cada gramo de crema contiene 50 mg de IMQ), y es la concentración necesaria para lograr efectos terapéuticos en aplicaciones tópicas. Dada la solubilidad del IMQ, no es posible conseguir una formulación de esa manera en un sistema acuoso, por lo que se utiliza ácido isoesteárico (ISA) para formar una emulsión aceite-en-agua (O/W), con una combinación de monoestearato de sorbitano y polisorbato 60 como surfactantes, y aditivos como goma xántica, petrolato blanco y alcohol estearílico (entre otros) que le proveen viscosidad, estabilidad y mejores propiedades emolientes. Si bien otros ácidos grasos insaturados pueden utilizarse para disolver el IMQ (láctico, oleico, linoleico), el ISA ha probado ser el excipiente más estable (Chollet et al., 1999).

Su relativamente pequeño tamaño, así como su característica hidrofobicidad hacen del IMQ una molécula muy adecuada para usarse en tratamientos tópicos que

requieren la penetración de la barrera epidérmica, como por ejemplo el de tumores de piel. Si bien la formulación tópica de IMQ al 5% fue en principio aprobada por la FDA (Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos) para el tratamiento de verrugas perianales y genitales externas, y luego para el tratamiento de queratosis actínica y carcinoma basocelular superficial, se encuentra un gran campo de investigación y varios ensayos clínicos explorando su utilidad en diversas condiciones dermatológicas. Entre ellas, verrugas no genitales, melanoma, carcinoma de células escamosas, sarcoma de Kaposi, hemangioma infantil e infecciones de leishmaniasis (Bubna, 2015; Ryu & Yang, 2009). Ya en el 2015 el IMQ se convirtió en un genérico de amplia disponibilidad, y por esa razón su producción se ha extendido y es fabricado por diversas compañías. En Argentina, el Laboratorio Dr. Lazar & Cia. S.A.Q. es uno de los fabricantes de la crema comercial.

A nivel molecular, el IMQ activa tres mecanismos que actúan de manera sinérgica. El principal es el que el IMQ y otros compuestos similares (Resiquimod, por ejemplo) ejercen a través de la actividad agonista hacia TLR7 y 8, y la subsecuente activación de la vía dependiente de MyD88 (Hemmi et al., 2002; Jurk et al., 2002). MyD88 se asocia con el TLR y tras esta estimulación, recluta a la quinasa MAL asociada al receptor IRAK del TLR. IRAK se activa por fosforilación y luego se asocia con TRAF6, lo que lleva a la activación de dos vías de señalización distintas que llevan finalmente a la inducción de los factores de transcripción *proteína activadora 1* (AP-1) y NF- κ B (Shizuo Akira & Takeda, 2004). Los genes inducidos por el IMQ a través de este mecanismo incluyen las citoquinas pro-inflamatorias IFN- α , TNF- α , IL-2, IL-6, IL-8, IL-12, factor estimulante de colonias de granulocitos (GCSF) y el factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GMCSF), así como las quimiocinas CCL2, CCL3 y CCL4 (**Figura 11A**) (M.P Schön & Schön, 2007). El segundo es un mecanismo que genera la activación del NF- κ B y la producción posterior citoquinas pro-inflamatorias, pero de manera independiente del TLR. Esto se produce por el efecto antagonista del IMQ sobre el receptor de adenosina (AR). La activación de los receptores AR por adenosina extracelular lleva a activación de la enzima adenilil ciclasa, que convierte ATP en AMP cíclico (AMPc) en el

citoplasma celular. Esta acumulación intracelular AMPc genera una inhibición en la transcripción de genes de citoquinas pro-inflamatorias y, por lo tanto, la desregulación de la respuesta inmune. Entonces, la unión antagonista del IMQ al AR resulta en una menor activación de la adenilil ciclasa y una menor acumulación de AMPc, lo que provoca una disminución en la inmunosupresión (Michael P. Schön et al., 2006) **(Figura 11B)**. Finalmente, el tercer mecanismo que desencadena el IMQ es la actividad pro-apoptótica directa sobre células cancerosas. Esta actividad no ha sido totalmente dilucidada, pero parece ser dependiente de la activación de las caspasa-9 y caspasa-3 a partir de su acción sobre las proteínas Bcl-2 en las mitocondrias, aunque sí se sabe que es generada con concentraciones 5-10 veces más altas que las necesarias para activar la vía dependiente del TLR (M.P Schön & Schön, 2007) **(Figura 11C)**.

Todas las citoquinas y quimiocinas inducidas por el IMQ favorecen un microambiente dominado por un perfil de respuesta Th1, dando como resultado general una fuerte respuesta celular y consiguiente actividad antitumoral (Sullivan et al., 2003; Urosevic et al., 2003). Hay una clara evidencia clínica y experimental de que el IMQ actúa en la interfaz entre la inmunidad innata y la adaptativa (Hurwitz et al., 2003). La numerosa cantidad de genes involucrados en la regulación de las funciones de la inmunidad innata es lo que puede explicar varias de las más importantes respuestas celulares al IMQ: estimulación funcional de LTc, migración de CDs al sitio de aplicación, cambios en la función de la barrera epidérmica, inducción de otras citoquinas independientes de NF- κ B (como IFN- γ), entre otras. Las CDs cutáneas son las principales implicadas, ya que se activan frente a concentraciones mucho más bajas de IMQ que otras células, y desencadenan la respuesta celular. Además, el IMQ aplicado tópicamente induce la maduración de células de Langerhans epidérmicas y estimula su migración hacia ganglios linfáticos cercanos en donde presumiblemente promueven una respuesta LTc específica (M.P Schön & Schön, 2007). Incluso se ha visto que, a nivel celular, el IMQ utilizado como adyuvante de vacunación con antígenos tumorales (Shackleton et al., 2004) o no tumorales (Loré et al., 2003; Thomsen et al., 2004; Zuber et al., 2004), aumenta la activación e inmigración de células T citotóxicas; y que incrementa fuertemente

la activación antígeno-específica de células T antitumorales (Prins et al., 2006; Rechtsteiner et al., 2005) y antimicrobianas (Othoro et al., 2009; W. W. Zhang & Matlashewski, 2008). Además de la ya nombrada activación de CDs, otros efectos que provoca el IMQ incluyen la activación de una enzima asociada con la estimulación de células NK (Navi & Huntley, 2004) y la inducción de perforina en LTc (Ambach et al., 2004), procesos que contribuirían a agudizar la actividad antitumoral. Aun así, un dato notable es que, a pesar de que la evidencia señala como resultante una respuesta tipo Th1 en la mayoría de las condiciones clínicas y experimentales testeadas, el IMQ también es capaz de estimular la proliferación de LB *in vitro* (Tomai et al., 2000) y la producción de anticuerpos por parte de estas células (Hengge & Ruzicka, 2004), una función que se rige típicamente de una manera dominada por el perfil Th2 (aunque las bases de este mecanismo son inciertas). Además, como se describió anteriormente, el IMQ se une de manera antagonista al AR, y dado que las vías de señalización mediadas por AR pueden suprimir la transcripción de las citoquinas pro-inflamatorias, es concebible que el imiquimod contrarreste este mecanismo de retroalimentación negativa (que normalmente limita las reacciones inflamatorias) (M.P Schön & Schön, 2007).

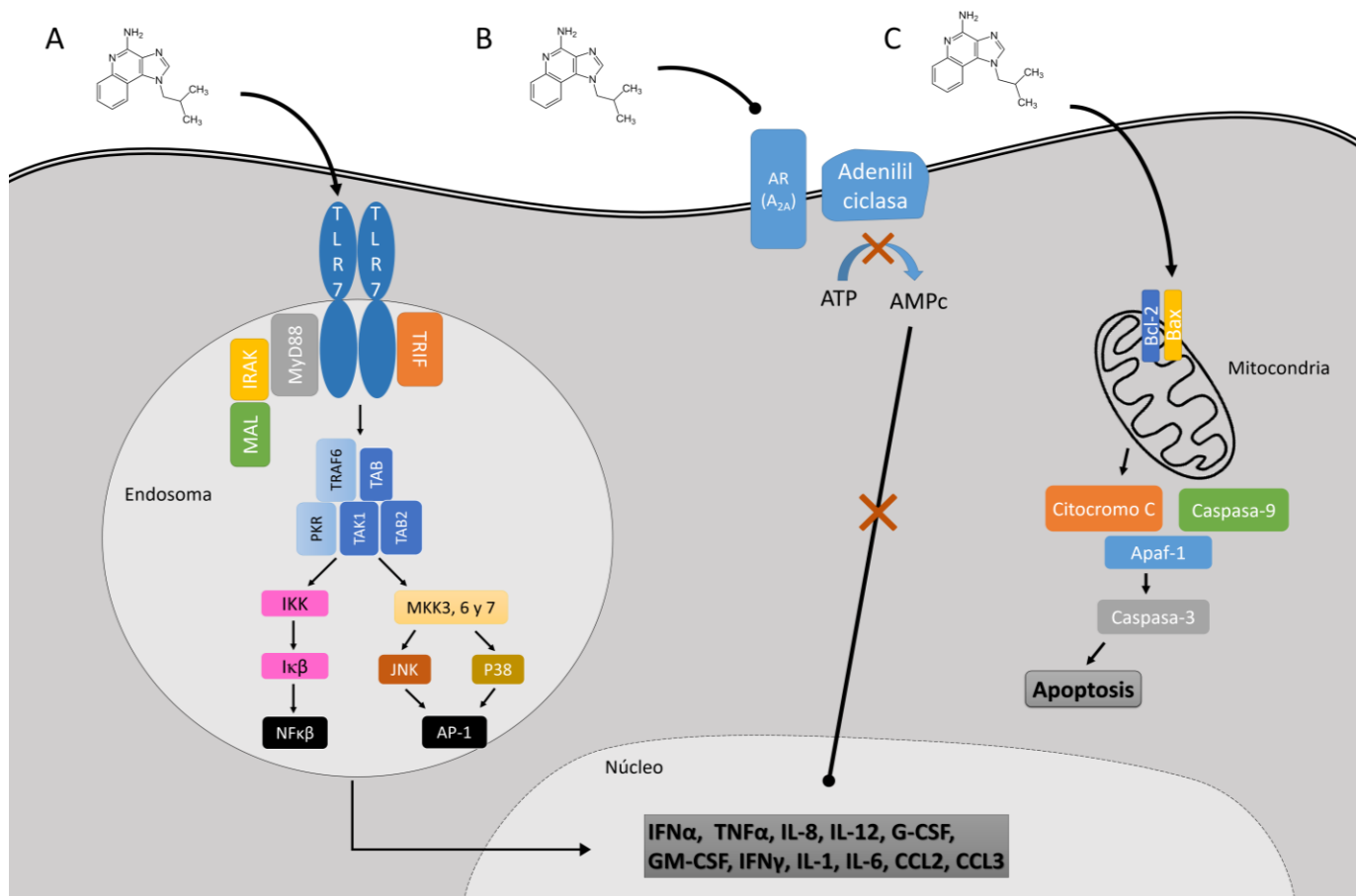


Figura 11: mecanismos de acción del IMQ. El IMQ ejerce su efecto a través de tres vías moleculares de señalización. La principal (A) es aquella en la que se une al receptor TLR7 (u 8) y desencadena una cascada dependiente de la proteína MyD88 que conlleva a la activación de los factores de transcripción nuclear NF-κβ y proteína activadora 1 (AP-1). La translocación del factor central NF-κβ al núcleo lleva a la activación de genes de citoquinas y quimiocinas pro-inflamatorias como IFNα, TNFα, IL-8, IL-12, G-CSF, GM-CSF, CCL2, CCL3, entre otras. AP-1, por otro lado, está involucrado en la regulación del crecimiento, diferenciación y muerte celular. Este efecto del IMQ se logra con concentraciones bajas de la molécula (cerca de 20 μM). El segundo efecto (B) es que logra a partir de su interacción con la vía de señalización del receptor de adenosina (AR) A_{2A}, también a bajas concentraciones. En este caso, al interactuar con el AR el IMQ inhibe la producción del mediador AMP cíclico (AMPc) catalizado por la enzima adenilil ciclasa. De esta manera se genera un feedback negativo que impide la acción anti-inflamatoria del mediador. En tercer lugar (C), el IMQ ejerce un efecto pro-apoptótico directo sobre ciertas células tumorales a altas concentraciones (aproximadamente 200 μM), presumiblemente por la activación de la vía mitocondrial a partir de las proteínas Bcl-2/Bax. El resultado general del modo de acción del IMQ es una profunda actividad contra tumores de varios orígenes. Adaptado de (M.P Schön & Schön, 2007; Michael P. Schön et al., 2006). En el esquema, las flechas indican activación y las puntas romas y las cruces indican inhibición.

Este estallido en la producción de citoquinas pro-inflamatorias (y sus consecuentes implicaciones ya nombradas) se complementa, además, con una actividad pro-apoptótica directa (T. Meyer et al., 2003; Schön et al., 2003; Michael P. Schön et al.,

2004; Sidbury et al., 2003; Sullivan et al., 2003; Vidal et al., 2004) que contribuye al efecto antitumoral general del IMQ.

El IMQ es una molécula interesante para ser explotada en aplicaciones alternativas a las que ya se está utilizando. En primer lugar, es un ligando conocido, caracterizado y ampliamente estudiado. En segundo lugar, está aprobado por la FDA para su uso en humanos, lo que es una ventaja frente otros ligandos que, si bien han probado ser eficaces a nivel pre-clínico, aún no han logrado atravesar etapas de ensayos clínicos, como, por ejemplo, poli I:C y sus derivados (agonistas del TLR3 y de RLRs) (Martins et al., 2015). Finalmente, el IMQ es producido por un laboratorio nacional, por lo que su adquisición es más sencilla y su precio más accesible en comparación con cualquier otra molécula de alta pureza que deba ser adquirida en una empresa multinacional, como InvivoGen o SigmaAldrich, clásicas comercializadoras de productos para investigación y desarrollo (I+D). Catálogos disponibles online en <https://www.invivogen.com/ligands> o <https://www.sigmaaldrich.com/>.

4.5 Objetivos generales y específicos de esta tesis doctoral

El objetivo general fue diseñar y producir nanovesículas multiefectoras (NaMu o nanoARC-IMQ), es decir, nanovesículas que contengan dos ligandos dirigidos a dos tipos diferentes de PRR, y testear su actividad inmunoterapéutica. Para ello propusimos como objetivos específicos:

- 1- Sintetizar y caracterizar fisicoquímicamente NaMu, es decir, nanoARC (con APT de *H. tebenquichense*, ligandos de RS-A1) que contengan IMQ (ligando de TLR7)
- 2- Comprobar su actividad como adyuvante de vacunación profiláctica en un modelo pre-clínico utilizando el antígeno de *Leishmania amazonensis*
- 3- Testear su actividad como inmunoterapia activa inespecífica frente a una infección aguda de *Trypanosoma cruzi* en un modelo pre-clínico

Cabe destacar que, hasta el momento, es la primera vez que se intenta combinar un tipo de nanovesículas con ligandos naturales (nanoARC), con un inmunomodulador, para conseguir nanovesículas multiefectoras (NaMu, es decir, con doble *target*). La hipótesis que manejamos es la siguiente: dada la alta tasa de captura de los nanoARC por parte de CPA (sobre todo macrófagos), que tienen el RS-A1 en su superficie (Altube et al., 2016), el IMQ incorporado en los nanoARC ingresará en una alta proporción al interior celular y alcanzará los TLR7 presentes en endosomas y lisosomas, generando una respuesta inmune mayor a la que se hubiera logrado con el IMQ solo. Esta respuesta no se daría por los nanoARC per sé, sino porque el IMQ sería capaz de ingresar al espacio intracelular de manera masiva (debido a la EMC que sufren los nanoARC), lo cual no es posible de lograr por difusión simple de la molécula a través de la membrana celular. Esto nos proporcionaría la ventaja de: a) desencadenar una respuesta inmune similar a la del IMQ solo, administrando menores dosis, o b) desencadenar una respuesta inmune mucho más alta que la del IMQ solo, administrando la mayor dosis posible (**Figura 12**). Verán cuales fueron los resultados en los capítulos siguientes.

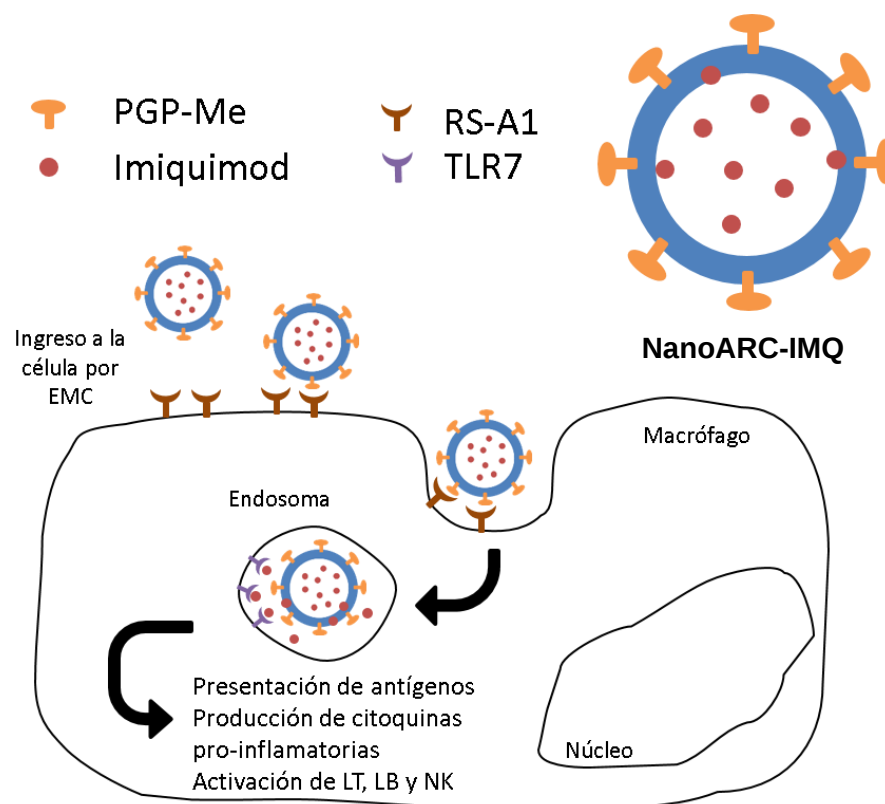


Figura 12: esquema simplificado de nuestra hipótesis de trabajo. Los nanoARC-IMQ (vesículas inmunomoduladoras que contienen dos ligandos de PRR) serán endocitados mediante EMC gracias al RS-A1 expresado por CPA (especialmente macrófagos) y, por la vía endo-lisosomal llevarán el IMQ, concentrando su efecto en un sitio intracelular determinado, haciendo que éste se encuentre más disponible para acoplarse a los receptores TLR7.

5 Diseño y caracterización de nanoarqueosomas con imiquimod (nanoARC-IMQ) dirigidos a macrófagos

5.1 Objetivos

Este capítulo está dedicado a describir el trabajo de diseño y preparación de los nanoarqueosomas con imiquimod incorporado (nanoARC-IMQ), su caracterización estructural y el estudio de su performance como inmunomoduladores *in vitro* (sobre cultivos celulares de macrófagos murinos) y como adyuvantes de vacunación *in vivo* (utilizando proteínas modelo del parásito de *Leishmania amazonensis* en ratones BALB/c).

5.2 Introducción

5.2.1 Problemas asociados a las formulaciones de IMQ

El IMQ es una molécula que modifica la respuesta inmune y está aprobada por la FDA para el tratamiento de queratosis actínica, lesiones superficiales de carcinoma de células basales, y varias otras lesiones cancerosas de piel (Papadavid et al., 2007). La crema comercial Aldara™, fue la primera en ser aprobada en el año 1997, y a partir de ese hito se han testado en varios ensayos clínicos diversas formulaciones de IMQ en crema para distintos tipos de lesiones de la piel y algunas enfermedades infecciosas (Ryu & Yang, 2009). Ya en el 2015 el IMQ se convirtió en un genérico de amplia disponibilidad, y por esa razón es de fácil adquisición. En Argentina, el Laboratorio Dr. Lazar & Cia. S.A.Q. es uno de los fabricantes de la crema comercial y nos ha donado muy amablemente IMQ en polvo en varias ocasiones.

Sin embargo, lograr una formulación estable y activa es una tarea engorrosa. No solo lo fue para nosotros, sino para otros autores también (Gogoll et al., 2012). Esto se debe principalmente a la baja solubilidad de la molécula en sistemas acuosos con pH neutro (agua o buffers comúnmente utilizados, como Tris-HCl o PBS). Hay muy pocos agentes orgánicos capaz de disolver eficientemente el IMQ. El que ha sido más utilizado es el ISA, el componente poco estable y relativamente tóxico de la crema comercial Aldara™ (Chollet et al., 1999). Como señala Chollet, en sistemas acuosos, el IMQ se comporta como una típica base débil e incluso en condiciones de pH extremadamente ácidas no es posible disolver más de 1 mg/mL. En el mismo trabajo se probaron más de 70 compuestos orgánicos para solubilizar el IMQ y se encontró que las mayores solubilidades eran logradas con ácidos grasos de cadena larga, como el ISA, el oleico y el linoleico (Chollet et al., 1999).

Y, por otro lado, si bien su aplicación de forma tópica para tratar lesiones externas de la piel se encuentra ampliamente aprobada, su uso en ciertos tipos de ensayos

preclínicos de inmunización transcutánea²⁰, sin embargo, es limitado. En general, las aplicaciones de inmunizaciones transcutáneas suelen provocar potentes respuestas de anticuerpos y de LTc primarias debido a su acceso directo a células de Langerhans de la piel, que son altamente capaces de presentar antígenos e inducir LTc. Sin embargo, en el caso del IMQ, la respuesta inmune primaria ante epitopes de LTc decae luego de pocos días, requiriéndose coestimulación mediada por CD40 para que se sostenga en el tiempo y lograr una efectiva formación de LTc de memoria (Warger et al., 2007). Tanto la crema comercial Aldara™, al igual que otros *carriers* particulados para IMQ desarrollados preclínicamente, como nanopartículas lipídicas sólidas (Zhou et al., 2007), liposomas (Fox et al., 2014), nanogeles (Stein et al., 2014), o emulsiones (Lopez et al., 2017), liberan el IMQ en el sitio de aplicación a partir de la degradación estructural de la partícula *carrier* (Chollet et al., 1999). Y todo el IMQ que se propaga más allá del sitio de aplicación ha sido identificado como fuente de toxicidad sistémica (Mifsud et al., 2014; Steinhagen et al., 2011). Asimismo, el IMQ induce una inhibición moderada – independiente del TLR7– de la actividad de la adenilil ciclasa, impartiendo un mecanismo de retroalimentación negativa que normalmente aumenta aún más las reacciones inflamatorias (Michael P. Schön et al., 2006). Teniendo en cuenta estas cuestiones, es necesario pensar en el desarrollo de una formulación nanoparticulada que contenga una concentración adecuada de IMQ de manera tal que pueda llegar eficientemente a las células blanco y ejercer sobre ellas su efecto inmunomodulador sin propagarse por otros sitios generando toxicidad sistémica o inflamación exacerbada.

5.2.2 Hacia una formulación estable y poco tóxica de IMQ

Las arqueobacterias proporcionan una fuente única, atractiva y renovable para conseguir nuevos biomateriales. Los arqueolípidos, con naturaleza difitanol-glicerol-

²⁰ Refiere a la aplicación de una vacuna directamente sobre la piel intacta sin la utilización de agujas. Se aprovecha la red inmunitaria de la piel para inducir una respuesta protectora contra los antígenos aplicados de manera tópica. Este modo de vacunación presenta un enfoque novedoso y atractivo: es seguro, no invasivo y supera muchas de las limitaciones asociadas con las administraciones basadas en aguja.

di-éter, cadenas isoprenoides y estereoisomerismo diferente a aquellos lípidos producidos bacterias, son los responsables de la peculiar “anormalidad de la membrana” descripta para las bicapas de arqueobacterias (Eme et al., 2017) (ver 4.4.1.1). En un medio acuoso, los arqueolípidos polares forman ARQ o nanoARC: nanovesículas de tamaño micrométrico o submicrométrico (respectivamente), con diferencias químicas, físicas y biológicas respecto a liposomas ordinarios. Como hemos anticipado, en particular, los nanoARC preparados con arqueolípidos polares que se extraen de la arqueobacteria *H. tebenquichense* contienen ligandos de RS-A1 (Altube et al., 2016).

Nuestra ya conocida hipótesis es que los nanoARC preparados a partir de lípidos extraídos de *H. tebenquichense* pueden funcionar como *carriers* de IMQ, que resuelvan el problema de la baja solubilidad asociada a este ligando de TLR7.

Lo que aquí propusimos fue modificar la farmacodinamia del IMQ mediante su incorporación dentro de nanoARC. De esta manera, los nanoARC, blancos naturales de macrófagos que expresen RS-A1, llevarán el IMQ por la vía endo-lisosomal y concentrarán su efecto en el sitio intracelular específico donde son expresados los TLR7. Un cambio de un mecanismo de entrada del IMQ libre a la célula mediado por difusión simple, a otro mediado por *uptake*²¹ de los nanoARC con IMQ incorporado (nanoARC-IMQ) por células con el receptor RS-A1, llevará a la distribución masiva de IMQ dentro del sistema endo-lisosomal, concentrando su actividad solo en aquellas células que expresen tanto el receptor RS-A1 como el TLR7. Esto mejoraría la inmunogenicidad del IMQ, reduciendo, al mismo tiempo, su biodisponibilidad sistémica y, con eso, sus efectos adversos *in vivo*. Nuestro sistema, además, podría evitar la inhibición de la adenilil ciclasa por la capacidad de *targeting* específico al RS-A1 y, a su vez, por la ausencia del ISA responsable del efecto inflamatorio adicional independiente de TLR7 (Walter et al., 2013),

²¹ Se traduce literalmente como consumo o recepción, pero lo utilizamos como captura o incorporación (de un material por una determinada célula). Ver 4.1.4.

disminuirían las chances de generar una inflamación sistémica y potencial toxicidad (Heikkinen & Susitaival, 2011).

Las características estructurales distintivas de las bicapas arqueolípídicas podrían ayudar a incorporar el IMQ *particionado*²², evitando el uso de ISA. La falta de complejos pasos de manufactura que implican la unión covalente de un ligando es otro beneficio adicional que facilitaría la caracterización analítica, la reproducibilidad entre batchs y la adaptación a la producción en mayor escala de esta formulación (Korsmeyer, 2016; Landesman-Milo & Peer, 2016).

5.2.3 El dilema *in vitro* – *in vivo*

Una de las cuestiones más importantes a tener en cuenta a la hora de diseñar nuevos materiales nanoparticulados es la posible toxicidad que éstos pueden causar a los organismos que los incorporen. Como sabemos, a medida que el tamaño de las partículas disminuye hasta la escala nanométrica, el área superficial relativa aumenta drásticamente, lo que origina nuevas propiedades estructurales, pero, a su vez, las hace biológicamente más activas (revisar sección 4.1.1). El uso de material nanoparticulado con fines terapéuticos puede causar también efectos adversos no deseados, por lo tanto, es imperativo primero realizar una correcta caracterización del material para luego llevar a cabo estudios preclínicos de toxicidad, tanto *in vitro*, como *in vivo* (Dhawan & Sharma, 2010). Los ensayos *in vitro* de toxicidad pueden incluir medición de actividades enzimáticas, potencial de membrana celular, expresión de marcadores superficiales, liberación de citoquinas, etc. para los que se utilizan normalmente kits comerciales. Al ser ensayos que se realizan con cultivos celulares, debido a la facilidad de ejecución, control e interpretación de los resultados, son la primera opción que eligen la mayoría de los investigadores que trabajan con nanomateriales (Kong et al., 2011). Para diseñar racionalmente ensayos cuyos resultados sean significativos y mínimamente extrapolables, hay que tener en cuenta que el efecto tóxico de las NPs depende

²² Esto significa que el IMQ no estaría disuelto en el interior de los nanoARC ni interaccionando en su superficie, sino fraccionado (atrapado) entre su bicapa lipídica.

principalmente de los órganos, y más específicamente, de los tipos celulares que éstas encuentran al administrarse. Cada tejido puede variar en cuanto a fisiología celular (no es lo mismo un tejido epitelial que un tejido linfoide), estado de proliferación (células tumorales tienen altas tasas de división en comparación con células en reposo), características de la membrana (ciertos tipos celulares tienen mayor fluidez en su membrana) o capacidad fagocítica (CDs y macrófagos son los encargados de capturar materiales particulados circundantes, por ejemplo). Con el fin de relevar el efecto de las NPs sobre las células de interés, el ensayo de citotoxicidad debe incluir células que representen la ruta de exposición y los órganos a los que va dirigida la terapia (Kong et al., 2011). La selección del ensayo de citotoxicidad apropiado es vital para la evaluación de la toxicidad de las NPs, ya que éste medirá el grado de muerte celular causada por las NP. Actualmente, la mayoría de los estudios en esta área de investigación utilizan modelos de cultivo celular, en los que los resultados solo pueden considerarse como exploratorios. Es necesario, una vez que se identifican los órganos y las células específicas, complementar los estudios *in vitro* con estudios *in vivo* (H. C. Fischer & Chan, 2007). Estas pruebas, que implican la utilización de animales de laboratorio, a diferencia de las *in vitro*, son más costosas, requieren mucho más tiempo de trabajo y conllevan problemas éticos (Dhawan & Sharma, 2010). Sin embargo, son necesarias: los resultados de los experimentos en cultivos celulares podrán ayudar a dilucidar relaciones entre la estructura y la actividad e interacciones biológicas de los nanomateriales con las células determinadas, pero por ahora no reemplazan al uso de animales de laboratorio, sobre todo en lo que respecta a investigación preclínica en el área de vacunas (Nandedkar, 2009).

Por estas razones, los pasos que se siguieron luego de la preparación de las nanovesículas fueron: 1) caracterización fisicoquímica utilizando distintas metodologías; 2) estudios exploratorios de su citotoxicidad y respuesta inmune mediada por citoquinas en un modelo de células de macrófagos de ratones en cultivo celular; y 3) testeo de su performance como adyuvantes de vacunación con proteínas modelo del parásito causante de la leishmaniasis mucocutánea en ratones de laboratorio.

5.3 Materiales y métodos

5.3.1 Materiales

Fosfatidilcolina de soja (SPC, pureza >90%) fue una donación de Lipoid (Ludwigshafen, Alemania) e Imiquimod (pureza >98%) de Laboratorio Dr. Lazar (Buenos Aires, Argentina). MONTANIDE™ ISA 763 A VG fue adquirido en Seppic (Puteaux, Francia), Hypaque en Winthrop Products (Buenos Aires, Argentina), Medio Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640 Gibco™ en Thermo Fisher Scientific Inc. (Waltham, MA, Estados Unidos), solución de antibiótico/antimicótico (penicilina 10.000 IU/mL, sulfato de estreptomicina 10 mg/mL, anfotericina B 25 µg/mL), glutamina, tripsina/ácido tetraacético de etilendiamina y Ficoll en GE Healthcare (Múnich, Alemania). Suero Fetal Bovino (SFB) en Internegocios (Córdoba, Argentina). Concanavalina A (ConA), Forbol-12-miristato-13-acetato (PMA), Laurdan, saponina, éster de succinimidil-carboxifluoresceína (CFSE), bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (MTT), ácido 2'2-azino-bis-(3-etilbenzotiazol-6-sulfónico) (ABTS), lipopolisacáridos de *Escherichia coli* O26:B6 (LPS) y albúmina sérica bovina (BSA) en Sigma Aldrich (San Luis, MO, Estados Unidos). Los demás reactivos utilizados de grado analítico fueron adquiridos en Anedra, Research AG (Buenos Aires, Argentina).

5.3.2 Crecimiento de arqueobacterias, extracción y caracterización de arqueolípidos polares totales

Arqueobacterias *H. tebenquichense* fueron aisladas de muestras de suelo de Salina Chica, Península Valdés (Chubut, Argentina) y crecidas en un biorreactor de acero inoxidable de 25 L con volumen final de 15 L con medio basal suplementado con extracto de levadura y glucosa a 40°C. Los cultivos fueron monitoreados mediante absorbancia a λ 660 y 490 nm y extraídos luego de 96 horas de crecimiento. Los arqueolípidos totales fueron extraídos a partir de la biomasa usando el método *Bligh and Dyer* modificado para microorganismos halófilos extremos y la fracción de arqueolípidos polares totales (APT) fue recolectada por precipitación con acetona

fría (Kates & Kushwaha, 1995). De cada cultivo batch fueron aislados entre 400 y 700 mg de APT. La reproducibilidad de la composición de cada extracto fue monitoreada de rutina por el contenido fosfatos (Böttcher et al., 1961), cromatografía de capa delgada y espectrometría de masa por ionización de electrospray, como se encuentra descrito en (Higa et al., 2012).

5.3.3 Preparación del antígeno total de *Leishmania amazonensis*

El antígeno total de *L. amazonensis* (TLA) fue preparado como lo describe (Cargnelutti et al., 2016). Los promastigotes de *L. amazonensis* cultivados hasta fase log fueron recolectados por centrifugación, lavados tres veces con PBS y disgregados con seis/ocho ciclos de congelamiento (-80°C) y calentamiento (56°C). El contenido de proteínas fue estimado por el ensayo de ácido bicinconínico (Micro BCA Protein Assay Kit, Thermo Fisher Scientific Inc.). El ensayo BCA se basa en la conversión del Cu^{2+} a Cu^{1+} en condiciones alcalinas (definida como la reacción de Biuret), influenciada por cuatro aminoácidos (cisteína, cistina, tirosina y triptófano) y por la cadena peptídica. BCA es un reactivo cromogénico específico para Cu^{1+} y en el segundo paso de la reacción dos moléculas de BCA reaccionan con una de ion Cu^{1+} . La cantidad de Cu^{2+} reducido es función de la concentración de proteínas y se determina espectrofotométricamente por un cambio en el color de la solución a púrpura, que absorbe a 562 nm. La absorbancia es directamente proporcional a la cantidad de proteína presente en la solución y se estima por comparación con un estándar de proteína conocido, como la BSA (P. K. Smith et al., 1985).

Los antígenos fueron almacenados en congelador a -70°C hasta su uso.

5.3.4 Preparación de nanoARC-IMQ y LIPO-IMQ

Nanoarqueosomas hechos con APT de *H. tebenquichense* (nanoARC), nanoarqueosomas cargados con IMQ (nanoARC-IMQ), liposomas hechos de SPC (LIPO) y liposomas hechos de SPC cargados con IMQ (LIPO-IMQ) fueron preparados mediante el método de hidratación del film lipídico. De manera breve, para preparar nanoARC y LIPO, 50 mg de APT o SPC, respectivamente, disueltos

en cloroformo:metanol 1:1 (v/v) fueron colocados en tubos Eppendorf de 2 mL con fondo en U. Los films lipídicos fueron formados al evaporar el solvente orgánico bajo flujo de N₂. Luego, los films fueron hidratados con 1 mL de buffer Tris-HCl 10mM pH 7,4 con 0,9% p/p de NaCl (buffer Tris-HCl).

Para preparar nanoARC-IMQ y LIPO-IMQ, los films lipídicos fueron hidratados con 1 mL de solución de IMQ 2 mg/mL en ácido láctico 100 mM (LH) bajo agitación.

Para remover el IMQ no incorporado, nanoARC-IMQ y LIPO-IMQ fueron lavados tres veces por centrifugaciones a 35000 g durante 15 minutos, seguido por la remoción del sobrenadante y la resuspensión del pellet en volumen idéntico de LH hasta que no se detectó más IMQ en el medio de lavado. Luego los pellets fueron resuspendidos en 1 mL de buffer Tris-HCl. Finalmente, las nanovesículas fueron sonicadas durante 1 hora en sonicador de baño (80 W, 80 KHz). Para determinar la potencial liberación de IMQ de las nanovesículas causada por la sonicación, la relación imiquimod/fosfolípidos (IMQ/PL) fue medida en nanoARC-IMQ y LIPO-IMQ preparados como se indicó arriba, excepto que la mitad de los pellets finales fueron lavados con buffer Tris-HCl y la otra mitad con LH. La relación IMQ/PL se puede estimar con precisión en LH ya que el IMQ se mantiene soluble, no habiendo co-precipitación con los pellets. En cambio, puede haber una sobre estimación de la relación IMQ/PL en los pellets lavados con buffer Tris-HCl, debido a que el IMQ insoluble liberado de las bicapas puede co-precipitar con los pellets. Los fosfolípidos e IMQ en los pellets y sobrenadantes fueron cuantificados como se describe más abajo. El ratio IMQ/PL de cada pellet fue calculado antes y después de la sonicación.

Para evaluar una posible liberación del IMQ de las vesículas luego de una dilución, 1 mL de nanoARC-IMQ y LIPO-IMQ recién preparados fueron lavados por centrifugación 15 minutos a 35000 g, el sobrenadante fue removido y el pellet resuspendido en 900 µL de buffer Tris-HCl durante 6, 24 y 48 horas. Los fosfolípidos (PL) y el IMQ fueron cuantificados como se describe en el próximo apartado.

5.3.5 Caracterización de las nanovesículas

5.3.5.1 Cuantificación de fosfolípidos e imiquimod

Los PL fueron cuantificados empleando el microensayo Böttcher (Böttcher et al., 1961). El IMQ fue cuantificado por espectrofotometría UV-visible a λ 305 nm luego de la completa disrupción de las nanovesículas en etanol:ácido clorhídrico 98:2 (v/v). La absorbancia de la muestra fue comparada con una curva estándar preparada con IMQ disuelto en etanol:ácido clorhídrico 98:2 (v/v). La curva estándar fue lineal en el rango 1.25-20 $\mu\text{g/mL}$ de IMQ con coeficiente de correlación lineal de 0,998.

5.3.5.2 Tamaño y potencial ζ de nanovesículas

El tamaño y potencial ζ fue determinado por dispersión de la luz dinámica (DLS) y análisis de fase de dispersión de luz (PALS), respectivamente, usando un equipo nanoZsizer (Malvern Instruments, Malvern, Reino Unido). Las nanovesículas fueron diluidas 1:20 en buffer Tris-HCl (50 μL de muestra con 950 μL de buffer Tris-HCl) para determinaciones de tamaño y potencial ζ .

5.3.5.3 Polarización generalizada (GP) y anisotropía de fluorescencia (FA) de nanovesículas

El orden y la fluidez de las bicapas de las nanovesículas antes y después de la centrifugación fueron analizadas por la determinación de la polarización generalizada (GP) y la anisotropía de fluorescencia (FA) de la sonda Laurdan, respectivamente (Harris et al., 2002).

Laurdan (6-dodecanoil-2-dimetilaminonaftaleno) es una sonda fluorescente utilizada para estudiar la coexistencia de fases y fluctuaciones en vesículas de fosfolípidos. Se sabe que Laurdan es sensible a la polaridad del medio ambiente, mostrando un gran cambio de emisión hacia el rojo en solventes polares, con respecto a solventes no polares (fenómeno generalmente referido como relajación del solvente), que indica la reorientación de los dipolos del solvente alrededor del dipolo del estado excitado. En las vesículas de fosfolípidos, Laurdan puede detectar la

dinámica de su entorno observando la evolución temporal de la forma espectral y el centro de gravedad.

Las nanovesículas fueron marcadas con Laurdan mezclando 10 μL de Laurdan 120 mM en metanol con un volumen de nanovesículas suficiente para lograr una relación Laurdan:PL 1:20 mol:mol.

GP se calculó usando la siguiente ecuación:

$$GP = \frac{I_{490}}{I_{440} + I_{490}} \quad (1)$$

Donde I_{440} e I_{490} son las intensidades de fluorescencia a $\lambda_{\text{em}} = 490 \text{ nm}$ y $\lambda_{\text{em}} = 440 \text{ nm}$, respectivamente, obtenidas a partir del espectro entre 440 y 520 nm a $\lambda_{\text{ex}} = 364 \text{ nm}$ (Slit_{ex}: 5,0 y Slit_{em}: 10,0 nm. Velocidad de escaneo: 100 nm/min)

FA fue calculado por el software del fluorímetro de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$FA = \frac{I_0 - GI_{90}}{I_0 + 2 GI_{90}}$$

Donde I_0 e I_{90} son las intensidades de fluorescencia a $\lambda_{\text{em}} = 440 \text{ nm}$ con $\lambda_{\text{ex}} = 364 \text{ nm}$ y el polarizador de excitación orientado a 0 y 90°, respectivamente. El factor de corrección (G) fue obtenido a partir de la relación de intensidad de emisión a 0 y 90° con el polarizador de excitación orientado a 90° (luego de la substracción de la luz dispersada).

Las medidas de GP y FA fueron llevadas a cabo con un espectrómetro de fluorescencia LS-55 (PerkinElmer Inc., Waltham, MA, Estados Unidos).

5.3.5.4 Microscopía electrónica de crio-transmisión (Crio-TEM)

Las muestras fueron preparadas en un sistema de vitrificación de ambiente controlado, equilibrado a 22°C y analizadas usando microscopio electrónico TALOS F200C (Thermo Fisher Scientific Inc.) a 200 kV. Las imágenes fueron adquiridas usando una cámara CMOS Ceta 16M 4k x 4k píxeles (Thermo Fisher Scientific Inc.). Las imágenes no fueron procesadas luego de la adquisición. La preparación de las muestras y la adquisición de los datos fueron realizadas en el Laboratorio de

Microscopía Electrónica (LME) del Laboratorio Nacional de Nanotecnología de Brasil (LNNano).

5.3.6 Ensayos *in vitro* sobre células de macrófagos J774 A.1

5.3.6.1 Células utilizadas

Macrófagos murinos BALB/c inmortalizados J774 A.1 (ATCC® TIB-67™) fueron provistos generosamente por la Dra. Erina Petrera (Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad Nacional de Buenos Aires [UBA], Argentina). Las células fueron mantenidas en medio RPMI 1640 suplementado con 10% de SFB, 100 U/mL de penicilina, 100 µg/mL de estreptomicina y 2mM L-glutamina (medio RPMI completo) en atmósfera humidificada con 5% de CO₂ a 37°C.

5.3.6.2 Ensayo de viabilidad celular

La viabilidad de las células J774 A.1 fue medida luego de 24 horas de incubación con 5, 0,5, 0,25 y 0,025 µg IMQ/mL (IMQ 1, 2, 3 y 4, respectivamente); 100 y 10 µg PL/mL de nanoARC (nanoARC1 y nanoARC2); 100 y 10 µg PL/ml de nanoARC-IMQ (nanoARC-IMQ1 y nanoARC-IMQ2); 100 y 10 µg PL/mL de LIPO (LIPO3 y LIPO4); y 100 y 10 µg PL/mL de LIPO-IMQ (LIPO-IMQ3 y LIPO-IMQ4). Además, se incluyeron los controles: medio de cultivo RPMI con 5% de SFB, LPS (1 µg/mL) y adyuvante MONTANIDE™ ISA 763 A VG (7 µL/pocillo). Para ello se utilizó el ensayo de MTT que permite observar efectos citotóxicos y citostáticos. El MTT es un compuesto perteneciente a la familia de sales de tetrazolio, soluble en agua y con color amarillo, que al reducirse se convierte en un compuesto de la familia de las sales de formazán, de color violeta e insoluble en agua. El mecanismo exacto de la reducción de MTT a formazán no está del todo entendido, pero involucraría a enzimas del tipo deshidrogenasas que transfieren electrones de NADH o NADPH al MTT. La cantidad de señal generada es dependiente de varios parámetros como: el periodo de incubación, el número de células viables y la actividad metabólica. La cantidad de formazán generado es generalmente proporcional al número de células metabólicamente viables (van Meerloo et al., 2011). Para realizar este ensayo, las

células J774 A.1 se sembraron en placa de 96 pocillos, a una densidad de 3×10^4 células/pocillo y se dejaron crecer por 24 horas en estufa de cultivo celular con 5% de CO₂ a 37°C. Las muestras fueron preparadas en condiciones de esterilidad, con soluciones y materiales esterilizados por calor húmedo (15 minutos a 121°C) y fueron diluidas en medio RPMI con 5% de SFB. El adyuvante ISA 763 fue preparado como una emulsión W/O en relación 7:3 v:v, utilizando agua apirógena estéril como fase acuosa y el adyuvante como fase oleosa, y fue diluido en medio de cultivo para lograr un volumen final de 7 µL en 200 µL. Luego de las 24 horas de crecimiento, se cambió el medio de cultivo y se reemplazó por medio fresco al 5% de SFB con las formulaciones. Después de 24 horas de crecimiento en estufa de cultivo, el medio fue descartado y se agregaron 100 µL/pocillo de solución de MTT (5 mg/mL de medio RPMI con 10% de SFB) a las células adheridas a la placa y se incubó durante 3 horas de a 37°C y 5% de CO₂. Finalmente, el medio de cultivo fue removido y se agregaron 100 µL de DMSO para disolver los cristales de formazán. Una vez que se disolvieron completamente los cristales, se midió la absorbancia a λ 570 nm en un lector de microplacas Dynex Technologies, modelo MRX tc. La viabilidad celular se expresó como un porcentaje relativo a la viabilidad de las células crecidas en medio de cultivo con 5% de SFB.

5.3.6.3 Visualización de cambios morfológicos

Para visualizar los potenciales cambios morfológicos sufridos por las células J774A.1 luego de 24 horas de incubación con las muestras mencionadas anteriormente, se llevaron a cabo una serie de microscopías de campo claro. Para ello, en placas de cultivo celular de 24 pocillos fueron sembradas 150000 células por pocillo en 300 µL de medio de cultivo RPMI con 5% de SFB. Las células fueron cultivadas por 24 horas a 37°C en ambiente humidificado con CO₂. Luego de extraer el medio de cultivo, las muestras fueron diluidas en medio de cultivo y agregadas y cultivadas otras 24 horas en las mismas condiciones. Antes de tomar cada imagen, el sobrenadante fue removido y se realizaron dos lavados con PBS no estéril. Las imágenes de microscopía en campo claro con aumento 20X fueron tomadas utilizando el aparato Cytation™ 5 Cell Imaging Multi-Mode Reader (BioTek

Instruments Inc., Winooski, VT, Estados Unidos). El ensayo fue llevado a cabo por triplicado, empleando tres lotes independientes de nanovesículas; se tomaron dos imágenes por pocillo y fueron seleccionadas las más representativas.

5.3.6.4 Liberación de citoquinas pro-inflamatorias

La liberación de citoquinas TNF- α e IL-6 en el sobrenadante fue evaluada luego de incubar las nanovesículas con células J774A.1. Se utilizó 1 μ g/mL de LPS como control positivo. El TNF- α e IL-6 de ratón presente en los sobrenadantes fue medido mediante un ensayo de inmunoabsorción ligado a enzima (ELISA). La técnica ELISA consiste en la detección de un antígeno inmovilizado en una placa por medio de un anticuerpo enlazado a una enzima capaz de generar un producto detectable. Existen distintas variantes de este ensayo, pero la que se utilizó particularmente para la determinación de citoquinas fue un kit comercial ELISA tipo “sándwich” (BD OptEIA, BD Biosciences, CA, Estados Unidos). Brevemente, primero se recubre el pocillo con un primer anticuerpo anti-antígeno, luego se lava el exceso de anticuerpo y se aplica la muestra en la que se encuentra el antígeno a detectar, que será retenido en el pocillo al ser reconocido por el primer anticuerpo. Después se elimina el material no retenido con un segundo lavado y se aplica una solución con un segundo anticuerpo anti-antígeno marcado con una enzima. Así, cada molécula de antígeno estará unida a un anticuerpo en la base que lo retiene y un segundo anticuerpo, al menos, que lo marca. Finalmente, después de un lavado para eliminar todas las moléculas marcadas no fijadas, se añade el sustrato enzimático, se incuba durante un tiempo en el cual se producirá una reacción enzimática y luego se frena la reacción y se lee la densidad óptica mediante espectrofotometría (BD Biosciences, 2019).

5.3.7 Ensayos *in vivo* en ratones de laboratorio

5.3.7.1 Animales y esquemas de inmunización

Ratones BALB/cAnN hembras de 6-8 semanas fueron adquiridos en el Centro Atómico Ezeiza de la Comisión Nacional de Energía Atómica (CNEA). Se

distribuyeron cinco ratones por caja, seleccionados al azar, y se almacenaron en una sala ventilada bajo condiciones controladas, a temperatura constante de 22°C, ciclos de luz/oscuridad de 12/12 horas, y comida y bebida *ad libitum*. Los estudios fueron llevados a cabo de acuerdo con los principios del Comité Institucional de Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio (CICUAL) de la UNQ, que sigue los lineamientos internacionales de investigación biomédica con animales de laboratorio del Consejo para la Organización Internacional de Ciencias Médicas y del Consejo Internacional para la Ciencia de los Animales de Laboratorio (CIOMS-ICLAS). Los protocolos fueron debidamente aprobados por el CICUAL de la UNQ.

La primera serie de inmunizaciones se realizó mediante inyecciones subcutáneas los días 0, 14 y 28, empleando cinco ratones por grupo. Se inyectaron: 10 µg de TLA mezclado físicamente con MONTANIDE™ ISA 763 A VG (ISA 763+TLA) (preparado como una emulsión agua en aceite en una relación adyuvante:antígeno 7:3 v:v) de acuerdo a las indicaciones del fabricante (SEPPIC, 2017); 10 µg de TLA mezclado con 50 µg de IMQ libre (dilución 1:10 en buffer Tris-HCl a partir de una solución stock de IMQ de 10 mg/mL en LH 100 mM) (IMQ+TLA); c) 10 µg de TLA mezclado con IMQ incorporado en las siguientes formulaciones: nanoARC-IMQ, nanoARC+IMQ, LIPO-IMQ, LIPO+IMQ. En este caso, nanoARC-IMQ+TLA refiere a la formulación que tiene IMQ incorporado en los nanoARC y fue mezclada con TLA; nanoARC+IMQ+TLA es una mezcla de nanoARC con IMQ y TLA; LIPO-IMQ+TLA refiere a la formulación de IMQ incorporado dentro de liposomas que fue mezclada con TLA; y LIPO+IMQ+TLA es una mezcla de LIPO con IMQ y TLA.

Una segunda serie de inmunizaciones subcutáneas fue realizada siguiendo el mismo calendario, pero esta vez con nanoARC-IMQ+TLA, nanoARC+IMQ+TLA, LIPO-IMQ+TLA, ISA763+TLA, IMQ+TLA y TLA.

5.3.7.2 Reacción de hipersensibilidad retardada (DTH)

La reacción de hipersensibilidad retardada (DTH) fue testada diez días después de la última inmunización (día 38), siguiendo el protocolo de (Luo & Dorf, 2001) con algunas modificaciones. En este caso, los ratones fueron inyectados subcutáneamente en la almohadilla dorsal izquierda con 10 µg de TLA diluido en 30

μL de PBS y en la almohadilla dorsal derecha con PBS solo. A las 24 horas, el grosor de ambas patas fue medido con un calibre manual. La respuesta inflamatoria se calculó restando el grosor medido en la pata izquierda (inyectada con TLA) al grosor medido en la pata derecha (tomado como línea de base).

5.3.7.3 Respuesta humoral

La sangre de los ratones fue recolectada de la vena de la cola el día 38 del calendario de inmunización y el suero se extrajo y se utilizó para medir la respuesta de anticuerpos IgG, IgG1 e IgG2a específicos contra TLA mediante ELISA (en este caso también tipo “sándwich”). Placas de 96 pocillos de alta afinidad fueron recubiertas durante la noche a 4°C con 100 μL de TLA (3 μg/pocillo) en buffer carbonato-bicarbonato (pH 9,6). Luego de lavar tres veces las placas con PBS con 0,05% de Tween 80 (PBST), los sitios de unión no específicos fueron bloqueados durante una hora a 37°C con PBST con 0,1% de BSA (PBST-BSA). Luego de otra serie de lavados con PBST, 100 μL de diluciones por triplicado del suero en PBST-BSA fueron incubadas durante una hora a 37°C. Luego, las placas fueron lavadas tres veces con PBST e incubadas durante una hora a 37°C con IgG total de cabra anti-ratón conjugado con peroxidasa de rabanito (Merck Millipore, Burlington, MA, Estados Unidos) diluido 1:5000 en PBST-BSA. Para determinar los anticuerpos isotipos, IgG1 de rata anti-ratón conjugada con peroxidasa de rabanito o antisuero revelador de IgG2a (BD Biosciences), diluidos 1:5000 en PBST-BSA. Finalmente, las placas fueron lavadas con PBST e incubadas con ABTS durante 15 minutos a temperatura ambiente (20-25°C) en oscuridad y la absorbancia fue medida a λ 405 nm usando un lector de microplacas. Los títulos de anticuerpos fueron determinados a partir de las diluciones de punto final que exhibieron una densidad óptica de 0,3 unidades por encima del *background*.

5.3.7.4 Medición de IFN gamma

Al día 38, los bazo de los ratones inmunizados con nanoARC-IMQ+TLA, nanoARC+TLA e ISA763+TLA fueron removidos asépticamente y las células del bazo (esplenocitos) fueron obtenidas usando un gradiente de Ficoll-Hypaque, como

está indicado por (Böyum, 1968). Los bazos fueron disgregados en una malla metálica usando medio RPMI no suplementado. Los esplenocitos fueron aislados por centrifugación durante 30 minutos a 500 g en un gradiente de Ficoll-Hypaque (1,098 g/mL de densidad) en una centrífuga Gellec G144d. El pellet resultante fue lavado dos veces con RPMI y finalmente resuspendido en RPMI suplementado, con 50 μ M de 2-mercaptoetanol. Las células fueron contadas en cámara de Neubauer con colorante Türk y sembradas en placas de 96 pocillos con fondo en U en una densidad de 1×10^6 células por pocillo en un volumen final de 200 μ L. Las células fueron estimuladas *in vitro* con TLA (3 μ g/pocillo) o ConA (1 μ g/pocillo) como control positivo. Células no estimuladas fueron usadas como control negativo. Los sobrenadantes fueron recolectados luego de 48 horas de incubación en una cámara humidificada a 37° C con 5% de CO₂. La liberación de IFN- γ en los sobrenadantes celulares fue medida mediante ELISA (BD OptEIA™, BD Biosciences) siguiendo las instrucciones del fabricante, como ya fue detallado anteriormente. La medición de la absorbancia fue llevada a cabo a 450 nm en un lector de microplacas.

5.3.7.5 Determinación de citoquinas intracelulares IL-10 e IL-12

La medición de citoquinas intracelulares se realizó siguiendo las indicaciones de Foster 2007. Las células fueron marcadas con anticuerpo anti-MHCII (I-A^d) conjugado a FITC y fijadas en un 1% de paraformaldehído. Luego, fueron permeadas con 0,5% de saponina en PBS y el marcado intracitoplásmico de IL-10 e IL-12 se realizó utilizando anticuerpos conjugados de PE (BioLegend, San Diego, CA, EE.UU.). Para esto, las células fueron previamente incubadas durante 4 horas con Brefeldin A (Thermo Fisher Scientific Inc.) para inhibir la liberación de citoquinas al medio externo. El análisis de producción de citoquinas se realizó con un citómetro de flujo FACScan y el software CellQuest. Los resultados se muestran como el porcentaje de células positivas para cada marcador.

5.3.7.6 Análisis de marcadores de superficie de esplenocitos

Los esplenocitos de ratones inmunizados y no inmunizados fueron marcados con anticuerpos monoclonales de membrana fluorescentes (anti-CD8, anti-MHCII [I-A^d]

y anti-CD11c conjugados a FITC; anti-CD4 y anti-B220 conjugados a PerCP; anti-CD11b conjugado a PE) (BioLegend). Las suspensiones celulares fueron incubadas con los anticuerpos indicados, diluidos en PBS a 4°C durante 30 minutos y luego lavadas con PBS y fijadas en paraformaldehído al 1%. El análisis de marcadores de superficie celular se realizó con un citómetro de flujo FACScan y el software CellQuest (BD Biosciences). Los resultados se muestran como el porcentaje de células positivas para cada marcador.

5.3.7.7 Ensayo de proliferación de linfocitos

La respuesta celular específica del antígeno también se evaluó mediante un ensayo de proliferación de linfocitos utilizando 5 nM de CFSE, según (Lyons & Parish, 1994). Sesenta días después de la inmunización, se recolectaron los esplenocitos de ratones inmunizados y no inmunizados. Las células del bazo se incubaron con CFSE durante 30 minutos a 37 °C y luego se lavaron dos veces con RPMI con 0,5% de SFB. Finalmente, las células fueron sembradas a una densidad de 1×10^6 por pocillo en 200 μ L de RPMI completo y fueron estimuladas con TLA (3 μ g/pocillo) o PMA (0,2 ng/pocillo).

5.3.8 Análisis estadístico

Los análisis estadísticos se realizaron mediante ANOVA bidireccional, seguidos de comparaciones múltiples de Tukey o ANOVA unidireccional, seguidos de la prueba de Dunnet usando el software Prism 6.0 (Graphpad Software®, San Diego, CA, EE.UU.). Valores de $p < 0,05$ se consideraron estadísticamente significativos y de $p > 0,05$ representan diferencias no significativas. Los resultados experimentales se expresan como la media $\pm$ desvío estándar (DE).

5.4 Resultados

5.4.1 Estructura de las nanovesículas

Las imágenes de Crio-TEM representadas en la **Figura 13A**, mostraron nanoARC-IMQ como poblaciones heterogéneas de nanovesículas oligolamelares de 600-800 nm, mezcladas con nanovesículas multilamelares de mayor tamaño; en la **Figura 13B** los LIPO-IMQ se ven como vesículas oligolamelares con un material oscuro en su interior.

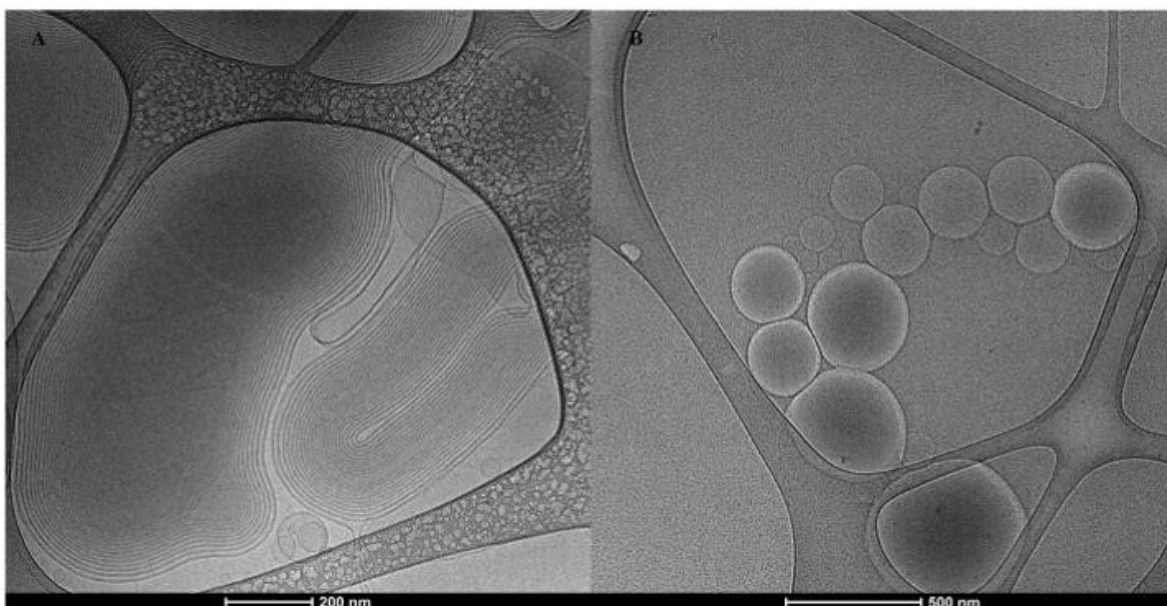


Figura 13: Imágenes de Crio-TEM de nanovesículas. nanoARC-IMQ (A) y LIPO-IMQ (B).

En coincidencia con las imágenes del Crio-TEM, las mediciones de DLS mostraron nanovesículas altamente polidispersas de diámetros que seguían el siguiente orden: LIPO-IMQ > LIPO > nanoARC-IMQ > nanoARC (**Tabla 2**). Debido a su potencial ζ negativo, no hubo asociación electrostática entre TLA y nanovesículas.

Formulación	Diámetro medio (nm)	PDI	Potencial (mV)	ζ Relación IMQ/PL (μg/mg)
nanoARC	655 ± 271	0,62 ± 0,19	-42,6 ± 2,84	–
nanoARC-IMQ	850 ± 300	0,73 ± 0,18	-42,9 ± 1,87	44 ± 10
LIPO	1630 ± 269	0,56 ± 0,16	-3,3 ± 0,14	–
LIPO-IMQ	3614 ± 1787	0,73 ± 0,27	-5,4 ± 3,2	2,5 ± 1,5
TLA	6600 ± 1500	0,60 ± 0,20	-12 ± 0,5	–

Tabla 2: Caracterización estructural de nanovesículas. Los valores se expresan como la media ± DE (n = 3 lotes). PDI: índice de polidispersidad; IMQ/PL: imiquimod/fosfolípidos.

Como se muestra en la **Figura 14A**, la sonicación redujo las relaciones IMQ/PL de nanoARC-IMQ y LIPO-IMQ. Notablemente, no se encontraron diferencias entre la relación IMQ/PL de nanoARC-IMQ luego de los lavados con LH o buffer Tris-HCl, permaneciendo casi invariante después de la sonicación, disminuyendo cerca de un 15% (a 44 μg IMQ/mg PL) y resultando casi 20 veces más alta que la de LIPO-IMQ. Esto sugiere que el IMQ estaba ampliamente particionado en la bicapa de los nanoARC, y que no fue separado por la sonicación. Por el contrario, la relación mucho más baja de IMQ/PL de los LIPO-IMQ fue más sensible a la sonicación, disminuyendo en un 65% en el lavado con buffer Tris-HCl (a 5 μg IMQ/mg PL) y en un 86% en el lavado con LH (a 2 μg IMQ/mg PL). En otras palabras, la sonicación indujo la pérdida de cerca del 90% del IMQ de los LIPO-IMQ, mientras que casi la mitad del IMQ cuantificado en el buffer Tris-HCl fue co-precipitado con el IMQ libre del pellet de LIPO-IMQ. La eficiencia de encapsulación de IMQ fue aproximadamente del 38% en nanoARC-IMQ y del 1% en LIPO-IMQ. Según la hipótesis de (Fox et al., 2014), las nanovesículas con un núcleo interior ácido, de LH, por ejemplo, facilitarían la encapsulación de la IMQ soluble, mientras que la fase

acuosa que rodea las nanovesículas se mantendría cerca de un pH neutro, lo que es deseable para minimizar el dolor por inyección (Fransson & Espander-Jansson, 1996). Aquí se utilizó una solución de IMQ en LH para hidratar la película lipídica. Sin embargo, a pesar de la baja permeabilidad de protones (H⁺) reportada para los ARQ, comparada con la de liposomas (Kiyoshi Yamauchi et al., 1993), después de los lavados por centrifugación no se detectó ningún medio ácido dentro de las vesículas. El alto gradiente osmótico inicial (en el orden de varias unidades de pH) establecido a través de las bicapas de las nanovesículas a lo largo de los lavados con buffer Tris-HCl, podría haber inducido la hinchazón de las mismas y una mayor fuga de su contenido interno. A menos que el IMQ estuviera particionado en las bicapas, la mayor parte del IMQ soluble se hubiese eliminado tras los lavados (**Figura 14A**). La **Figura 14B**, por otra parte, representa el resultado de someter las vesículas a 3 lavados secuenciales en buffer Tris-HCl, con el objetivo de evaluar una posible liberación de IMQ. No se encontró ningún contenido significativo de fosfolípidos en los sobrenadantes (datos no mostrados), se encontraron diferentes cantidades relativas de IMQ liberadas en su lugar: mientras que los LIPO-IMQ perdieron cerca del 90% de su contenido inicial de IMQ, sólo el 10% del contenido inicial de IMQ se perdió de los nanoARC-IMQ. El volumen de muestras sometido a centrifugación fue de 1000 µL y el volumen de precipitado fue de 100 µL. Se observó que las bicapas de los nanoARC no sólo particionaron una mayor cantidad de IMQ, sino que el IMQ se mantuvo asociado en mayor medida luego de una dilución de 1/10, en comparación con las bicapas de los LIPO. Este ensayo tuvo como objetivo simular la liberación de IMQ de cada tipo de matriz lipídica y representó una respuesta a una potencial dilución. Sin embargo, *in vivo*, se inyectaron 100 µL de muestras volumétricas en un espacio subcutáneo virtual, sufriendo una dilución prácticamente insignificante. En general, desde un punto de vista estructural, los nanoARC-IMQ resultarían más adecuados que los LIPO-IMQ para proporcionar la entrega intracelular de IMQ, ya que una mayor cantidad de IMQ se mantuvo más fuertemente asociado por masa de matriz lipídica, favoreciendo así su absorción endocítica.

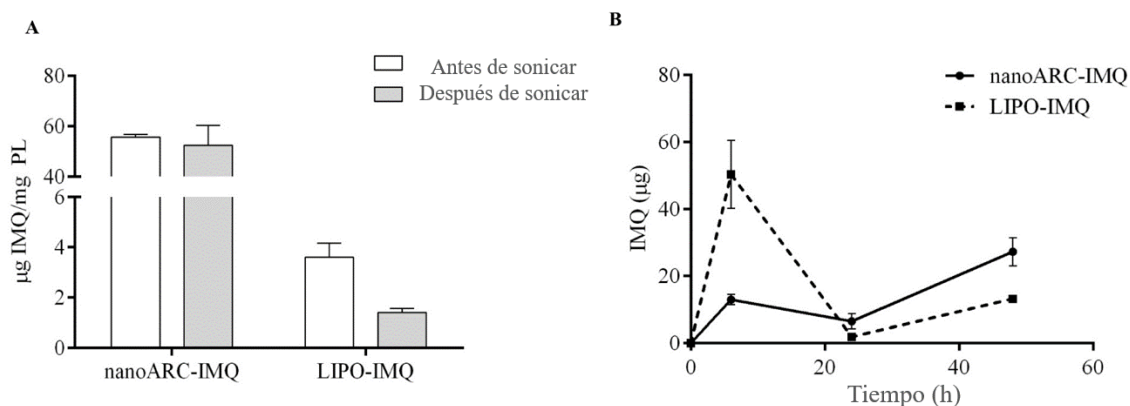


Figura 14: ensayos de liberación de IMQ. Relación IMQ/PL de nanovesículas antes y después de la sonicación en ácido láctico (LH) (A) y liberación de IMQ en el sobrenadante luego de una dilución en buffer Tris-HCl (B). Los valores se expresan como la media $\pm$ DE ($n = 2$ lotes).

5.4.2 Fluidez y orden de las bicapas de las nanovesículas

El efecto del IMQ en la fluidez y el orden de las bicapas de los nanoARC-IMQ y de los LIPO-IMQ fue evaluado de acuerdo a lo descrito por (Altube et al., 2017). Para ello, la sonda fluorescente Laurdan, de estructura de membrana y sensible al efecto de relajación del solvente, fue empleada para determinar GP y FA, respectivamente. Como se muestra en la **Figura 15A**, el IMQ no modificó la fluidez de las membranas de las nanovesículas, que mostraron idéntica FA antes y después de la incorporación del IMQ. Por otra parte, el IMQ no afectó el orden de las bicapas de los LIPO, pero redujo profundamente el típicamente alto desorden de las bicapas de los nanoARC (Altube et al., 2017); la tendencia seguida por los valores de GP fue: nanoARC-IMQbc (antes de la centrifugación) > nanoARC-IMQ (formulación terminada) > nanoARC (**Figura 15B**). La GP de las más ordenadas bicapas de los nanoARC-IMQbc fue reducida luego de lavar el IMQ débilmente atrapado en los nanoARC-IMQ; en otras palabras, el orden decreció a medida que el IMQ era removido. Como se muestra en la **Tabla 2**, no se observa que el IMQ atrapado disminuya el potencial ζ negativo de los nanoARC-IMQ, a pesar de que el IMQ se encuentra cargado positivamente a pH ácido o neutro (Chollet et al., 1999). Nuestros resultados sugieren que el IMQ se encontraba particionado, modificando el orden de las bicapas arqueolípicas, sin una interacción electrostática relevante

del mismo con las bicapas. Contrariamente, ni la fluidez ni el orden de las bicapas de los LIPO se vio afectada por el IMQ, sugiriendo que el mismo no se encontraba atrapado entre las bicapas sino disuelto en una mínima cantidad dentro del espacio acuoso interior. Esta pudo haber sido la razón por la cual se obtuvo una baja relación IMQ/PL, una baja eficiencia de encapsulación, y alta sensibilidad estructural frente a la sonicación por parte de los LIPO-IMQ.

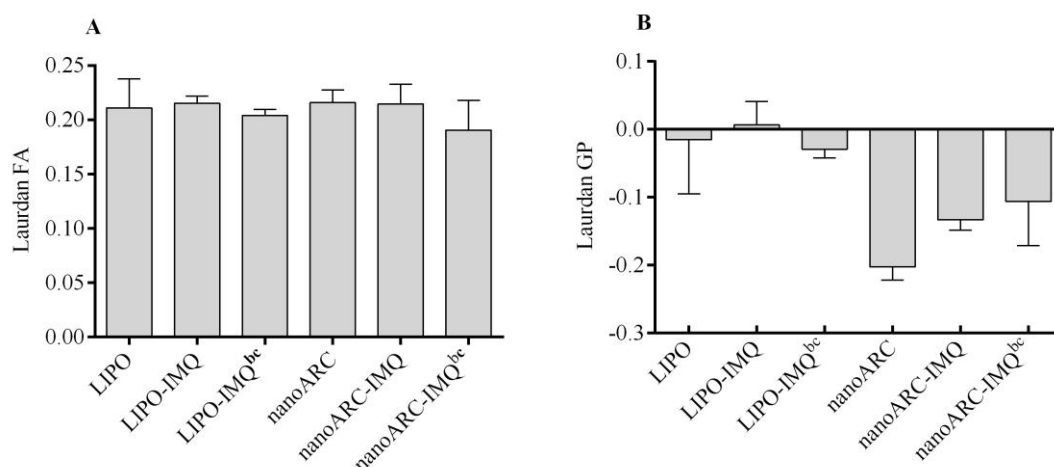


Figura 15: fluidez y orden de las bicapas lipídicas. Anisotropía de fluorescencia (FA) (A) y polarización generalizada (GP) (B) de las nanovesículas. Los valores se expresan como la media $\pm$ DE ($n = 3$ lotes). bc: antes de la centrifugación.

5.4.3 Citotoxicidad de las nanovesículas e inducción de TNF- α e IL-6 en macrófagos de ratones J774 A.1

En la **Figura 16** se muestra la citotoxicidad de los nanoARC-IMQ, LIPO-IMQ, ISA 763 e IMQ luego de 24 horas de incubación con la línea celular de macrófagos murinos J774 A.1, que expresa receptores TLR7 (I. De Meyer et al., 2012) y RS-A1 (Todt et al., 2008). La viabilidad celular no se vio afectada entre 0,5 y 5 μ g de IMQ ni entre 10 y 100 μ g de PL de LIPO y LIPO-IMQ, aunque sí por 100 μ g de PL de nanoARC. Concentraciones de 5 μ g de IMQ/100 μ g de PL de nanoARC-IMQ, y 100 μ g de PL de nanoARC + 5 μ g de IMQ resultaron relativamente tóxicas, reduciendo la viabilidad celular cerca de un 40% (**Figura 16A**). En línea con el ensayo de citotoxicidad por MTT e independientemente del contenido de IMQ, el tratamiento con nanoARC disminuyó el número relativo de células adheridas al sustrato, pero

no indujo alteraciones morfológicas significativas. Las células tratadas con LIPO, en cambio, parecieron sufrir cambios menos drásticos (**Figura 16B**).

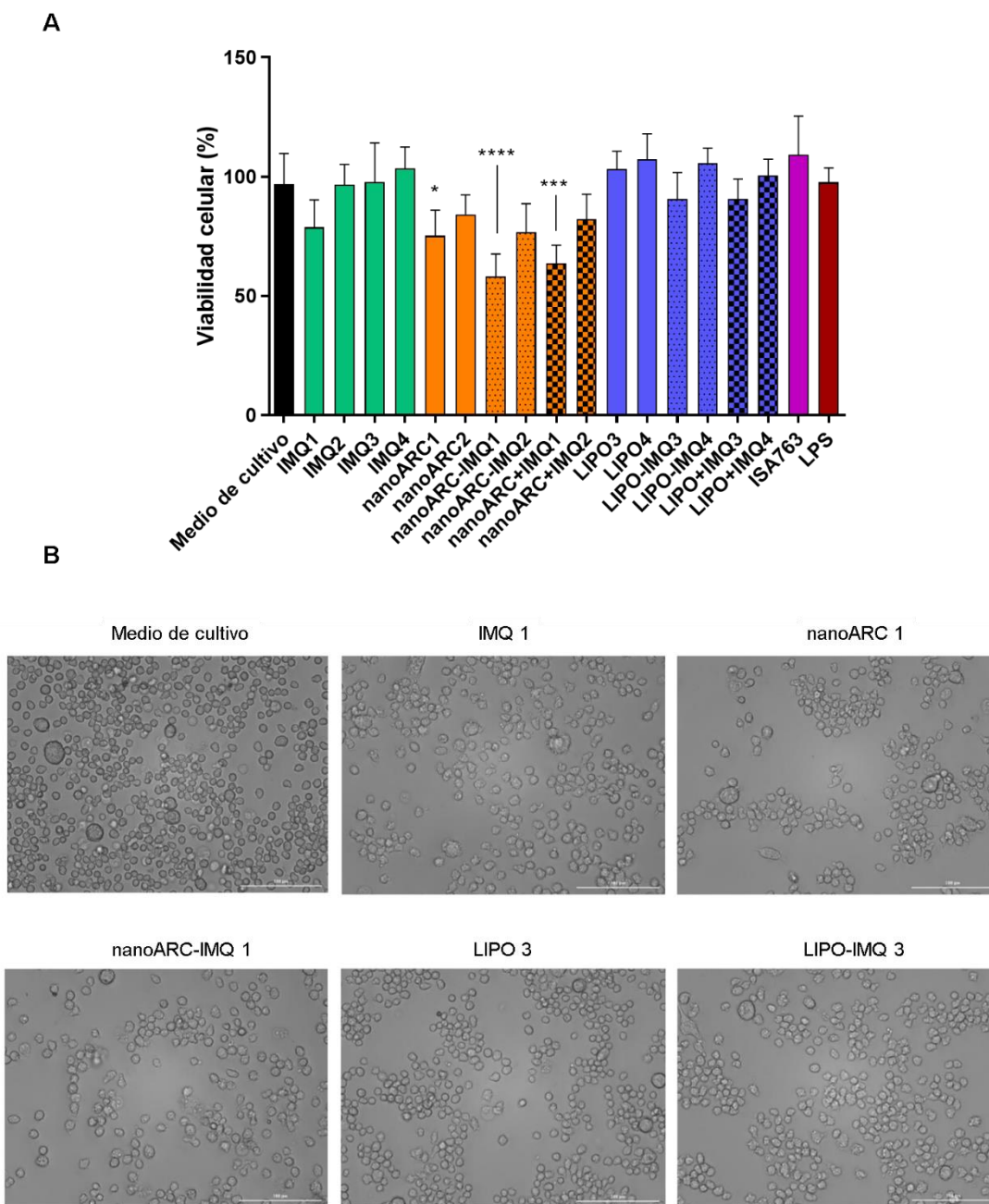


Figura 16: viabilidad celular. Viabilidad de células J774 A.1 tras 24 horas de incubación con formulaciones de IMQ libre, nanoARC, nanoARC-IMQ, LIPO y LIPO-IMQ evaluada por MTT (**A**) e imágenes de muestras seleccionadas tomadas con microscopio de campo claro, magnitud 20X (**B**). Los valores se expresan como la media $\pm$ DE ($n=3$ lotes). Los asteriscos representan diferencias significativas respecto al control (medio de cultivo) (*, $p<0,05$; ***, $p<0,001$; ****, $p<0,0001$).

Se esperaba que los nanoARC-IMQ, dado su combinación de ligandos (RS-A1 + TLR7) aumentaran la producción de TNF- α e IL-6 por encima de lo inducido por el IMQ o los nanoARC por sí solos.

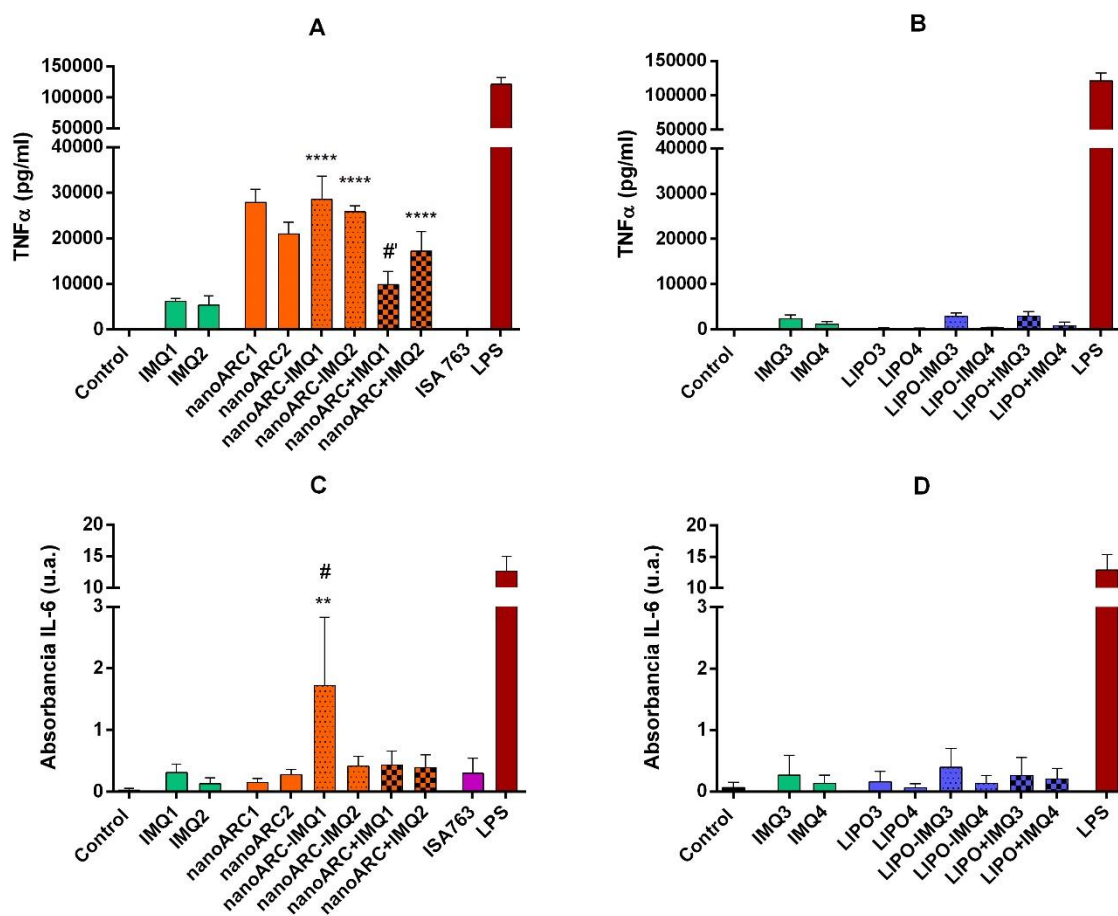


Figura 17: producción de citoquinas por células J774 A.1. Producción de TNF- α (A y B) e IL-6 (B y C) luego de incubar las formulaciones durante 24 horas. Las imágenes A y C muestran las nanovesículas preparadas con arqueolípidos y las B y D las nanovesículas preparadas con lípidos convencionales. Los asteriscos denotan diferencias significativas entre las nanovesículas con IMQ incorporado o mezclado respecto a la misma concentración de IMQ libre y los numerales representan diferencias significativas entre las nanovesículas vacías y su par con IMQ incorporado o mezclado a la misma concentración. Los resultados son la media $\pm$ DE ($n = 2$ ensayos). ** y #, $p < 0,01$; #', $p < 0,001$; ****, $p < 0,0001$.

En este punto, si bien observamos que tanto nanoARC-IMQ como nanoARC generaron una mayor producción de TNF- α que el IMQ, no observamos diferencias significativas entre los nanoARC y los nanoARC-IMQ. Sorpresivamente, los nanoARC+IMQ de 5 μ g de IMQ + 100 μ g de PL de nanoARC produjeron una

disminución en la liberación de TNF- α respecto a los nanoARC-IMQ de la misma concentración. Así es que la liberación de TNF- α en estas concentraciones parece estar dada por las vesículas vacías *per se* y no como un efecto sinérgico de los ligandos a RS-A1 y TLR7 (**Figura 17A-B**). Sin embargo, y notablemente para nosotros, la formulación de 5 μ g de IMQ/100 μ g de PL de nanoARC-IMQ fue la única que aumento los niveles de IL-6 cerca de 4 veces por encima del IMQ (**Figura 17C-D**).

5.4.4 Reacción de hipersensibilidad retardada (DTH)

En la **Figura 18** se muestra la hinchazón de las patas de los ratones (respuesta celular local) inducida luego de las 3 dosis subcutáneas de nanovesículas y el desafío con el antígeno TLA, medida como el diámetro de la almohadilla. Se observó que los nanoARC-IMQ+TLA y el ISA763+TLA indujeron una hinchazón similar, más alta que las restantes formulaciones de IMQ. Asimismo, la respuesta de los nanoARC-IMQ+TLA superó aquella inducida por el IMQ+TLA y por los nanoARC+IMQ+TLA. Esto nos llevó a confirmar que los nanoARC-IMQ, y no el IMQ solo o mezclado con nanoARC, son los responsables de la mejora en la respuesta del IMQ, un hecho que resultó en una mayor DTH. Por el contrario, no se observaron diferencias en el diámetro de hinchazón entre los LIPO-IMQ+TLA y los LIPO+IMQ+TLA. La baja relación IMQ/PL, sumado al mucho menor *uptake* endocítico exhibido por los LIPO en comparación con los nanoARC (Altube et al., 2016), así como la casi ausente capacidad de estimular TNF- α e IL-6 sobre macrófagos J774 A.1, que se tradujo en una DTH menos pronunciada, sugieren que solo los nanoARC pero no los LIPO, podrían ser exitosos en modificar la farmacodinamia del IMQ en las células blanco. A pesar de que no todos los agentes inmunógenos que inducen DTH se asocian con una respuesta celular protectora (Nichols et al., 2002), generalmente, una clásica DTH es considerada indicativa de respuesta celular protectora (Crowle, 1975), mediada por LTh1 o LT CD4⁺ activados (Cher & Mosmann, 1987) y LT CD8⁺ citotóxicos (Kalish & Askenase, 1999).

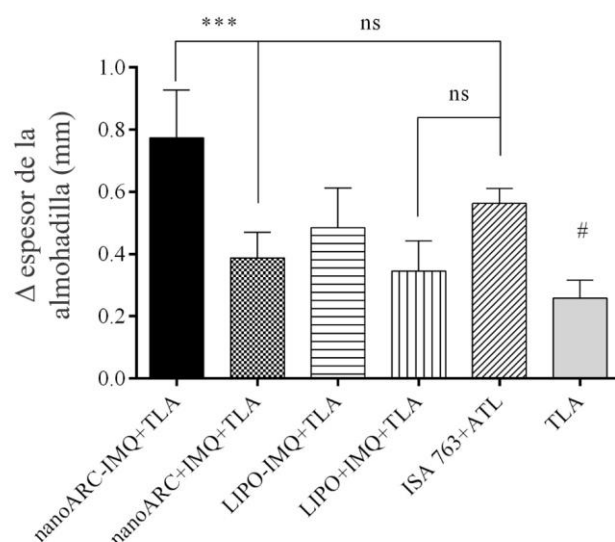


Figura 18: reacción de hipersensibilidad retardada (DTH). Los asteriscos representan diferencias estadísticas entre el grupo inmunizado con nanoARC-IMQ+TLA y el grupo inmunizado con nanoARC+IMQ+TLA y el numeral representa diferencias estadísticas entre el grupo inmunizado con nanoARC-IMQ+TLA y el grupo inmunizado con TLA. Los valores están expresados como la media $\pm$ DE ($n = 3$ experimentos). # y ***, $p < 0,001$; ns: no hay diferencias significativas.

5.4.5 Títulos de IgG sistémicos e isotipos de IgG antígeno-específicos

En la **Figura 19A** se muestran los títulos antígeno-específicos de IgG sistémica luego de las tres dosis subcutáneas de nanovesículas. Claramente, el grupo inmunizado con nanoARC-IMQ+TLA tuvo la respuesta más alta. Y, el IMQ+TLA y el TLA solo indujeron respuesta cerca de 1,5 órdenes más bajas. No se registraron diferencias entre los grupos inmunizados con IMQ+TLA y TLA, lo que indica que el IMQ fue inútil para aumentar los anticuerpos sistémicos. Notablemente (y a pesar de ser administrado por otra vía), Aldara™ no genera aumento de LT CD4+ o respuestas de anticuerpos (Gogoll et al., 2012, 2016; Rechtsteiner et al., 2005). Por otro lado, en el grupo inmunizado con ISA763+TLA se vio un aumento menos pronunciado de la respuesta humoral. Nuestros resultados difieren de aquellos reportados por (Cargnelutti et al., 2016), en el que a los 36 días post 3 inyecciones subcutáneas en ratones BALB/c (con dosis 10 veces más altas de TLA por ratón), no se encontraron diferencias significativas entre la respuesta del TLA solo y el TLA con el ligando de TLR3 poli I:C, pero sí el ISA 763+TLA la duplicó. En la **Figura 19B** se muestra el ratio de los isotipos IgG2a/IgG1, indicativo de la polarización Th1/Th2

en ratones (Coffman et al., 1988). El ratio de isotipos fue cercano a 1 para ISA 763+TLA y cercano a 0,5 para las demás muestras, lo que significa que mientras que el ISA763+TLA parece inducir una respuesta mixta (celular/humoral), los nanoARC-IMQ+TLA y los restantes grupos inducirían una respuesta sesgada a Th2 (humoral). Los estudios descriptos abajo fueron realizados con la idea de comparar más detalladamente la respuesta de los nanoARC-IMQ con la del ISA 763.

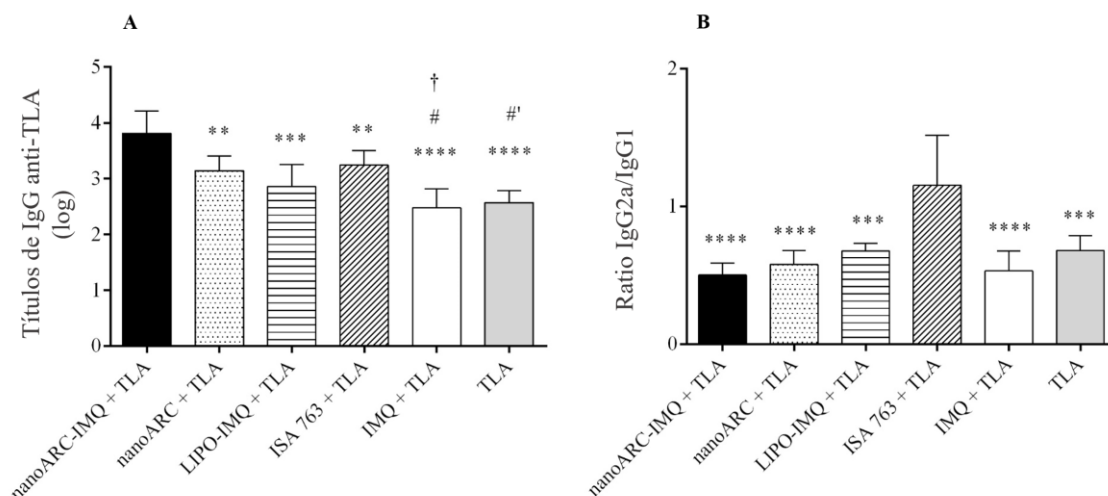


Figura 19: respuesta de anticuerpos IgG antígeno-específicos. Títulos séricos de IgG anti-TLA en el día 38 después de 3 dosis subcutáneas (A). Los asteriscos indican diferencias significativas entre nanoARC-IMQ+TLA y los grupos restantes. Los numerales indican diferencias significativas entre ISA763+TLA e IMQ+TLA o TLA (#, $p < 0,05$; #¹, $p < 0,01$). La cruz indica diferencias significativas entre nanoARC+TLA e IMQ+TLA (†, $p < 0,05$). Ratio de isotipos IgG2a/IgG1 al día 38 post inmunizaciones (B). Los asteriscos indican diferencias significativas entre ISA763+TLA y los grupos restantes (**, $p < 0,01$; ***, $p < 0,001$; ****, $p < 0,0001$). Todos los valores están expresados como la media $\pm$ DE ($n = 3$ experimentos).

5.4.6 Producción de IFN- γ y citoquinas IL-10 e IL-12 por esplenocitos de ratones

En la **Figura 20A** se muestra la producción de IFN- γ en los sobrenadantes de esplenocitos extraídos de los ratones inmunizados con nanoARC-IMQ+TLA, nanoARC+TLA e ISA 763+TLA. Se observó que todos los grupos respondieron igualmente al estímulo con TLA generando bajos niveles de IFN- γ (comparados con aquellos alcanzados por la concanavalina [Con A]), sugiriendo una inducción leve de efectores Th1. Adicionalmente, solo en la región de monocitos y CDs se vio una

baja (e inespecífica) producción de IL-10 (**Figura 20B**). Tampoco se observó inducción de IL-10 (**Figura 20C**) o IL-12 en la región de linfocitos (no mostrado).

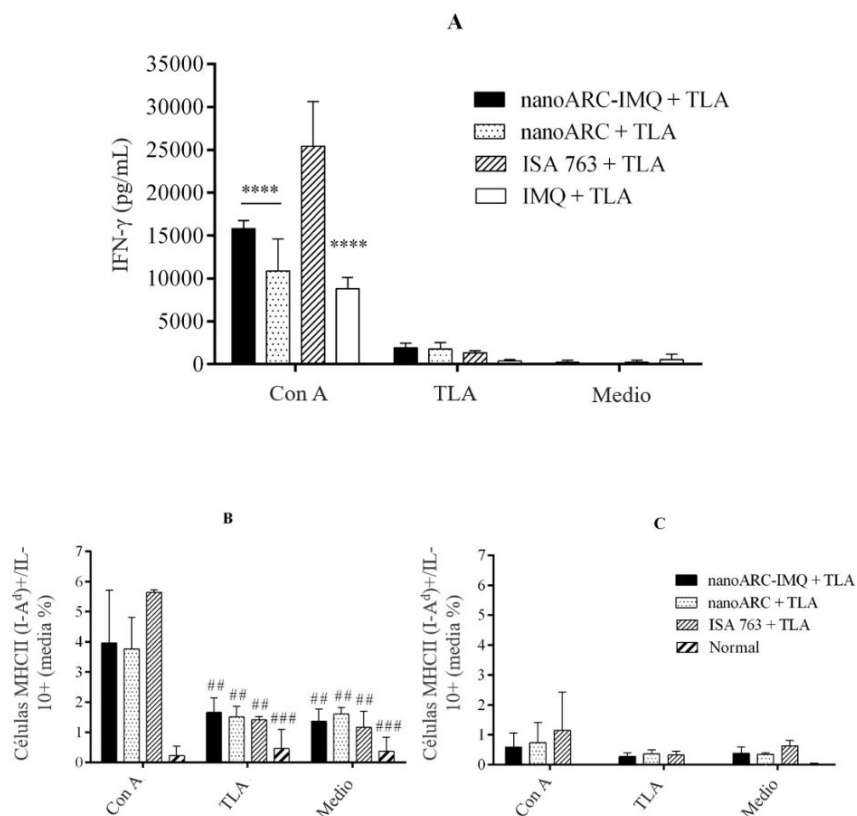


Figura 20: producción de citoquinas por células esplénicas. Cuantificación de IFN- γ en sobrenadantes de esplenocitos (**A**) y detección de IL-10 por marcación de anticuerpos citoplasmáticos (**B y C**) luego de 48 horas de estimulación con concanavalina A (Con A), TLA o medio de cultivo (medio). En **B y C** se representa la media porcentual de células activadas [MHCII (I-A^d)+] que expresaban IL-10, en la región de monocitos y CD (**B**) y en la región de linfocitos (**C**), respectivamente. Los asteriscos representan diferencias significativas entre ISA763+TLA y los demás grupos (****, $p < 0,0001$), mientras que los numerales indican diferencias significativas entre Con A y TLA o medio (#, $p < 0,05$; ##, $p < 0,01$; ###, $p < 0,001$). Los valores se expresan como media $\pm$ DE ($n = 3$ ratones por grupo).

5.4.7 Marcadores superficiales de esplenocitos

Como se muestra en la **Figura 21**, a pesar de los leves niveles de IFN- γ reportados anteriormente, no se indujo ningún aumento significativo de marcadores de LT CD4+ (**A**) o CD11c+/CD11b+, marcador de CDs mieloides o clásicas (**D**) en ningún grupo. Todos los grupos mostraron una expresión incrementada no específica de B220+/MHCII(I-A^d)+ (**C**), marcadores de LB maduros activados que expresan MHC

de clase II superficial, capaces de procesar antígenos y presentarlos a células T (Hoffman et al., 2016). Sin embargo, ISA 763+TLA y nanoARC+TLA indujeron una disminución pronunciada en los marcadores de LT CD8+; solo el grupo inmunizado con nanoARC-IMQ+TLA mantuvo el porcentaje de LT CD8+ en un valor ligeramente superior (aunque no estadísticamente significativo) que el valor de control **(B)**.

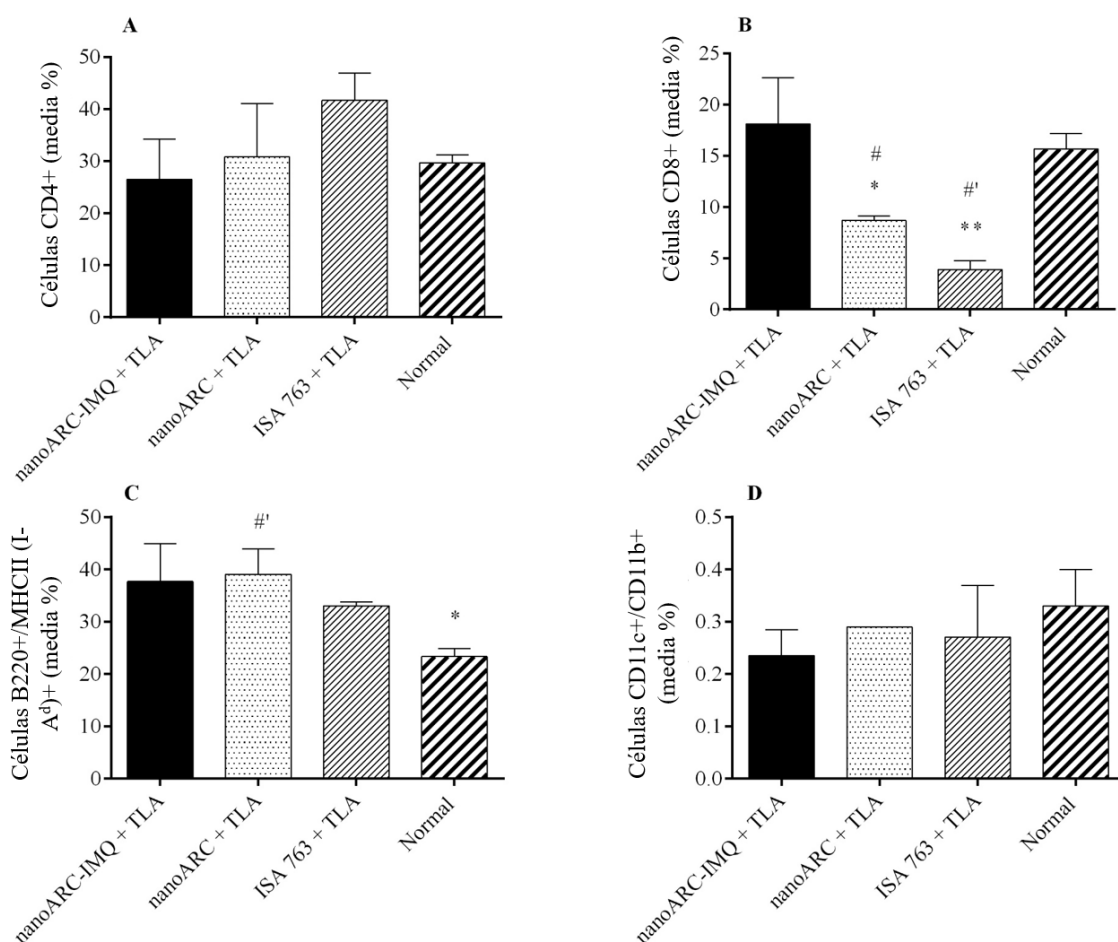


Figura 21: marcadores superficiales de células esplénicas. Se usaron esplenocitos no estimulados de ratones vacunados con nanoARC-IMQ+TLA, nanoARC+TLA e ISA 763+TLA para evaluar la expresión fenotípica de marcadores celulares. Linfocitos T CD4 (A), linfocitos T CD8 (B), linfocitos B activados (B220+/MHCII (I-A^d)+) (C) y células dendríticas CD11c+/CD11b+ (D). El gráfico muestra el porcentaje promedio de celdas positivas para cada marcador. Los asteriscos indican diferencias significativas entre nanoARC-IMQ+TLA y los grupos restantes (*, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$). Los numerales indican diferencias significativas entre los grupos no inmunizados y los restantes grupos (#, $p < 0,05$; #', $p < 0,01$).

5.4.8 Linfoproliferación de esplenocitos

Como se muestra en la **Figura 22**, después de 48 horas, los esplenocitos experimentaron una proliferación no específica (como se observa en las células incubadas con medio de cultivo, en ausencia de TLA o PMA). Sin embargo, el grupo inmunizado con ISA 763+TLA y estimulado con TLA experimentó una menor linfoproliferación que los inmunizados con nanoARC-IMQ+TLA o nano-ARC+TLA.

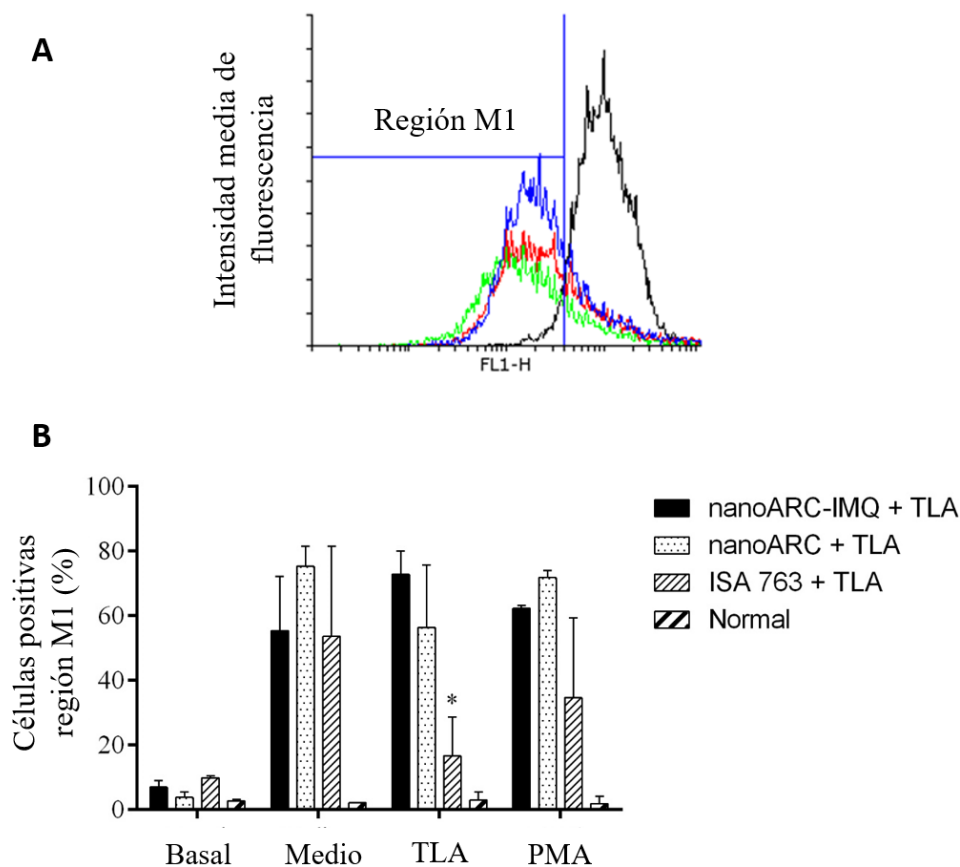


Figura 22: ensayo de linfoproliferación. El panel A muestra un típico histograma de intensidad de fluorescencia. En este caso está representada la intensidad de fluorescencia de las células esplénicas marcadas con la sonda CFSE, sembradas en placas de cultivo y estimuladas con TLA (rojo), PMA (azul) o medio de cultivo (verde). El histograma negro representa el control basal de células no estimuladas (tiempo 0). La selección de la región M1 se utilizó para realizar el gráfico B, que exhibe el porcentaje de células que han proliferado luego de la estimulación con respecto al tiempo 0. Cada muestra se examinó por triplicado y cada barra representa la media $\pm$ DE de 2 ratones por grupo. El asterisco indica diferencias significativas entre las células estimuladas con respecto al control con medio de cultivo (, $p < 0,05$).*

5.5 Discusión

La presencia de grupos metilo perpendiculares en las cadenas isoprenoides (ramificadas) hace que las bicapas de los arqueolípidos se empaqueten libremente en comparación con las bicapas hechas de fosfolípidos ordinarios (Kiyoshi Yamauchi et al., 2000). El entrelazamiento lateral de los grupos metilo y los restos voluminosos de carbohidratos de los grupos de azúcares de las cabezas polares, conectados por enlaces de hidrógeno (Róg et al., 2007), hacen que las bicapas de arqueolípidos sean altamente desordenadas y también de baja movilidad lateral (Kitano et al., 2003). Cada género de arqueobacterias, por otro lado, posee un conjunto de arqueolípidos característico (Corcelli & Lobasso, 2006). Específicamente, los arqueolípidos polares extraídos de *H. tebenquichense*, fueron identificados por ESI-MS por (Higa et al., 2012) y ordenados de acuerdo a su abundancia relativa, de manera decreciente: PGP-Me, PG, SDGD-5, BPG y SDGD-5-PA. Recientemente se confirmó que el PGP-Me doblemente cargado, el lípido polar mayoritario en *H. tebenquichense*, responsable de su alto potencial ζ negativo de -40 mV, era un ligando de RS-A1 y no de RS-B (el receptor de PC) (Altube et al., 2016).

Los RS se definen como “receptores de superficie celular que se unen típicamente a múltiples ligandos y promueven la eliminación de objetivos extraños o propios alterados” (PrabhuDas et al., 2014). El RS-A1 es un RS expresado principalmente en macrófagos (Hughes et al., 1995; Naito et al., 1991, 1992), con propiedades inusualmente amplias de unión a ligandos, incluyendo diversos tipos de proteínas cargadas negativamente, lipoproteínas, ácidos nucleicos y polisacáridos (Goldstein et al., 1979; Plüddemann et al., 2007). Sorprendentemente, dependiendo de la naturaleza química del ligando internalizado y del microambiente, el RS-A1 puede mediar respuestas inflamatorias (mediante la secreción de un espectro de citoquinas pro-inflamatorias) o contrarrestar receptores pro-inflamatorios (Cotena et al., 2004).

La internalización de ligandos mediada por RS-A1 carece –salvo en casos de estrés de retículo endoplásmico– de retroalimentación negativa y es, por lo tanto,

típicamente muy pronunciada (de Winther et al., 2000). Debido a su contenido del ligando del RS-A1 (PGP-Me), las nanovesículas y nanopartículas que contienen arqueolípidos polares de *H. tebenquichense* experimentan también una internalización extensa, en comparación con una menos pronunciada por parte de liposomas ordinarios (Altube et al., 2016; Higa et al., 2012). En general, la presencia de estos arqueolípidos en nanovesículas lábiles no sólo evita la engorrosa derivatización química necesaria para unir ligandos, sino que aumenta su tolerancia al estrés fisicoquímico (esterilización por calor y almacenamiento en condiciones sin frío, ataques quimio-enzimáticos) (Caimi et al., 2017; Higa et al., 2017) en comparación con liposomas ordinarios, constituyendo también un medio eficiente para aumentar la entrega intracelular de moléculas contenidas en su interior.

En este escenario, la idea de emplear nanoARC conteniendo IMQ dirigidos a RS-A1, como adyuvantes inmunomoduladores, tiene dos implicaciones importantes. Lo más obvio es tener un *carrier* orgánico (“suave”), resistente a ataques fisicoquímicos y enzimáticos, en el que el IMQ se encuentra fuertemente asociado a sus bicapas. Esta interacción reduciría las posibilidades de liberación y propagación de IMQ libre antes de la internalización por parte de las células objetivo, como ocurre con las formulaciones IMQ actuales (ya sea en partículas o no). Los nanoARC-IMQ ampliamente internalizados conducirían a una entrega endosomal extensa de IMQ a su TLR7. La otra implicación, más difícil de evaluar, resulta del procesamiento endocítico de los nanoARC-IMQ por la compleja ruta de señalización indirecta mediada por el RS-A1. En definitiva, como primer enfoque, el resultado de la entrega del IMQ a los endosomas de macrófagos vía RS-A1, resultaría en una modificación de la citotoxicidad del IMQ y de los títulos de citoquinas obtenidos *in vitro* en comparación con el IMQ libre. Después de eso, esperamos una respuesta *in vivo* diferente.

Nuestro primer hallazgo más relevante fue que, comparado con liposomas, las bicapas de los nanoARC resultaron ser excelentes “trampas” para atrapar al IMQ: la relación IMQ/PL de los nanoARC-IMQ fue casi 20 y 10 veces más alta, respectivamente, que las de LIPO utilizados en este estudio y las de nanoliposomas

DPPC:DPPG:Chol reportados por (Fox et al., 2014). La enorme relación IMQ/PL de nanoARC-IMQ puede ser el resultado de las características estructurales particulares de las bicapas de los nanoARC, que resultaron más ordenadas después de la inserción del IMQ. Probablemente los grupos perpendiculares de metilo de los arqueolípidos serían responsables de la captura de IMQ, de manera similar a la interacción entre el IMQ y el ISA. EL ISA es una mezcla de isómeros ramificados (principalmente ramificaciones en grupos metilo) y de cadena recta de ácidos grasos saturados C18, C16 y C14, con fórmula general $C_{17}H_{35}COOH$. El ISA es menos susceptible al cambio de color y a la oxidación que los ácidos grasos insaturados y tiene muchas de las propiedades del ácido esteárico. Sin embargo, tiene las propiedades de fluidez y solubilización del ácido oleico (Chollet et al., 1999), por eso empleado en la formulación comercial Aldara™ (Walter et al., 2013). Contar con partículas de alta relación droga/carrier es importante porque a la misma tasa de absorción, los carriers con una mayor relación droga/carrier proporcionarán una mayor entrega de la droga en función del tiempo.

A las 24 horas, se encontró que los nanoARC-IMQ eran más citotóxicos sobre macrófagos J774 A.1 que el IMQ libre. Su mayor toxicidad sería el resultado de la entrega endocítica masiva de IMQ transportado: mientras que normalmente IMQ se difunde a través de la membrana celular impulsada por su gradiente de concentración, los nanoARC-IMQ endocitados proporcionarían una entrega endosomal más rápida y masiva del IMQ. Esta mayor entrega intracelular de IMQ sería responsable de una mayor producción de citoquinas por los nanoARC-IMQ en comparación con el IMQ. Se sabe que el IMQ activa macrófagos y otras células inmunes induciendo citoquinas locales, algunas de las cuales son cruciales para la maduración de CPA, como IFN- α , TNF- α , IL-1 α , IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10, a través de la vía de señalización dependiente de MyD88 (Eng et al., 2018) con una concentración umbral para células monocíticas de sangre periférica humana (PBMC, incluidos los macrófagos) de 0,5 $\mu\text{g/mL}$ ($\sim 2 \mu\text{M}$) (Gibson et al., 1995; Stanley, 2002; Testerman et al., 1995). Además, a partir de la internalización por el ligando RS-A1, los macrófagos RAW 264.7 inducen TNF- α , IL-6, y otras citoquinas pro-inflamatorias y anti-inflamatorias, como IL-10, en un patrón dependiente del tipo

de ligando (Coller & Paulnock, 2001). Aquí observamos que tanto los nanoARC (con un ligando de RS-A1) como los nanoARC-IMQ (con un ligando de RS-A1 y un ligando de TLR7) indujeron mayores títulos de TNF- α en los macrófagos J774 A.1 que el IMQ libre y que 5 μ g IMQ/mL de nanoARC-IMQ indujeron 4-6 veces más cantidad de IL-6 que 5 μ g/mL de IMQ. Por otra parte, los LIPO y LIPO-IMQ fueron menos citotóxicos que los nanoARC-IMQ, pero apenas estimularon TNF- α y no indujeron IL-6. Puesto que los LIPO no tienen ligandos de RS-A1, el TNF- α inducido por los LIPO-IMQ se debe al IMQ incorporado. Además, 10 μ g de PL/mL de nanoARC (sin IMQ, con una concentración lipídica 10 veces inferior a LIPO-IMQ), indujo TNF- α en macrófagos también. Los nanoARC, por lo tanto, fueron más eficientes inductores de TNF- α que el IMQ y los LIPO-IMQ; los nanoARC-IMQ, por otro lado, fueron más eficientes inductores de IL-6 que el IMQ y los LIPO-IMQ.

De manera general, estos resultados *in vitro* sugieren que, debido a su alta relación IMQ/PL, los nanoARC-IMQ, altamente internalizados por el RS-A1, magnificaron el efecto del IMQ en macrófagos que expresan el TLR7. Como consecuencia, el resultado *in vivo* podría ser una mejorada capacidad de adyuvancia por parte de los nanoARC-IMQ en comparación con el IMQ solo.

El primer conjunto de administraciones subcutáneas confirmó esta presunción, ya que tanto los nanoARC-IMQ+TLA como el ISA7 63+TLA indujeron una DTH más alta en comparación con el IMQ, que solo o en combinación, indujo reacciones menos pronunciadas. El segundo conjunto de administraciones subcutáneas mostró que los nanoARC-IMQ+TLA indujeron los títulos sistémicos antígeno-específicos más altos, probablemente debido a la farmacodinamia modificada del IMQ, como se propuso anteriormente.

En la última sección se comparó a los nanoARC-IMQ+TLA con el ISA 763+TLA. La emulsión agua en aceite (metabolizable, no mineral), estabilizada con manitol y ácido oleico purificado de origen vegetal, ISA 763 (SEPPIC, 2017), puede estimular respuestas inmunes humorales y celulares, y se considera más seguro que otras emulsiones MONTANIDE™ a base de aceites minerales. El uso de estos adyuvantes, en general, sin embargo, está asociado con varios efectos secundarios

deletéreos (Aunsmo et al., 2009; Haugarvoll et al., 2010; Skinner et al., 2008). *In vitro*, se encontró que el ISA 763 era un inductor pobre de TNF- α o IL-6 a la dosis probada (**Figura 17A,C**). *In vivo*, encontramos que los nanoARC-IMQ+TLA y el ISA 763+TLA indujeron respuestas casi idénticas. Además de generar títulos similares de DTH e IgG sistémicos, ambos estimularon niveles bajos de IFN- γ , una citoquina que controla la diferenciación de células T CD4+ *naïve* en efectores Th1 (Alving et al., 2012), pero sin aumento mensurable de células T CD4+. Como era de esperar, la proporción de isotipos del ISA 763+TLA fue ~ 1 (indicativo de respuesta celular y humoral), pero la disminución de la expresión de células T CD8+ y la linfoproliferación después del estímulo TLA, sugirió la ocurrencia de efecto deletéreo tardío. Por el contrario, mientras que los nanoARC-IMQ mostraron una relación de isotipos $\sim 0,5$ (indicativo de una respuesta sesgada humoral), no redujeron la linfoproliferación o la expresión de células T CD8+ 10 días después de la última dosis; más aún, este último valor se vio ligeramente incrementado en comparación con el control. Estos resultados preliminares sugieren que los nanoARC-IMQ impactaron en la inmunidad innata, añadiendo IL-6 al TNF- α inducido por el IMQ en los macrófagos J774 A.1. La actividad de los nanoARC-IMQ+TLA en ratones BALB/c resultó en una respuesta Th2 más intensa que la inducida por el IMQ+TLA, acompañada de un componente de linfocitos T CD8+, sin los efectos deletéreos asociados al ISA 763+TLA. Aun así, son necesarios otros estudios para evaluar la existencia de la propuesta reducción de la biodisponibilidad sistémica del IMQ y los efectos adversos *in vivo* generados por los nanoARC-IMQ, así como el resultado de dosis más altas de nanoARC-IMQ en LT CD8+.

De manera general, la conclusión más remarcable de este capítulo es que los nanoARC-IMQ tienen un gran potencial para ser utilizados como adyuvantes de vacunación profiláctica (o terapéutica) dada su capacidad de modificar la respuesta inmune innata, tanto *in vitro* como *in vivo*.

Los resultados de esta parte del trabajo dieron lugar a la publicación del artículo:

Parra, F. L., Caimi, A. T., Altube, M. J., Cargnelutti, D. E., Vermeulen, M. E., de Farias, M. A., Portugal, R. V., Morilla, M. J., & Romero, E. L. (2018). **Make it simple:**

(SR-A1 + TLR7) macrophage targeted NANOarchaeosomes. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 6, 163.

6 Aplicación de nanoARC-IMQ como terapia inmunomoduladora contra enfermedad de Chagas en fase aguda

6.1 Objetivo

El propósito de esta sección es describir, analizar y discutir los resultados de los experimentos en los que se testeó la eficacia de los nanoARC-IMQ como terapia contra la enfermedad de Chagas, utilizando un modelo de infección aguda de *Trypanosoma cruzi* en ratones de laboratorio. Dados los resultados de los ensayos descritos en el capítulo anterior, nuestra hipótesis era que inmunizaciones con nanoARC-IMQ (sin el uso de antígenos específicos) podrían originar una respuesta inmune potente en los ratones, de manera tal de disminuir la carga parasitaria y reducir efectos tóxicos de largo plazo generados por la terapia tradicional.

6.2 Introducción

6.2.1 Enfermedad de Chagas

La enfermedad de Chagas, causada por el protozoario *Trypanosoma cruzi*, afecta actualmente a entre 6 y 7 millones de personas en todo el mundo (Organización Mundial de la Salud, 2019). Es una **infección parasitaria** endémica en Argentina y la principal causa de insuficiencia cardíaca en muchos países de América Latina. La región del Gran Chaco, que involucra buena parte del norte de Argentina, Paraguay y Bolivia, ha sido identificada como una zona “hiperendémica” y, particularmente en nuestro país, se estima que hay más de 2.500.000 infectados (Mordini et al., 2016). Sin embargo, en el último siglo, el aumento de los movimientos migratorios tanto internos como externos, de áreas rurales a zonas urbanas, han modificado la epidemiología de la enfermedad y provocado que esta parasitosis se extienda desde América Latina a otros continentes (Milei et al., 2009; Rassi Jr. et al., 2012). Esta enfermedad, caracterizada inicialmente por ser una zoonosis (transmisión desde animales al ser humano), se ha transformado en una antroponosis (transmisión de ser humano a ser humano), explicándose de esta manera que ya a fines del siglo pasado, zonas urbanas tan distantes como Buenos Aires o ciudades de los Estados Unidos reportaban un importante número de infectados (Hagar & Rahimtoola, 1991). Se estima que la enfermedad de Chagas estaría provocando al año entre 45 y 50 mil muertes, de las cuales un 60% se darían de forma súbita (Beloscar et al., 2013).

T. cruzi es un parásito intracelular que se replica en los macrófagos y en una amplia gama de células hospedadoras, incluidas las células musculares esqueléticas y cardíacas (W. De Souza et al., 2010). La enfermedad **se presenta en tres fases: una aguda, una crónica asintomática (indeterminada) y una crónica sintomática (determinada)**. La fase aguda dura de 4 a 8 semanas y se caracteriza por exhibir una parasitemia detectable microscópicamente e, histopatológicamente, por la generación de infiltrados inflamatorios y necrosis tisular (Esper et al., 2015). Los síntomas suelen ser leves e inespecíficos y menos del 1% de los pacientes

termina en estado grave en esta fase (Bern et al., 2011). En casos raros, un nódulo cutáneo (chagoma) o un edema prolongado e indoloro en el párpado (signo de Romaña) pueden indicar el lugar de la infección, aunque la gran mayoría nunca se detectan (Bern, 2015). Las manifestaciones agudas de la enfermedad se resuelven espontáneamente en aproximadamente el 90% de los casos, incluso si la infección no se trata con fármacos tripanocidas (los síntomas desaparecen y el parásito es controlado por el propio sistema inmune del infectado, pero –ojo– no es eliminado por completo). Aproximadamente el 60-70% de estos pacientes nunca desarrollan un cuadro clínicamente aparente y entran, por lo tanto, en la fase indeterminada (Prata, 2001). Sin embargo, el 30-40% restante sí desarrollan subsecuentemente una forma determinada de enfermedad crónica, que puede ser cardíaca, digestiva (megaesófago y megacolon) o cardiodigestiva, generalmente entre 10 a 30 años después de la infección inicial (Rassi Jr. et al., 2010). De éstas, la manifestación más grave es la cardíaca (miocardiopatía), que puede presentarse de distintas formas: bloqueos divisionales y aurículo-ventriculares, taquiarritmias, bradiarritmias, insuficiencia cardíaca o accidente cerebrovascular isquémico embólico (Kierszenbaum, 2007; Rassi Jr. et al., 2009). En la **Figura 23** está esquematizado el ciclo de vida del parásito y los estadios de la enfermedad.

El tratamiento con un antiparasitario generalmente cura la infección aguda y previene las manifestaciones crónicas (Rassi Jr. et al., 2010), sin embargo, hasta hoy no ha sido validada su eficacia como para generar consenso en el tratamiento de pacientes en fases de infección indeterminadas o crónicas (Mitelman et al., 2006). Aunque la patogénesis de la miocardiopatía de Chagas no se comprende completamente, hay acuerdo en que la persistencia del parásito es fundamental para la enfermedad, lo que confiere una nueva urgencia a la búsqueda de un tratamiento antitripanosómico de alta eficacia durante la fase crónica (Jose Antonio Marin-Neto et al., 2007).

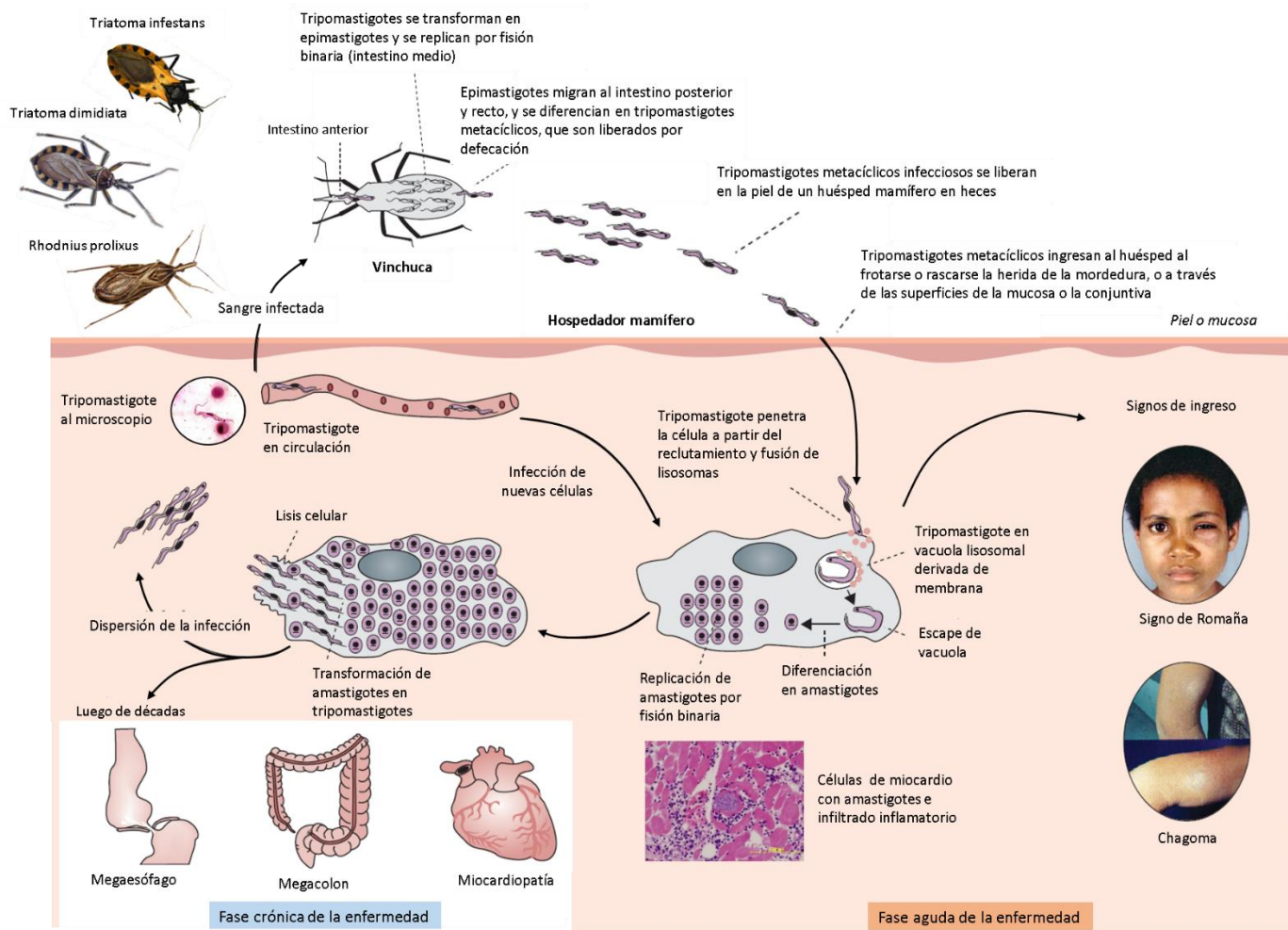


Figura 23: transmisión por vectores y ciclo de vida de *Trypanosoma cruzi*. La infección del parásito en su estadio de tripomastigote a través de la mucosa intacta del ojo produce una reacción indolora de la conjuntiva, con edema unilateral de ambos párpados y linfadenitis de los ganglios preauriculares (signo de Romaña); una mordedura en cualquier otra parte de la piel puede provocar una reacción en el tejido subcutáneo con edema e induración local, congestión vascular e infiltración celular (chagoma). Una vez que han infectado una célula hospedadora, los tripomastigotes escapan de la vacuola parasitaria y son liberados al citoplasma por un mecanismo inusual: se transforman en amastigotes esféricos que comienzan a replicarse, y cuando la célula se hincha con amastigotes, se transforman de nuevo en tripomastigotes con crecimiento de flagelos. Los tripomastigotes lisan las células infectadas, invaden los tejidos adyacentes y se diseminan a través de los ganglios linfáticos y el torrente sanguíneo a sitios distantes, principalmente a células músculo cardíaco, liso y esquelético y a células ganglionares, donde se someten a ciclos adicionales de multiplicación intracelular. Insectos de la subfamilia triatomíneos, más conocidos como vinchucas, son los que transportan el parásito en su estadio de epimastigotes, que se transforman en tripomastigotes y son liberados por defecación. Esquema adaptado de (Rassi Jr. et al., 2010).

La respuesta inmune del hospedador juega un papel clave en el control de la infección; sin embargo, la inmunidad naturalmente evocada por el parásito no es lo suficientemente efectiva para prevenir la generación y progresión de las lesiones cardíacas. Cabe destacar que el prominente infiltrado inflamatorio generado durante

el curso de la respuesta inmunitaria destruye las neuronas no infectadas y las fibras cardíacas. Este proceso inflamatorio autodestructivo es el que provoca miocarditis difusa con alteraciones funcionales y eléctricas que pueden llevar a la muerte súbita (Jose A. Marin-Neto & Rassi Jr., 2009; Teixeira et al., 2006).

6.2.2 Terapias tradicionales contra la enfermedad

Las **quimioterapias** específicas para la enfermedad de Chagas se basan en sólo dos fármacos, el **benznidazol** y el **nifurtimox**, que se han utilizado durante casi cuatro décadas. Ambos fármacos provocan efectos secundarios desagradables, especialmente en pacientes adultos, y su eficacia varía en función de las características genéticas de la cepa de parásito de que se trate (Coura & De Castro, 2002). La toxicidad descrita para el BZ afecta entre el 4-30% de los individuos tratados, siendo las reacciones adversas más frecuentemente informadas: manifestaciones dermatológicas por hipersensibilidad, gastrointestinales, neurotoxicidad periférica y mioartralgias (Castro & Diaz de Toranzo, 1988; Laplumé et al., 1982; Sgambatti De Andrade et al., 1996). Además, estos fármacos parasitocidas no previenen la aparición de la miocardiopatía inflamatoria destructiva grave en la enfermedad de Chagas crónica tardía (Teixeira et al., 2011).

Si bien “en América Latina se han hecho progresos sustanciales para controlar la enfermedad” (bajando de 18 millones de infectados en 1991 a 5,7 millones en 2010) (Bern, 2015), este sigue siendo claramente un serio problema para la sociedad en su conjunto y debe ser abordado desde todos los frentes posibles. En lo que respecta a los tratamientos, en la actualidad, el presupuesto de gasto que las empresas farmacéuticas destinan al desarrollo de fármacos para las infecciones protozoarias es escaso (por no decir nulo), sobre todo debido al alto costo de investigación, al gran riesgo y al limitado mercado potencial (Trouiller et al., 2002). Y aunque la inmunología de la enfermedad de Chagas ha sido ampliamente investigada en modelos experimentales y en humanos, estos estudios no han conducido finalmente al desarrollo de nuevas vacunas o fármacos inmunomoduladores que mejoren las consecuencias de esta infección (Machado et al., 2010). Por lo tanto, se requiere el esfuerzo en conjunto de toda la comunidad

científica para desarrollar tratamientos nuevos, eficaces y menos tóxicos para la enfermedad de Chagas. Aquí nosotros hacemos nuestro aporte.

6.2.3 Las posibilidades de los nanoARC-IMQ

El IMQ es una imidazoquinolina perteneciente a una nueva clase de drogas moduladoras del sistema inmune (para ver una descripción más completa revisar la sección 4.4.2). Ya ha sido demostrado que el IMQ induce la liberación de citoquinas, como IFN- γ , TNF- α , IL-12, IL-6 y IL-1 β , mejorando la activación de macrófagos y CDs a través del receptor intracelular TLR7 (Engel et al., 2011). Hasta la fecha, el IMQ ha sido aprobado por la FDA para el tratamiento de carcinoma de células basales, queratosis actínica y verrugas genitales (Lacarrubba et al., 2008). Además, el IMQ ha sido probado en leishmaniasis humana (Miranda-Verastegui et al., 2005; Shamsi Meymandi et al., 2011), y en modelos animales, ha demostrado tener potentes actividades antivirales y antitumorales (Furudate et al., 2017; Lopez et al., 2017). Anteriormente hemos demostrado que la actividad inmunomoduladora del IMQ aumenta cuando el fármaco se incorpora en nanovesículas preparadas con arqueolípidos extraídos de la arqueobacteria hiperhalófila *H. tebenquichense* (nanoARC-IMQ). Los nanoARC-IMQ tienen propiedades farmacodinámicas diferentes a las del IMQ. La actividad de estas nanovesículas de doble *target* que contienen IMQ (un ligando del TLR7 endosomal) y el arqueolípido mayoritario PGP-Me (un ligando de la clase A de receptores *scavenger*, RS-A1) se atribuye a su amplia captación por parte de macrófagos, dependiente del RS-A1, y al subsiguiente *delivery* endosómico del IMQ.

Hemos demostrado que la inmunización subcutánea con antígenos de *Leishmania* mezclados con nanoARC-IMQ induce una intensa respuesta inmunitaria de hipersensibilidad retardada y un aumento de los títulos IgG sistémicos específicos del antígeno (ver 5.4.4).

En esta parte se evaluó la capacidad de los nanoARC-IMQ para activar el sistema inmunológico e inducir protección contra *T. cruzi* en un modelo murino de infección aguda.

6.3 Materiales y métodos

6.3.1 Extracción de arqueolípidos polares totales y preparación de nanovesículas

La extracción de los arqueolípidos se realizó de la misma manera que está descrito en la sección 5.3.2, mientras que la preparación de las nanovesículas y su caracterización fue realizada siguiendo los procedimientos descritos en las secciones 5.3.4, 5.3.5.1 y 5.3.5.2, respectivamente.

6.3.2 Infección de ratones y esquemas de tratamiento

Ratones machos adultos C3H/HeN con un peso de 25-30 g se obtuvieron en la instalación de animales del Instituto de Investigaciones en Microbiología y Parasitología Médica (IMPAM, Facultad de Medicina, UBA). Los animales fueron mantenidos con un ciclo de 12 horas de luz/oscuridad, a $21 \pm 2^\circ\text{C}$, y se les dio comida y agua estándar *ad libitum*. Todos los procedimientos con animales fueron aprobados por el Comité Institucional de Cuidados de Animales de la Facultad de Medicina de la UBA (Número de autorización 67383/2018) y han seguido los principios establecidos en la Guía de Investigación Experimental en Animales (National Institute of Health, EE.UU.).

Los ratones fueron infectados intraperitonealmente (i.p.) con 1000 tripomastigotes sanguíneos de la cepa RA de *T. cruzi* (Unidad Discreta de Tipificación Tc VI)²³ (gentileza de la Dra. S. M. González Cappa, UBA) (Zingales et al., 2012). Para los estudios de terapia experimental, se les administraron a los ratones (n = 6 por grupo): IMQ libre (50 µg/ratón), nanoARC-IMQ (3 mg PL-50 µg IMQ/ratón) y nanoARC (3 mg PL/ratón) o vehículo (solución salina con PBS). El tratamiento se realizó por vía subcutánea (s.c.) en la espalda del animal el día 0 (2 horas después

²³ *T. cruzi* posee una gran diversidad genética y en la actualidad se divide en seis Unidades Discretas de Tipificación. El término “Unidad Discreta de Tipificación” fue propuesto para describir un conjunto de cepas que se encuentran genéticamente más relacionadas entre sí que con cualquier otra cepa, y pueden ser identificadas por medio de marcadores moleculares o inmunológicos comunes (Muñoz et al., 2013).

de la infección por tripomastigotes) y el día 7 después de la infección (p.i.). El volumen de la inyección fue de 50 µL. La ruta s.c. ya había sido previamente evaluada en nuestro laboratorio (Higa et al., 2013). BZ se administró una vez al día durante 14 días consecutivos, de manera oral, suspendido en un 1% de carboximetilcelulosa (Sigma Aldrich) en agua destilada.

6.3.3 Evaluación de la eficacia del tratamiento

Los niveles de parasitemia fueron monitoreados tres veces a la semana contando el número de tripomastigotes circulantes obtenidos de la sangre de la vena de la cola, diluidos 1:10 en buffer de lisis (0,75% NH₄Cl, 0,2% Tris, pH 7,2). Se empleó una cámara Neubauer para realizar recuentos de parásitos. El peso corporal se registró periódicamente y la mortalidad diariamente. Al final del estudio (al día 60 p.i.), los animales sobrevivientes fueron sacrificados y se obtuvo sangre por punción cardíaca. Las muestras de suero de ratones individuales se alicuotaron y almacenaron a -80°C hasta que se utilizaron para la evaluación de las enzimas asociadas a la miocardiopatía y los niveles específicos de IgG. Para la observación histopatológica se disecaron corazones y músculo esquelético de las patas traseras, fijados en formaldehído al 10%, incrustados en parafina, seccionados y teñidos con hematoxilina-eosina (H&E)²⁴ o tricrómico de Masson²⁵.

6.3.4 Perfil serológico

Los anticuerpos anti-*T. cruzi* fueron detectados por ELISA como se describió en otro trabajo de investigación (Corral & Petray, 2000). Brevemente, microplacas de ELISA (Nunc®, Thermo Scientific, EE.UU.) fueron recubiertas con un homogeneizado

²⁴ La tinción de hematoxilina-eosina es la técnica de coloración más empleada en histología y se introdujo en 1876. Mientras que la eosina se asocia y tiñe de color rosado componentes catiónicos (citoplasma y matriz extracelular), la combinación con la hematoxilina forma un complejo llamado hemalumbre, que se asocia y tiñe de color azul-púrpura componentes aniónicos (ácidos nucleicos) (Santos Vidal, 2017).

²⁵ Este es un tipo de tinción compuesta por tres colorantes (hematoxilina, fucsina y verde azul o azul de anilina), utilizada para observar las fibras de colágeno, y el tejido conectivo en general, en comparaciones de células musculares y epitelios <https://mmegias.webs.uvigo.es/6-tecnicas/protocolos/p-tincion-t-masson.php>

entero de *T. cruzi* (20 µg/mL). Como anticuerpo secundario, se utilizó un antisuero IgG de cabra conjugado con peroxidasa (dilución 1:5000, Thermo Scientific). La reacción se desarrolló mediante la adición de ABTS (Sigma Aldrich). Cada suero fue analizado por duplicado a una dilución 1:400. La densidad óptica (DO) fue leída a 405 nm en un lector ELISA (Multiskan Ex®, Thermo Labsystems, Finlandia). La detección de las respuestas de las subclases de IgG se realizó como se ha descrito anteriormente, empleando IgG1 anti-ratón e IgG2a anti-ratón (diluciones 1:5000, Sigma Aldrich) como anticuerpos secundarios. Los niveles de anticuerpos se expresan como el índice de reactividad, calculado como la relación entre el valor de DO de cada muestra y el valor medio de seis muestras de suero de ratones no infectados.

6.3.5 Evaluación del daño muscular

Para el análisis histopatológico del músculo de miocardio y del músculo esquelético, se capturaron 20 campos microscópicos seleccionados al azar (aumento 40x) de las secciones de tejido teñidas con tricrómico de Masson o H&E (área analizada = $1,5 \times 10^6 \mu\text{m}^2$) utilizando una cámara AxioCam ERc 5s acoplada a un microscopio Zeiss Axio Scope A1 (Carl Zeiss AG, Alemania), y se analizaron con el software ImageJ (NIH, EE.UU.). Los infiltrados inflamatorios se cuantificaron contando el número de núcleos celulares en cada sección. El recuento obtenido de ratones no infectados se tomó como un patrón de celularidad normal, es decir, ausencia de infiltrado inflamatorio (Bahia et al., 2012; Penitente et al., 2015). Los píxeles correspondientes a la fibrosis fueron cuantificados y normalizados a píxeles totales en cada muestra para calcular el porcentaje de área fibrótica en los tejidos musculares. También se cuantificaron los nidos de amastigotes en esas secciones. Y, además, la extensión de la lesión muscular se evaluó mediante la determinación de la actividad de las enzimas musculares séricas. Las actividades de las enzimas creatina quinasa (CK) y acetato deshidrogenasa (LDH) se determinaron 60 días p.i. utilizando kits comerciales (CK-NAC UV y LDH-P UV kits, WienerLab, Argentina), siguiendo las recomendaciones del fabricante y adaptadas previamente para muestras de suero de ratón (Cazorla et al., 2008).

6.3.6 Determinación de niveles de citoquinas

Los niveles de suero de IFN- γ y TNF- α se evaluaron en los ratones supervivientes mediante kits de ELISA comerciales (optEIA, BD Biosciences), siguiendo las instrucciones del fabricante (ver 5.3.6.4). Todas las muestras se procesaron individualmente y se analizaron por duplicado. Los valores se normalizaron a los observados en animales de control no infectados.

6.3.7 Análisis estadísticos

Los datos fueron analizados usando el software Prism 6.0 (GraphPad Software®). Los datos con distribución normal se analizaron mediante ANOVA de una dirección seguido del test post-hoc de Tukey o del test t de Student, según se indica. El test de Kruskal-Wallis seguido del test post-hoc de Dunn o de Mann-Whitney se utilizó para los datos con distribución no normal. Para evaluar las diferencias entre las curvas de supervivencia, se realizó la prueba de logaritmo de Kaplan-Meier. Los resultados se expresan como la media $\pm$ error estándar (EE) o media $\pm$ desviación estándar (DE), como se indica. Un valor de p inferior a 0,05 se consideró significativo. Los animales supervivientes de grupos con $n < 3$ no se incluyeron en el análisis estadístico.

6.4 Resultados

6.4.1 Caracterización de nanoarqueosomas

Los nanoARC-IMQ obtenidos fueron nanovesículas oligolamelares con un tamaño medio y una relación IMQ/lípido similar a las preparadas anteriormente (sección 5.4.1), que mostraron que el IMQ disuelto en ácido láctico estaba atrapado en la bicapa arqueolípida por los grupos metilo, siendo perpendiculares a las cadenas lipídicas longitudinales de éter e imitando la estructura del ácido isoesteárico ramificado que se utiliza para solubilizar el IMQ en formulaciones comerciales (Tabla 3).

Formulación	Diámetro medio (nm)	PDI	Potencial (mV)	ζ	Relación IMQ/PL ($\mu\text{g}/\text{mg}$)
nanoARC	650 ± 250	$0,50 \pm 0,10$	-40 ± 3		—
nanoARC-IMQ	800 ± 300	$0,60 \pm 0,15$	-41 ± 2		35 ± 5

Tabla 3: Caracterización estructural de nanovesículas. Los valores se expresan como la media $\pm$ DE ($n = 3$ lotes). PDI: índice de polidispersidad; IMQ/PL: imiquimod/fosfolípidos.

6.4.2 Eficacia anti-*T. cruzi*

En este trabajo, la eficacia terapéutica de los nanoARC-IMQ se evaluó en un modelo experimental de infección por *T. cruzi* de fase aguda. En este modelo, los ratones infectados con la cepa RA mostraron el perfil clásico de parasitemia durante la fase aguda de la infección (Petray et al., 1994), y cuando los ratones infectados fueron tratados con nanoARC-IMQ, se observó una reducción del número de parásitos en el torrente sanguíneo (**Figura 24A**). En el pico de la parasitemia, el día 20 p.i., se observó una reducción del 78% de los parásitos circulantes. El área bajo la curva de parasitemia (AUC) es un criterio comúnmente utilizado para evaluar tanto los niveles de parasitemia como su persistencia (Ndao et al., 2014). Las AUC obtenidas en animales tratados con nanoARC-IMQ ($213,6 \pm 49,7$) fueron estadísticamente

menores ($p < 0,05$) que las obtenidas en animales que recibieron IMQ libre ($494,9 \pm 89,0$), nanoARC ($426,9 \pm 104,9$) y PBS ($528,5 \pm 78,6$). Como era de esperarse, el tratamiento con BZ causó una reducción del 100% en la parasitemia (AUC=0) (Figura 24B).

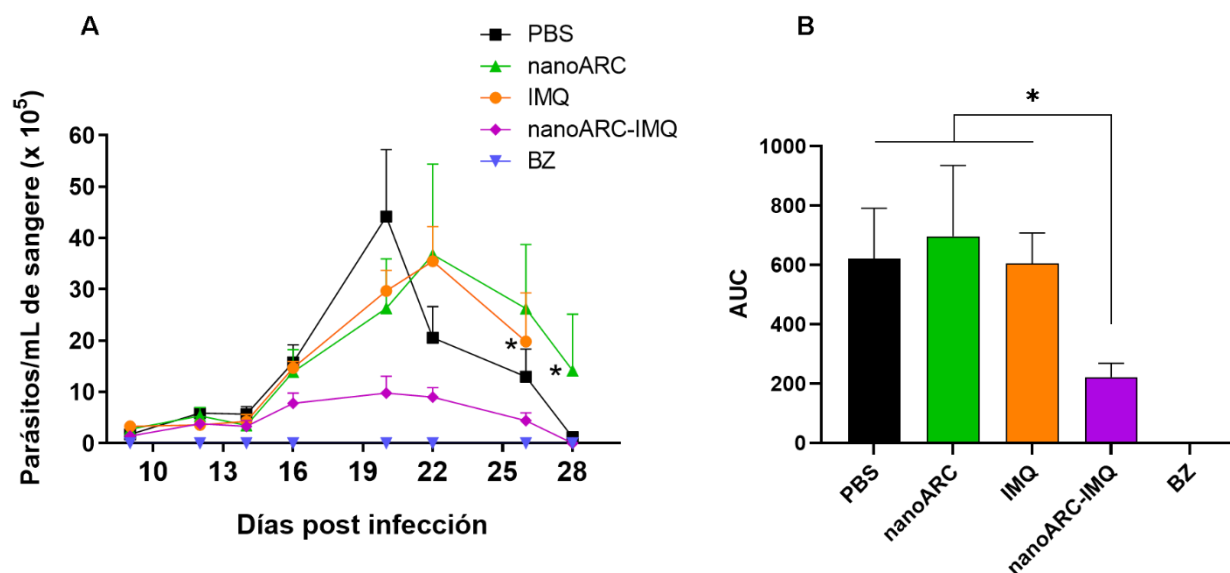


Figura 24: eficacia terapéutica de los tratamientos parte 1. Se muestra la parasitemia sistémica en los días de tratamiento (A) y el área bajo la curva (AUC) resultante (B). Los ratones fueron infectados con *T. cruzi*, y luego inyectados con PBS, nanoARC, IMQ, nanoARC-IMQ o BZ. La parasitemia fue monitoreada tres veces a la semana durante la fase aguda de la infección contando el número de tripomastigotes circulantes en un hematómetro de Neubauer. Los datos se grafican como la media $\pm$ EE. Los asteriscos indican el último punto de tiempo en que el número de sujetos sobrevivientes fue mayor que o igual a tres ($n < 3$ no se muestra) (A). Se calculó el AUC de la parasitemia entre el día 9 y el 26 p.i. y los datos se muestran como la media $\pm$ EE (*, $p < 0,05$) (B). Los resultados son representativos de 3 experimentos independientes.

Todos los ratones perdieron peso corporal cerca del tiempo máximo de parasitemia, excepto los tratados con BZ (Figura 25B). Sin embargo, los animales tratados con nanoARC-IMQ comenzaron a recuperarse después del pico de infección, alcanzando valores similares a los observados en el grupo BZ al final del experimento. En contraste, el día 28 p.i., los animales tratados con IMQ, nanoARC y PBS habían perdido una cantidad considerable de peso ($28,3 \pm 2,1\%$, $19,7 \pm 9,8\%$ y $22,7 \pm 3,4\%$ de su peso corporal inicial), lo que se asoció a una alta tasa de mortalidad. Además, se observaron diferencias estadísticamente significativas entre las curvas de supervivencia obtenidas con los distintos tratamientos (Figura 24B).

El tratamiento con nanoARC-IMQ prolongó la supervivencia, en comparación con IMQ ($p=0,0002$), PBS y nanoARC ($p=0,0062$). Mientras que el 100% de los animales tratados con nanoARC-IMQ sobrevivieron a la infección aguda, todos los ratones que recibieron IMQ libre murieron en el día 33 p.i. Además, el 66,7 % de los ratones (4 de 6) tratados con nanoARC vacíos o PBS murieron entre los días 20 y 29 p.i. Como se esperaba, el fármaco de referencia BZ suprimió la parasitemia en todos los animales, lo que llevó a una supervivencia del 100% durante el período experimental.

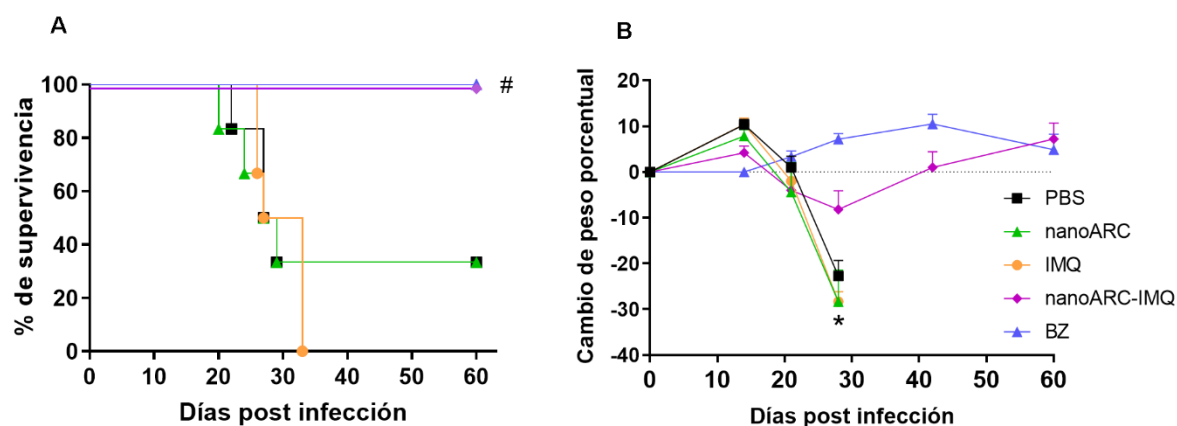


Figura 25: eficacia terapéutica de los tratamientos parte 2. Aquí se grafican la supervivencia acumulada (A) y el cambio porcentual en el peso corporal (B). Los ratones fueron infectados con *T. cruzi*, y luego inyectados con PBS, nanoARC, IMQ, nanoARC-IMQ o BZ. La supervivencia se observó diariamente, hasta el final del experimento. Los datos se observan como la media $\pm$ EE y el numeral indica diferencias significativas de nanoARC-IMQ y BZ respecto a los demás tratamientos (#, $p=0,0002$ vs IMQ; $p=0,0062$ vs PBS y nanoARC) (A). Los cambios en el peso corporal fueron registrados periódicamente. El peso inicial de la línea de base (0% de cambio) está indicado por la línea punteada. Los datos se observan como la media $\pm$ EE y, en este caso, el asterisco indica el último punto de tiempo hasta el que el número de sujetos sobrevivientes fue mayor o igual a tres ($n < 3$ no se muestra) (B). Los resultados son representativos de 3 experimentos independientes.

6.4.3 Respuesta de anticuerpos específica contra *T. cruzi*

La mortalidad precoz de los ratones pertenecientes a los grupos IMQ, nanoARC y PBS nos impidió realizar el análisis estadístico incluyendo estos animales. Curiosamente, se observó una diferencia significativa ($p < 0,01$) en los niveles específicos de IgG en animales tratados con nanoARC-IMQ, en comparación con los animales que recibieron el tratamiento de referencia con BZ. Cabe destacar que la terapia con nanoARC-IMQ indujo un aumento cuatro veces mayor de la respuesta

inmune humoral contra *T. cruzi* (**Figura 26A**). El análisis de los perfiles de isotipos de IgG reveló que la generación de IgG1 e IgG2a específicos anti-*T. cruzi* fue inducida en los grupos tratados con nanoARC-IMQ y BZ. Sin embargo, en ratones que recibieron nanoARC-IMQ, los niveles de IgG2a específico fueron significativamente más altos que los de IgG1 ($p < 0,0001$) al final del periodo experimental. Estos resultados sugieren que la terapia con nanoARC-IMQ podría inducir una respuesta protectora Th1 (**Figura 26B**).

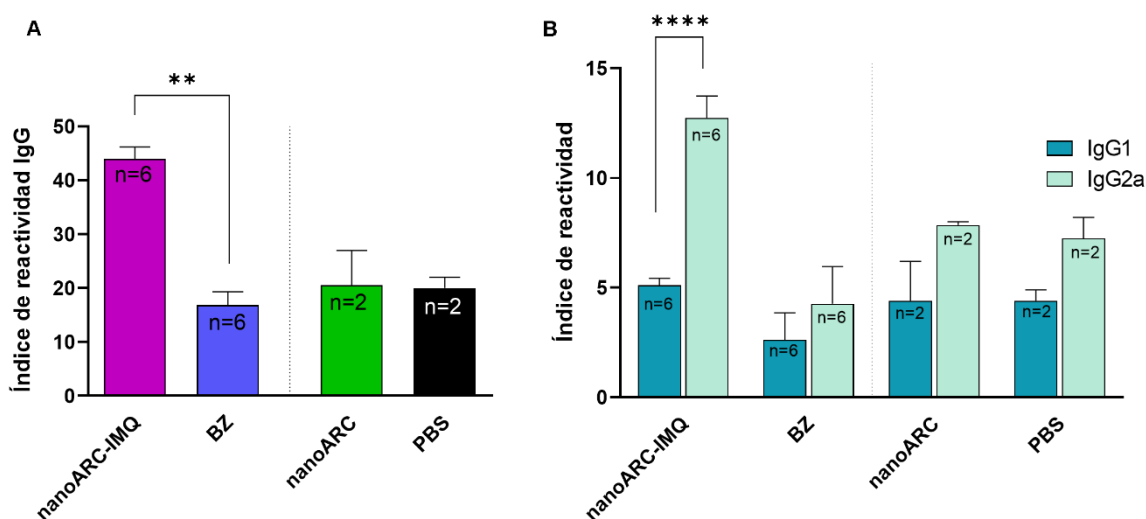


Figura 26: respuesta inmune humoral en ratones infectados con *T. cruzi* y tratados con nanoARC-IMQ o BZ. **A)** Índice de reactividad de anticuerpos IgG contra *T. cruzi*. **B)** Índice de reactividad de subtipos IgG1 e IgG2a. El índice de reactividad fue determinado como la relación entre el valor de DO de cada muestra de suero analizada y el valor medio de las muestras control de ratones no infectados. Se incluyen los índices de reactividad de ratones supervivientes tratados con PBS ($n = 2$) o nanoARC ($n = 2$), aunque estos no fueron analizados estadísticamente. Solo se analizaron estadísticamente los grupos con tres o más ratones supervivientes (nanoARC-IMQ, BZ y normal: $n = 6$). Los datos se muestran como la media $\pm$ EE. Los asteriscos indican diferencias significativas. **, $p < 0,01$; ****, $p < 0.0001$.

6.4.4 Evaluación de daño tisular

Aunque la respuesta inflamatoria en el miocardio se considera el aspecto más importante de la patogénesis de la enfermedad de Chagas humana, en una proporción significativa de pacientes con infección por *T. cruzi* también se pueden observar anomalías en el músculo esquelético (Laguens et al., 1975). En el modelo de ratón de la enfermedad de Chagas empleado en este estudio, se utilizó una cepa altamente virulenta de *T. cruzi* (RA) que promueve una respuesta inflamatoria

neuromiopática, generando un daño considerable en el músculo esquelético (Cutrullis et al., 2009; Mirkin et al., 1997). Cuando se evaluó el proceso inflamatorio en el miocardio y el músculo esquelético en animales tratados con nanoARC-IMQ, se observó una reducción significativa ($p < 0.05$) en el recuento de células inflamatorias, en comparación con los tratados con BZ (**Figura 27**).

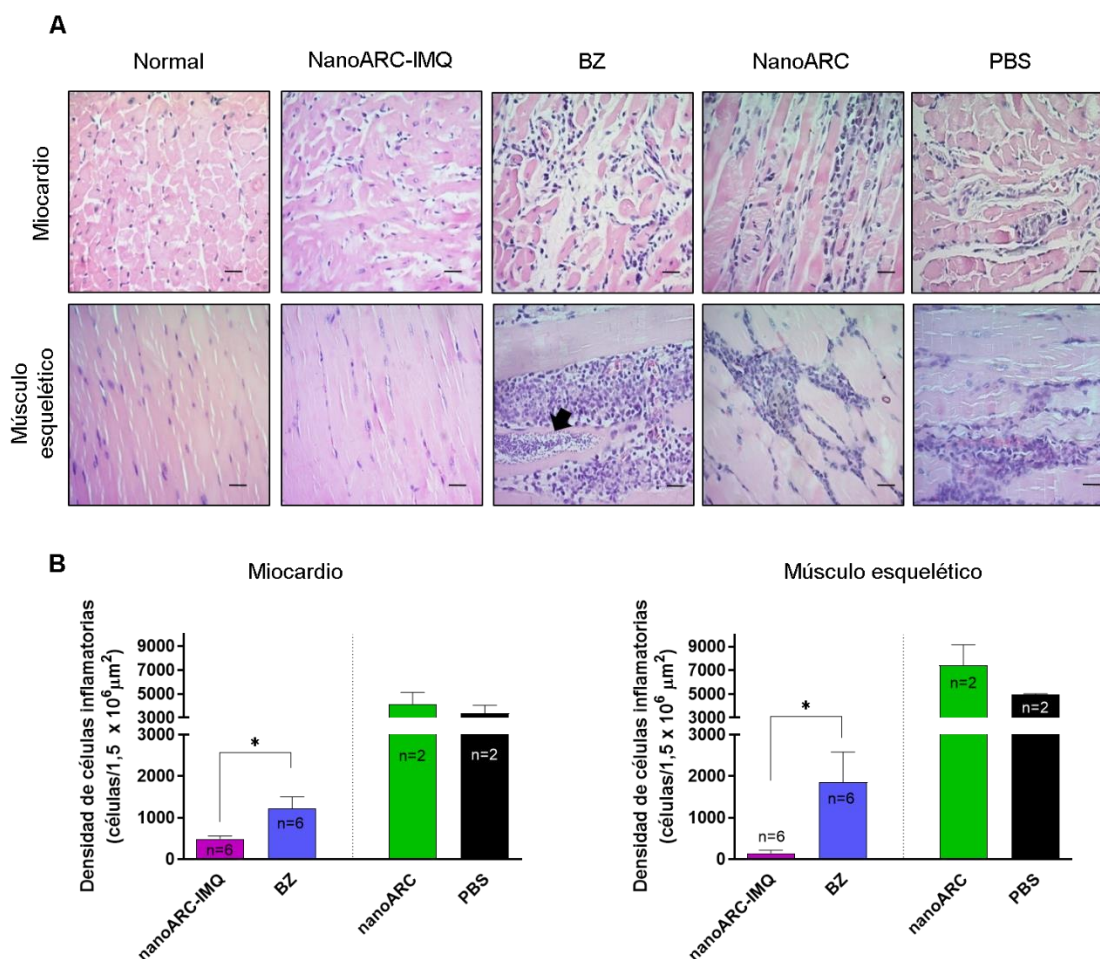


Figura 27: estudios histopatológicos sobre músculo de miocardio y músculo esquelético de ratones infectados con *T. cruzi* y tratados con nanoARC-IMQ o BZ (tinción de H&E). Se observa escasa infiltración de células inflamatorias en secciones del músculo cardíaco y esquelético de ratones tratados con nanoARC-IMQ, y una intensa infiltración inflamatoria en secciones de animales tratados con BZ (**A**). La flecha indica un nido de amastigotes dentro de una fibra muscular esquelética. Además, se incluyen secciones de los ratones sobrevivientes tratados con PBS o nanoARC y secciones histológicamente normales. Barra de escala: 20 μm (**A**). También se realizó un recuento de células inflamatorias del músculo de miocardio y del músculo esquelético, mediante un análisis morfométrico asistido por ordenador utilizando el software ImageJ (**B**). Los datos se muestran como la media ± EE. (*, $p < 0.05$). Solo se analizaron estadísticamente los grupos con tres o más ratones supervivientes (nanoARC-IMQ, BZ y normal: $n=6$; nanoARC y PBS: $n=2$).

Además, el tratamiento con nanoARC-IMQ indujo una disminución significativa de las lesiones fibróticas en el miocardio y el músculo esquelético ($p < 0.001$ y $p < 0.05$, respectivamente), en comparación con el tratamiento con BZ (**Figura 28**).

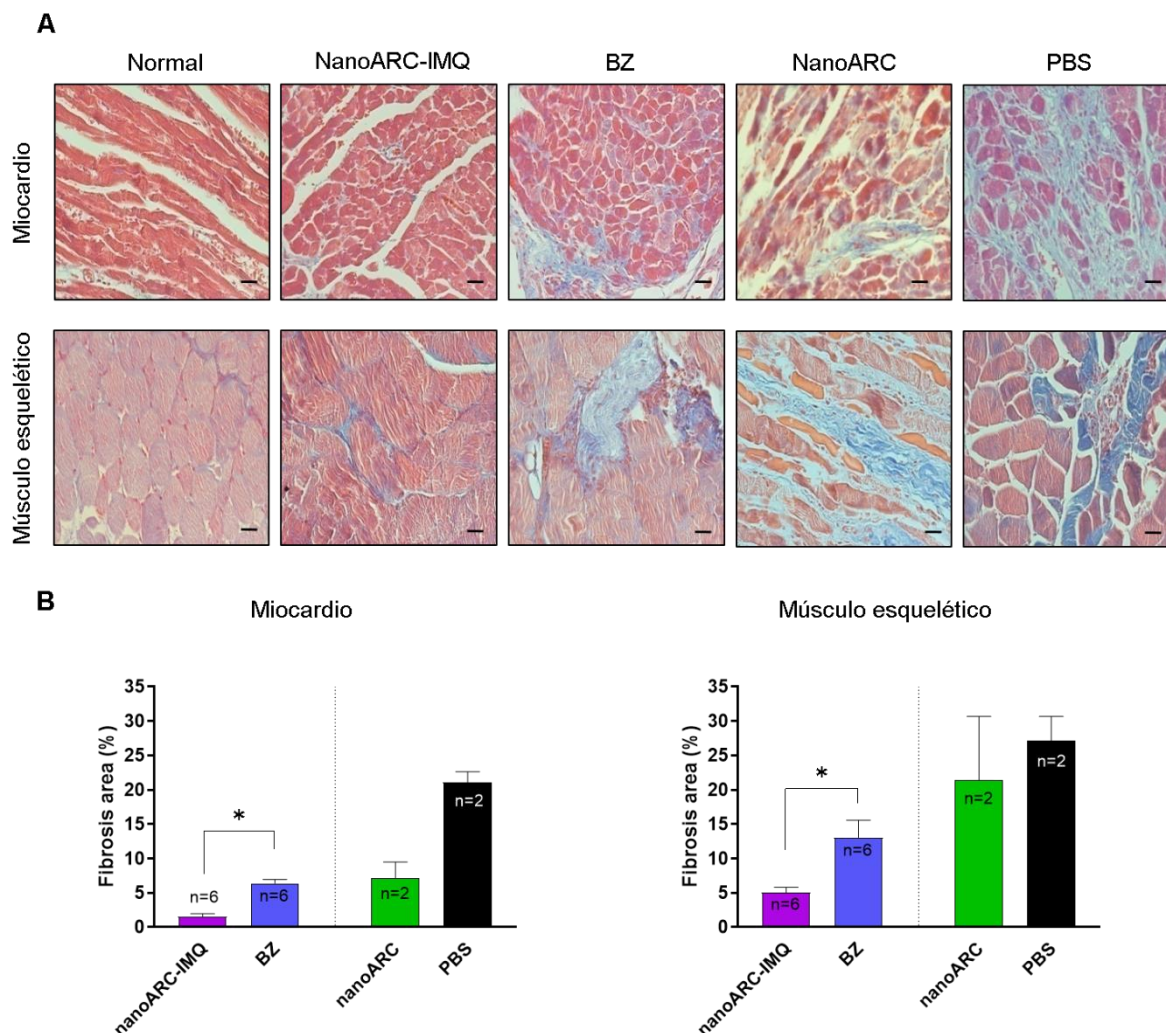


Figura 28: análisis de fibrosis en el miocardio y en el músculo esquelético de ratones infectados con *T. cruzi* y tratados con nanoARC-IMQ o BZ (tinción de tricrómico de Masson). Se observa un escaso depósito de colágeno en secciones del músculo cardíaco y esquelético de ratones tratados con nanoARC-IMQ, y una intensa fibrosis en secciones de animales tratados con BZ. Se incluyen secciones normales y de ratones supervivientes tratados con PBS o nanoARC. Barra de escala: 20 μ m (**A**). También se cuantificó el porcentaje de área fibrótica en los tejidos musculares, mediante un análisis computacional utilizando el software ImageJ (**B**). Los datos están graficados como media $\pm$ E.E. (*, $p < 0.05$). Solo se analizaron estadísticamente los grupos con tres o más ratones supervivientes (nanoARC-IMQ, BZ y normal: $n=6$; nanoARC y PBS: $n=2$).

Aún más, los animales tratados con nanoARC-IMQ mostraron una menor ($p < 0.05$) actividad de las enzimas CK y LDH en suero, que son marcadores clásicos de daño muscular. En los animales tratados con nanoARC-IMQ, las actividades de la CK y

la LDH cayeron a valores de referencia (**Figura 29**). También se registró que el tratamiento con nanoARC indujo niveles similares de CK sérica que BZ, aunque no con significancia estadística, dado el número de ratones sobrevivientes. Asimismo, no se encontraron nidos de amastigotes en el miocardio y los tejidos musculoesqueléticos de ratones infectados con *T. cruzi* tratados con nanoARC-IMQ, mientras que en el músculo esquelético del 50% de los ratones tratados con BZ se encontraron pseudoquistes parasíticos (1-3 pseudoquistes/ $1,5 \times 10^6 \mu\text{m}^2$).

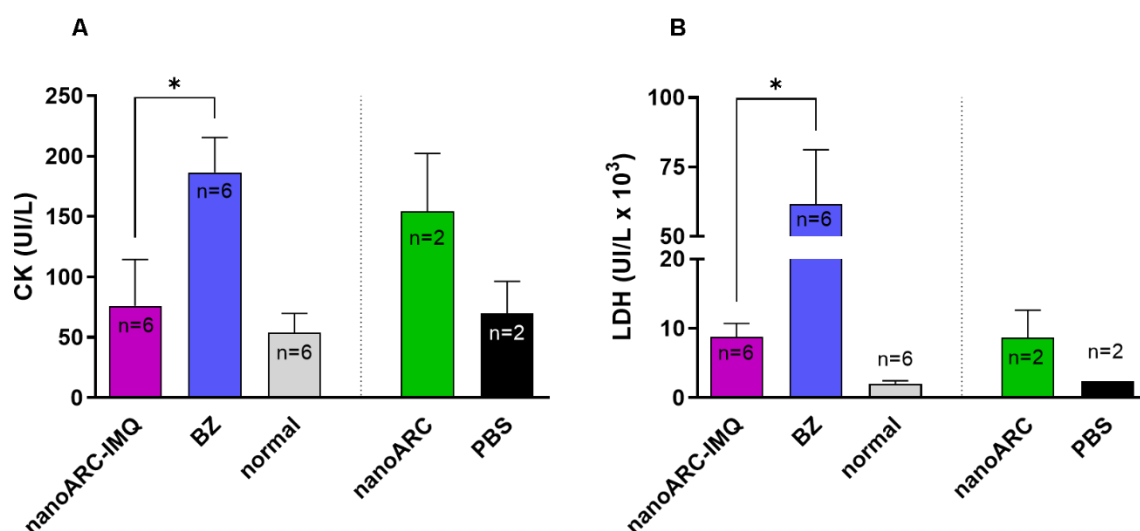


Figura 29: daño tisular a través de marcadores enzimáticos. Los niveles de creatinina quinasa (**A**) y lactato deshidrogenasa (**B**) fueron determinados en suero de ratones infectados con *T. cruzi* y tratados con nanoARC-IMQ, BZ, nanoARC o PBS y ratones normales (no infectados). Los datos se grafican como media $\pm$ EE. Los asteriscos representan diferencias significativas entre nanoARC-IMQ y BZ (*, $p < 0,05$). No se observaron diferencias significativas entre los grupos nanoARC-IMQ y normal. Solo se analizaron estadísticamente los grupos con tres o más ratones supervivientes (nanoARC-IMQ, BZ y normal: $n=6$; nanoARC y PBS: $n=2$).

6.4.5 Niveles de IFN- γ y TNF- α

Las citoquinas pro-inflamatorias, como IFN- γ y TNF- α son críticas para una respuesta anti-*T. cruzi* eficaz durante la infección aguda. Como se muestra en la **Figura 30**, durante la infección aguda, el tratamiento con nanoARC-IMQ provocó un aumento en los niveles séricos de IFN- γ ($p < 0,05$) y TNF- α ($p < 0,01$), en comparación con BZ, el fármaco de referencia. A su vez, los niveles logrados por el BZ fueron similares a los aquellos provocados por el tratamiento con PBS o nanoARC, aunque estos resultados no pudieron ser analizados estadísticamente, debido a que, como

se comentó anteriormente, en esos grupos solo sobrevivieron dos ratones al final del procedimiento.

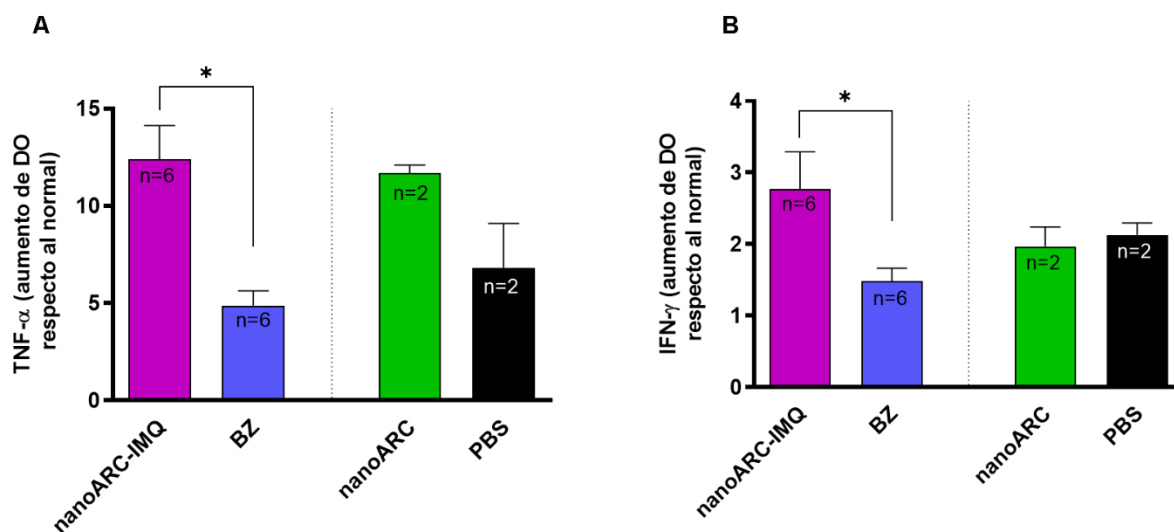


Figura 30: niveles de citoquinas pro-inflamatorias séricas. Los niveles de TNF- α (A) e IFN- γ (B) fueron determinados por ELISA en el suero extraído de los ratones que sobrevivieron al final del tratamiento. Los resultados se expresan como valores normalizados respecto a los observados en animales control (no infectados) y se muestran como la media $\pm$ EE. Los asteriscos indican diferencias significativas entre nanoARC-IMQ y BZ (*, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$). Solo se analizaron estadísticamente los grupos con tres o más ratones supervivientes (nanoARC-IMQ, BZ y normal: $n=6$; nanoARC y PBS: $n=2$)

6.5 Discusión

La miocardiopatía chagásica está caracterizada por una intensa respuesta inflamatoria que provoca miocitólisis, necrosis y fibrosis progresiva (Coura & De Castro, 2002; W. De Souza et al., 2010; Esper et al., 2015; Teixeira et al., 2011). Aunque existe consenso en que la persistencia del parásito es importante para el desarrollo de la enfermedad (Cunha-Neto et al., 2009; Sabino et al., 2015), las evidencias del estudio BENEFIT²⁶ han demostrado que, a pesar de inducir la eliminación del parásito, el tratamiento tripanocida actual no es eficaz para prevenir la progresión de la enfermedad (Morillo et al., 2015). Además, recientemente se ha registrado el caso de un paciente con negativización de anticuerpos después del tratamiento durante la infancia, pero con miocardiopatía de Chagas en la edad adulta (Fernández et al., 2018).

Aunque la patogénesis de la enfermedad de Chagas crónica no se comprende completamente, hay cada vez más pruebas que sugieren un papel clave del parásito en el desencadenamiento y mantenimiento de la respuesta inmunopatológica que conduce al desarrollo de la patología chagásica (Morillo et al., 2015). Estudios recientes que emplean un nuevo método altamente sensible y análisis moleculares exhaustivos han demostrado que la miocarditis puede desarrollarse incluso en ausencia de parásitos en el tejido cardíaco (Lewis et al., 2014).

En el presente estudio, BZ eliminó los parásitos circulantes y evitó la mortalidad en los ratones infectados con *T. cruzi*. Sin embargo, este tratamiento específico de corto plazo no logró evitar el proceso inflamatorio en el corazón y el músculo esquelético. Es probable que el BZ siga siendo el tratamiento de primera línea para la enfermedad de Chagas en los próximos años. Sin embargo, los estudios en curso,

²⁶ Estudio BENEFIT (del inglés Benznidazole Evaluation for Interrupting Trypanosomiasis): estudio de evaluación del benznidazol como tratamiento contra la tripanosomiasis. <https://secardiologia.es/blog/rec/7338-estudio-benefit-estudio-de-evaluacion-del-benznidazol-como-tratamiento-contra-la-tripanosomiasis>

como BENDITA²⁷, ayudarán a determinar si los regímenes más cortos y/o las dosis más bajas pueden mantener la eficacia del régimen estándar y al mismo tiempo mejorar el perfil de los efectos secundarios. Al trabajar con ratones existe un consenso acerca de que el tratamiento de BZ normalmente usado está en realidad sobredosificado. Debido a eso, en los últimos años, la mayoría de los científicos emplean dosis más bajas o administran BZ durante períodos más cortos, en los que se obtienen resultados diferentes dependiendo de las cepas de ratones y de parásitos utilizadas (Cevey et al., 2016; Drugs for Neglected Diseases Initiative, 2019; García et al., 2016; Mazzeti et al., 2018; Muscia et al., 2019; Penitente et al., 2015).

Nuestro novedoso abordaje basado en el uso de nanoARC-IMQ tuvo un notable efecto beneficioso en la progresión de la enfermedad, ya que la administración de nanoARC-IMQ dos veces después de la infección con *T. cruzi* fue capaz de prevenir la mortalidad y reducir los niveles de parasitemia, en comparación con la administración de PBS, nanoARC o IMQ. Además, los ratones infectados, inmunizados con nanoARC-IMQ aumentaron de peso después del pico de parasitemia, y recuperaron su peso corporal normal al final del experimento. Todos los animales que recibieron nanoARC-IMQ mostraron buenos signos de salud, con piel brillante y bien cuidada y un comportamiento activo. Del mismo modo, el tratamiento con nanoARC-IMQ fue eficiente para obstaculizar el desarrollo de lesiones en el miocardio y el musculo esquelético, incluso teniendo en cuenta que la cepa de *T. cruzi* era altamente letal (Mirkin et al., 1997).

En este estudio también evaluamos el daño tisular al determinar las actividades de las enzimas CK y LDH en suero. Estas enzimas se consideran marcadores bioquímicos de la miocardiopatía chagásica experimental (Medeiros et al., 2009), encontrándose una correlación positiva entre los infiltrados inflamatorios y la actividad plasmática de estas enzimas (A. P. De Souza et al., 2000). La

²⁷ Estudio BENDITA (del inglés Benznidazole New Doses Improved Treatment & Therapeutic Associations): estudio realizado entre 2016 y 2018 para evaluar la eficacia de distintos regímenes de BZ (Drugs for Neglected Diseases Initiative, 2019).

administración de nanoARC-IMQ a ratones infectados con *T. cruzi* redujo la actividad sérica de la CK y la LDH, alcanzando valores de referencia similares a los de ratones no infectados. Aunque se observaron lesiones histopatológicas mínimas en el miocardio y el músculo esquelético de animales tratados con nanoARC-IMQ, no fueron tan graves, según la evaluación de la actividad de la CK y la LDH en suero.

No se detectaron parásitos circulantes por medio del examen microscópico en ratones tratados con BZ, a pesar de que todos los animales recibieron una alta dosis i.p. de tripomastigotes. Resulta poco probable que se haya producido una curación espontánea en los animales que no exhibieron parásitos detectables en el torrente sanguíneo, principalmente debido a la magnitud del desafío, y, también porque la autocuración no tuvo lugar en los demás grupos experimentales. Por lo tanto, la negativización de la parasitemia puede atribuirse al efecto parasiticida del BZ. Aunque no evaluamos la infección por métodos directos, sí encontramos anticuerpos específicos anti-*T. cruzi* y una característica inflamación chagásica del tejido. Además, los nidos de amastigotes estaban presentes en músculos del 50% de esos animales. En conjunto, estos datos apoyan la idea de que el daño muscular se debe a la persistencia del parásito en los tejidos. Esta carga parasitaria, capaz de inducir inflamación y fibrosis en los órganos, estaría provocando un aumento de los niveles séricos de CK y LDH.

La búsqueda de nidos de parásitos en los órganos es un método muy utilizado para evaluar la eficacia de una terapia contra la enfermedad de Chagas. En nuestro caso, aunque no se observaron nidos de amastigotes en los ratones infectados con *T. cruzi* y tratados con nanoARC-IMQ, no se podría descartar una infección residual en el tejido.

En este modelo, la respuesta inmunitaria humoral se vio notablemente influenciada por el tratamiento con nanoARC-IMQ. Se detectaron niveles 4 veces más altos de IgG específica en ratones infectados con *T. cruzi* y tratados con nanoARC-IMQ en comparación con los tratados con BZ, con un predominio de IgG2a anti-*T. cruzi*, un isotipo de anticuerpo de ratón asociado con el perfil protector Th1. Aunque el patrón

Th1 es la respuesta típica de la fase aguda de la enfermedad de Chagas, la respuesta humoral más robusta y la mayor polarización observada en ratones que recibieron nanoARC-IMQ maximizarían el control de la replicación del parásito. En nuestro experimento, las citoquinas IFN- γ y TNF- α aumentaron notablemente cuando los animales infectados con *T. cruzi* fueron tratados con nanoARC-IMQ. Varios estudios han demostrado que estas citoquinas asociadas a Th1 son críticas para la adquisición de resistencia a la infección aguda por *T. cruzi* (Gutierrez et al., 2007). Una vez más, nuestros datos sugieren que la terapia con nanoARC-IMQ promovió el desarrollo de una respuesta inmunitaria protectora de tipo Th1 que controló la replicación del parásito y previno el desarrollo de inflamación de los tejidos.

El tratamiento con IMQ libre no fue capaz de proteger a los ratones, de hecho, el 100% de los animales murieron durante la infección aguda de *T. cruzi*. Estos sorprendentes resultados pueden explicarse por la interferencia del IMQ libre con el AR, que está implicado en la regulación negativa de la inflamación aguda (Michael P. Schön et al., 2006). Además de unirse al TLR7 intracelular, el IMQ se une al AR extracelular A_{2a} y ejerce un efecto inhibitorio sobre la actividad de la adenilil ciclasa aguas abajo del receptor, lo que conduce a un aumento de la producción de mediadores inflamatorios y, por consiguiente, a una respuesta inflamatoria más fuerte (ver 4.4.2). Probablemente, en los animales infectados con *T. cruzi* y tratados con IMQ, la unión antagónica del IMQ libre al receptor A_{2a} interfiere con un importante mecanismo de control de la reacción inflamatoria. Por lo tanto, se puede sugerir que los ratones murieron debido a una respuesta inflamatoria intensificada, que se sabe que determina la gravedad de la enfermedad. Sin embargo, los nanoARC-IMQ, internalizados eficientemente por las células fagocitarias (Altube et al., 2016), mejorarían la estimulación del TLR7 intracelular sin interferir con el mecanismo regulador mediado por el AR. Esta hipótesis se apoya en la marcada reducción de la intensidad del daño tisular en los animales tratados con nanoARC-IMQ y la mayor tasa de supervivencia observada, en comparación con los animales tratados con IMQ libre. Curiosamente, encontramos que los músculos de los ratones infectados con *T. cruzi* tratados con IMQ libre exhibieron una intensa infiltración

celular (miocardio: 9963 ± 740 células/ $1,5 \times 10^6 \mu\text{m}^2$; músculo esquelético: 12869 ± 1617 células/ $1,5 \times 10^6 \mu\text{m}^2$) antes del pico de mortalidad, 19 días p.i. Adicionalmente, las secciones de tejido obtenidas de esos ratones mostraron un alto grado de fibrosis ($16,2 \pm 2,2\%$ y $21,1 \pm 1,9\%$ del área total, en el miocardio y el músculo esquelético, respectivamente) asociadas a calcificaciones intensas como resultado de una inflamación severa (datos no mostrados).

Debido a la presencia de grupos metilo perpendiculares y, probablemente, a la presencia de cualquiera de los dos enlaces éter las bicapas de los arqueolípidos, los nanoARC muestran una menor permeabilidad a los iones H^+ y OH^- (casi el triple) que las bicapas de los fosfolípidos ordinarios (Balleza et al., 2014; Mathai et al., 2001). En anteriores estudios inéditos, en los que medimos el pH dentro de los nanoARC-IMQ preparados con LH, lavados y reconstituidos en buffer Tris, empleando la sonda fluorescente dependiente de pH, piranina, según (Overly et al., 1995), encontramos que el valor del pH intramicelar es de alrededor de 7,4. Por lo tanto, es razonable suponer que en una formulación de nanoARC-IMQ, el IMQ está particionado dentro de la bicapa arqueolípida de los nanoARC (según las mediciones de GP y FA de Laurdan) y, debido a su pobre solubilidad en agua neutra, la droga permanece sin disolverse dentro del espacio acuoso de los mismos. Es notable que la fuerte asociación entre el IMQ y las bicapas de los arqueolípidos reduciría las posibilidades de que se libere IMQ antes de que se produzca la internalización por parte de la célula *target*, como ocurre con las actuales formulaciones de IMQ particuladas y no particuladas. Dado que los nanoARC-IMQ se inyectan por vía s.c. (y no i.v.), el IMQ atrapado no se disociaría de las bicapas de los nanoARC, como ocurre con los fármacos liposomales i.v. cuando se someten a una dilución 1/1000-1/2000 en el torrente sanguíneo. Teniendo en cuenta su polidispersidad, se espera que los nanoARC-IMQ más pequeños que quedan en el lugar de la inyección entre la dermis y el músculo, entren en los ganglios linfáticos (Oussoren & Storm, 2001), sin llegar a lugares más alejados. En estos últimos casos; sin embargo, se esperarí una magnificación del efecto inmunomodulador del IMQ siempre y cuando la droga sea tomada como nanoARC-IMQ por las células *target* (revisar sección 5). Así pues, la respuesta sistémica desarrollada sería una

consecuencia del *delivery* específico y masivo del IMQ sólo a las células que expresan RS-A1/2, que se encuentran en el lugar de la inyección o, eventualmente, dentro de los ganglios linfáticos regionales, y no debido a su biodistribución sistémica.

El hecho de que los nanoARC-IMQ no hayan causado una eliminación completa de los parásitos no es un inconveniente, ya que el control temprano del proceso inflamatorio que ejerce esta formulación mejoraría la calidad de vida del paciente al reducir el riesgo de muerte súbita. Los dos medicamentos utilizados para tratar la enfermedad de Chagas, el BZ y el nifurtimox, tienen también serios inconvenientes, como la falta de eficacia para lograr la cura parasitaria o para prevenir la etapa crónica de la enfermedad (Drugs for Neglected Diseases Initiative, 2014). Una quimioterapia ideal para la enfermedad de Chagas, además de ser económica, debe tener pocos efectos adversos, no debe inducir resistencia, y debe ser eficaz en dosis bajas. Nuestro estudio sugiere que el efecto ejercido por BZ podría potenciarse si se combina con unas pocas dosis de nanoARC-IMQ administrado por vía parenteral. Esta estrategia terapéutica ayudaría a lograr un mayor grado de tolerancia al tratamiento, mejorando así la adherencia y deteniendo los efectos causados por la respuesta inflamatoria a la infección de *T. cruzi* en los tejidos objetivo.

6.6 Conclusiones

En esta sección presentamos los resultados del estudio en el que probamos la eficacia de los nanoARC cargados con IMQ como terapia inmunomoduladora. La eficacia *in vivo* de los nanoARC-IMQ para inducir protección contra una infección aguda experimental por *T. cruzi* quedó demostrada por la mejora del resultado clínico, la disminución de los niveles de parasitemia, la prevención de la mortalidad animal y la reducción del daño tisular inflamatorio, un mecanismo clave en la progresión hacia la enfermedad de Chagas crónica. Estos datos alentadores representan una evidencia importante que indica que los nanoARC-IMQ podrían utilizarse solos o en combinación con otros medicamentos parasiticidas como nuevas terapias para el tratamiento de la infección por *T. cruzi*. Este fue el primer paso, ya que al demostrar que los nanoARC-IMQ pudieron disminuir la parasitemia y el daño tisular asociado a una infección aguda de Chagas, las perspectivas son más que alentadoras y el hilo de esta historia queda abierto, para en un futuro probar su eficacia en un modelo murino de infección crónica.

Con los resultados de esta parte del trabajo publicamos el siguiente artículo:

Federico L. Parra, Fernanda M. Frank, Bruno F. Alliani, Eder L. Romero, Patricia B. Petray. **Imiquimod-loaded nanoarchaeosomes as a promising immunotherapy against *Trypanosoma cruzi* infection.** *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 06/02/2020 <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2020.110850>

7 Agonistas de TLRs nanoparticulados: limitando el uso de antibióticos veterinarios y mucho más

7.1 Objetivos

El objetivo particular de esta sección fue revisar los distintos trabajos científicos publicados en revistas con referato, entre el año 2015 y 2020, relacionados con el uso de sistemas de *delivery* nanoparticulados de TLRs como inmunoterapias en el campo veterinario.

¿Qué fue lo que nos motivó a abordar esta problemática? Primero y principal, lo cierto es que la I+D en inmunoterapias veterinarias está mucho menos extendida que en humanos. En parte, porque los altos costos de investigación no se condicen con los potenciales beneficios económicos, dado que el mercado veterinario, como imaginarán, es más acotado que el humano. Esto se magnifica en países en desarrollo, como el nuestro. Aquí, las nuevas tecnologías son incluso más costosas y muchas veces de difícil acceso. Argentina es un país que basa su crecimiento en la industria agrícola-ganadera, por lo que la I+D en vacunas para ganado es (realmente) importante, y, sobre todo, viendo la necesidad de disminuir el uso de antibióticos, por ejemplo, que pueden contaminar la cadena alimenticia general. Les apporto algunos datos del mercado veterinario argentino para que tengan en cuenta. El 80% del mercado está destinado a animales de producción. Si se compara la facturación interna del sector, el 70% corresponde a fármacos (como antiparasitarios y antibióticos) contra el 30% correspondiente a vacunas. Queda en evidencia que la participación de vacunas debe seguir creciendo en favor de posicionar aún más el concepto de prevención en la sociedad (“mejor prevenir que curar” cantan los viejos dichos). Analizando el mercado de mascotas, los fármacos representan el 85% de la facturación (otra vez, principalmente antiparasitarios), y, además, el 95% de las vacunas fueron destinadas a perros (datos de mercado del 2018, <https://www.motivar.com.ar/2019/05/cual-fue-el-mercado-en-2018-sirve-de-base-para-lo-que-viene/>). La situación para mascotas es aún más complicada. Las vacunas existentes son básicamente para las enfermedades zoonóticas más importantes (moquillo, rabia, etc.), pero poco hay para hacer cuando aparecen enfermedades poco comunes o ante el cáncer.

La inmunoterapia ha probado ser exitosa como ayuda para la remisión de tumores en humanos, pero el interés por parte de la industria farmacéutica en desarrollar inmunoterapias eficientes para perros y gatos es limitado. Se necesita más inversión e investigación básica y aplicada en el tema. ¿Por qué entonces no realizar un humilde aporte desde nuestro lado?

7.2 Introducción

7.2.1 Nanotecnología en veterinaria

A nivel global, la sociedad está experimentando cambios profundos y dinámicos, tanto en lo que respecta a la población [se estima que crecerá de 6000 a 8000 millones de personas para 2025 y a 9000 millones de personas para 2050 (Singh Sekhon, 2014)], como a las nuevas demandas de los consumidores (de alimentos más sanos y de alta calidad) (El Sabry et al., 2018). Además, el futuro próximo trae consigo un aumento constante de la población mundial de ganado y aves de corral (prominente en países en desarrollo como China, India y Brasil) y, al mismo tiempo, un aumento significativo de la incidencia mundial de enfermedades zoonóticas y de transmisión alimentaria (The Business Research Company, 2018). La verdadera pregunta es: ¿cómo va a abordar el mercado veterinario estas demandas? En vista de su potencial para mejorar la salud y la productividad de los animales, se espera que las inmunoterapias veterinarias (lideradas por las vacunas) **(Figura 31)** se conviertan en un sector de creciente importancia (Le-flay, 2017). Las demandas de mejora de la salud pública, por ejemplo, pueden satisfacerse reduciendo el uso de antibióticos y hormonas. Más concretamente, las inmunoterapias son la mejor opción para disminuir el uso de antibióticos, reduciendo su impacto ambiental, los efectos secundarios y los residuos en los productos de la cadena alimentaria (Meeusen et al., 2007; Pastoret, 1999). América del Norte es la región más importante para el mercado veterinario (explicado en gran parte por los Estados Unidos); las regiones de Europa occidental y Asia-Pacífico ocupan el segundo y el tercer lugar. Se estima que el 80% del uso de antibióticos en los Estados Unidos se da en animales, mayoritariamente para mejorar los rendimientos y la calidad de la carne (Ventola, 2015).

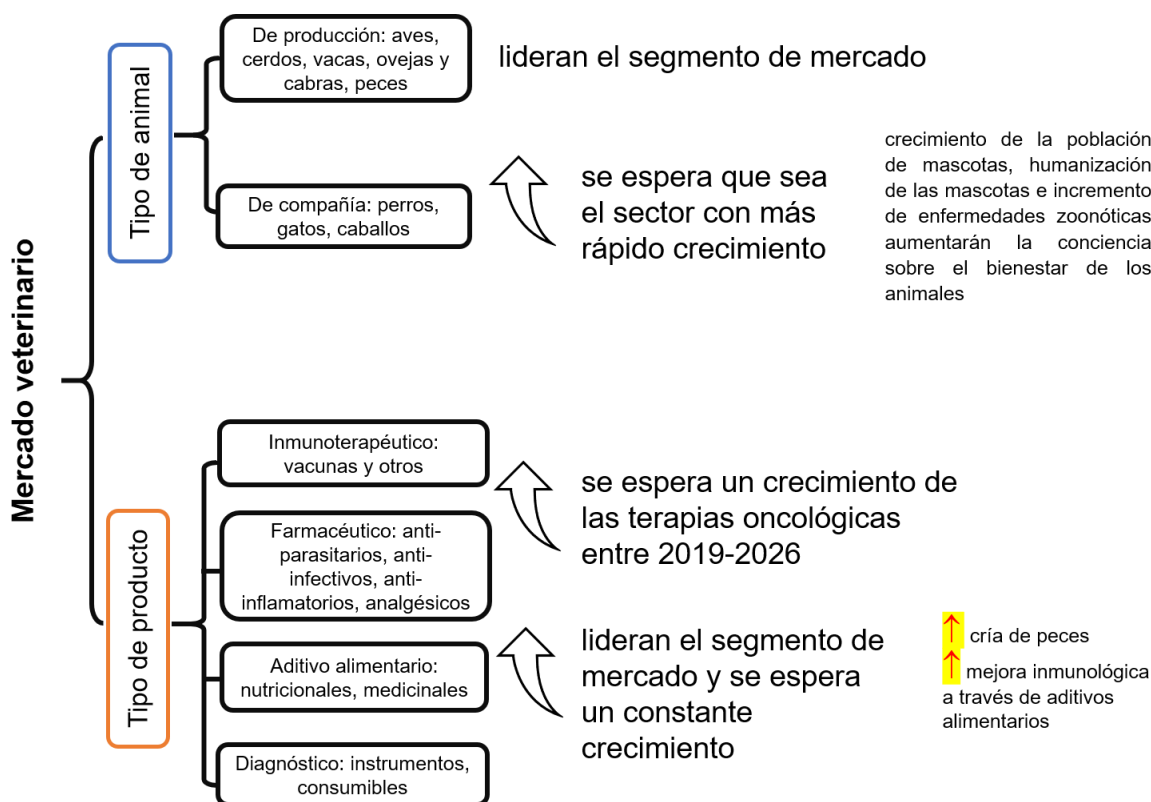


Figura 31: mercado veterinario. El mercado de sanidad animal puede ser segmentado según el tipo de animal (de producción/ganado o de compañía/mascotas) o el tipo de producto (inmunoterapéutico, farmacéutico, aditivo alimentario o diagnóstico) (Grand View Research, 2020). Se prevé que el tamaño mundial de este mercado experimente un crecimiento durante el período 2020-2027 (Grand View Research, 2020; Research And Markets, 2017). Los animales de producción han dominado en los últimos años, hecho que se explica por la preocupación mundial por lograr seguridad alimentaria, lo que impulsa la producción de alimentos en gran escala y da lugar a una mayor cría de ganado (Grand View Research, 2020). En este sentido, se prevé que la población total de ganado aumente en los próximos años, especialmente en países en desarrollo como China, India y Brasil. China, por ejemplo, es líder mundial en la producción de carne de cerdo, y en Brasil el mercado veterinario está dominado por productos (principalmente vacunas, anti-parasitarios y anti-microbianos) para el ganado (principalmente vacuno) (Gouvea Omote & Sluszz, 2013). Esto, junto con el aumento de las enfermedades zoonóticas, la creciente conciencia sobre la salud animal, los avances tecnológicos y las iniciativas gubernamentales, explican el impulso al crecimiento del mercado. Sin embargo, se estima que el segmento de animales de compañía crezca a un ritmo exponencial y que las vacunas tengan, a partir de eso, un crecimiento mayor (Research And Markets, 2017). Esto se debe al continuo aumento de la población de mascotas y a la humanización de las mismas (The Business Research Company, 2018). Los aditivos alimentarios son los productos con la cuota dominante en el mercado y se espera que ésta siga creciendo. Éstos incluyen modificadores metabólicos, enzimas, minerales y probióticos que ayudan a aumentar el crecimiento muscular, optimizando así la utilización de los alimentos (Grand View Research, 2020). Un dato interesante es que la acuicultura es uno de los sectores de producción de alimentos de más rápido crecimiento, proporcionando casi la mitad de todo el pescado para la alimentación humana (y se espera que aumente hasta el 62% para 2030) (FAO, 2014). Los aditivos alimentarios son especialmente importantes en este punto porque pueden ayudar a potenciar el sistema inmunológico y contribuir a mejorar el cultivo de peces. Por último, cabe mencionar que se prevé que las actividades de investigación emprendidas para el desarrollo de nuevas formulaciones y terapias anticancerígenas aceleren el crecimiento del segmento de la oncología veterinaria (Coherent Market Insights, 2019).

Por otra parte, a pesar de que las vacunas veterinarias se asocian comúnmente con enfermedades infecciosas (McVey & Shi, 2010), hay un creciente interés en desarrollar inmunoterapias para animales de compañía (Meeusen et al., 2007), que también sufren de enfermedades no infecciosas, como cáncer [la quimioterapia es el tratamiento preferido actualmente para los tumores de las mascotas, a pesar de su efecto negativo en la salud de los pacientes y sus beneficios a menudo limitados (Regan et al., 2016)] y trastornos alérgicos. Este amplio y desafiante panorama requiere de nuevos productos terapéuticos y es una oportunidad única para la intervención de las nanotecnologías, un conjunto de tecnologías basadas en las novedosas propiedades de los materiales en la nanoescala (United States National Nanotechnology Initiative, s. f.). Las nanotecnologías ya han revolucionado varios mercados industriales, en particular el de medicina humana (Anselmo & Mitragotri, 2019), pero son relativamente nuevas en terapéutica veterinaria y producción animal (Bai et al., 2018; Carvalho et al., 2020; Hill & Li, 2017). El porfolio de medicamentos para seres humanos se ha ampliado constantemente en los últimos 25 años, con nanomedicinas caracterizadas con precisión y producidas de acuerdo a normas GMP, de mejor efecto terapéutico y perfil ADME-Tox²⁸ que los medicamentos convencionales (Crommelin et al., 2020). La farmacocinética, biodistribución y farmacodinamia de los ingredientes farmacéuticos activos (APIs) pueden modificarse profundamente al ser encapsulados en NPs diseñadas adecuadamente. Las NPs también pueden proteger la estructura de APIs lábiles, proporcionando una amplia internalización por células seleccionadas hacia compartimentos intracelulares. Estas capacidades únicas de los sistemas nanoparticulados han demostrado ser útiles para el diseño de agentes antimicrobianos y antitumorales menos tóxicos y más eficaces (Choi & Hong, 2020). Los mismos principios clave pueden utilizarse para diseñar sistemas nanoparticulados para prevenir y controlar las enfermedades del ganado y para hacer que la cría de animales sea más rentable para los agricultores. Además,

²⁸ **ADME** significa **A**bsorción, **D**istribución, **M**etabolismo y **E**xcreción y es una expresión que se utiliza para describir la disposición de un compuesto farmacéutico en el organismo. Si se toma en cuenta la toxicidad del compuesto el término se convierte en **ADME-Tox** o **ADMET**.

incluso el bienestar de los animales es un sector que potencialmente podría beneficiarse por las nanotecnologías. Las NPs permiten cambiar las vías de administración de los medicamentos o de las vacunas entre formulaciones parenterales y orales o tópicas, y viceversa. Algunas NPs, por ejemplo, penetran profundamente en el estrato córneo empleando las vías de los folículos pilosos, por lo que no es necesario una afeitada para su aplicación, lo que reduce la cantidad de droga necesaria para obtener el mismo efecto clínico, y por lo tanto, la hace más rentable y segura (El-Sayed & Kamel, 2018; Fender, 2018; Swain et al., 2015; Tatli Seven et al., 2018).

Tradicionalmente, el sector veterinario terapéutico se inclina hacia los productos farmacéuticos en lugar de las inmunoterapias. Esto se debe a los costos excesivos, el bajo margen de beneficios (los rendimientos económicos de las vacunas veterinarias son casi 50 veces menores que los de las vacunas para los seres humanos) y los desafíos de los ensayos clínicos veterinarios (Klingemann, 2018; Kunsel & Sumant, 2019). A pesar de ello, el carácter habilitante de las nanotecnologías y la capacidad de aumentar el valor añadido de los productos, puede revertir el escaso interés de las empresas de biotecnología en el nicho inmunoterapéutico veterinario.

Las inmunoterapias activas o pasivas (National Cancer Institute - National Institutes of Health (NIH) - U.S. Government, s. f.) son mediadas por moléculas dirigidas que activan receptores del sistema inmune. Las inmunoterapias veterinarias pasivas basadas en anticuerpos monoclonales, sin embargo, a diferencia de lo que sucede en humanos, se prevé que serán excesivamente costosas y de éxito incierto, debido a las diferencias fisiológicas entre animales de distinto sexo y especie, combinadas con un conocimiento incompleto de cada sistema inmunológico (hecho que se refleja en los pobres resultados obtenidos en animales de compañía) (Johannes, 2019; Klingemann, 2018). Además, aunque la nanotecnología puede mejorar el rendimiento de ciertos APIs, las NPs combinadas con anticuerpos, además de no alcanzar el éxito esperado en humanos (Wolfram & Ferrari, 2019), resultan de difícil caracterización estructural y escalado, hechos que pueden desdibujar su aceptación

en el campo veterinario. Por el contrario, las inmunoterapias veterinarias mediadas por NPs que incorporen moléculas menos complejas y más baratas que los anticuerpos, pueden superar estos obstáculos. Por ejemplo, los agonistas de TLRs son moléculas pequeñas y secuencias cortas de ácidos nucleicos que ya han sido explorados para tratar a animales de compañía o de producción contra patologías de diverso origen. La estimulación de la inmunidad innata con un mismo agonista de TLR nanoparticulado (es decir, que ha sido encapsulado en una NP, y que abreviaremos a partir de aquí TLR-NP), ha demostrado tener una efectiva actividad tanto antitumoral como antimicrobiana o antialérgica. Esto es notable, ya que, a pesar de estar muy conservados en los mamíferos, diferentes especies animales pueden presentar diferentes patrones de expresión de TLRs (Barchet et al., 2008), así como diferente especificidad para distintos agonistas (Vaure & Liu, 2014). Por consiguiente, esta sección de la tesis tiene por objeto analizar críticamente el rendimiento de las últimas formulaciones experimentales y ya comercializadas de los TLR-NPs.

7.2.2 Utilizando la inmunidad innata para activar las respuestas inmunes adaptativas

En la actualidad, se está llevando a cabo una intensa tarea de investigación para desarrollar nuevos agentes inmunoterapéuticos basados en agonistas de TLRs. Estos esfuerzos se basan en los considerables conocimientos adquiridos en la última década, sobre los mecanismos del sistema inmunológico innato humano. Es ampliamente conocido que la inmunidad innata es clave para controlar y aumentar las respuestas inmunitarias adaptativas (Medzhitov et al., 1997; Schenten & Medzhitov, 2011). La respuesta inmune innata, representada por los leucocitos (macrófagos, CDs y células NK) y el complemento es la primera línea de defensa contra los patógenos. Las respuestas innatas son más rápidas (minutos/horas) que las adaptativas, que están mediadas por anticuerpos y células T (días/semanas). Las respuestas innatas también decaen más rápido, para limitar el daño a los tejidos resultante de su potencia e inespecificidad. Uno de los principales mecanismos para desencadenar la inmunidad innata consiste en activar los PRRs en las CPA

mediante motivos microbianos conservados estructuralmente conocidos como PAMPs y moléculas propias conocidas como patrones moleculares asociados al daño (DAMPs). Los DAMPs incluyen múltiples proteínas de choque térmico, S100, y la *proteína del grupo de alta movilidad box 1* (HMGB1), que se liberan en respuesta a lesiones o a cualquier otra anomalía en las células (Schaefer, 2014). Hay varios tipos de PRRs, como los receptores tipo RIG-I, tipo NOD y los TLRs. Los TLRs son una familia de PRRs altamente conservados en mamíferos, y consisten en proteínas transmembrana localizadas en la superficie celular y en los compartimentos endosómicos (Kawai & Akira, 2010; Takeda et al., 2003; Takeuchi & Akira, 2010), cuya activación conduce a la liberación de mediadores inflamatorios. Los TLRs se expresan típicamente en macrófagos y CDs (Meylan et al., 2006; Seya et al., 2009), y son los PRRs más ampliamente estudiados en relación con el desarrollo adyuvantes, inmunomoduladores o inmunoestimuladores (Dowling & Mansell, 2016). Una vez reconocidos, la activación de los TLRs desencadena señales aguas abajo mediadas por su receptor TIR, habilitado por proteínas adaptadoras como TRIF, MyD88, TRAM, TIRAP o TRAF3 o 6 (Kawasaki & Kawai, 2014). Las cascadas de señalización terminan en la translocación del NF- κ B y del IRF3/7 al núcleo, con la consiguiente producción de citoquinas pro-inflamatorias y de IFNs de tipo I, útiles para combatir las infecciones bacterianas, virales y parasitarias (**Figura 32**) (Fouzder et al., 2019; Kaisho & Akira, 2006; Medzhitov et al., 1997; Takeda & Akira, 2005). Concretamente, TLR3, TLR7, TLR8 y TLR9 son receptores endosómicos, cuyo dominio de unión de ligandos está orientado hacia el lumen endosómico y, por lo tanto, a diferencia de los TLRs de superficie, sólo se activarían por material endocitado (S. Akira, 2006). Estos TLRs reconocen diferentes clases de ácidos nucleicos bacterianos, virales y endógenos: TLR3 es un receptor de ARNdc, TLR7 y 8 reconocen ARNsc e imidazoquinolinas, mientras que TLR9 es activado por ADNsc no metilado (Panter et al., 2009).

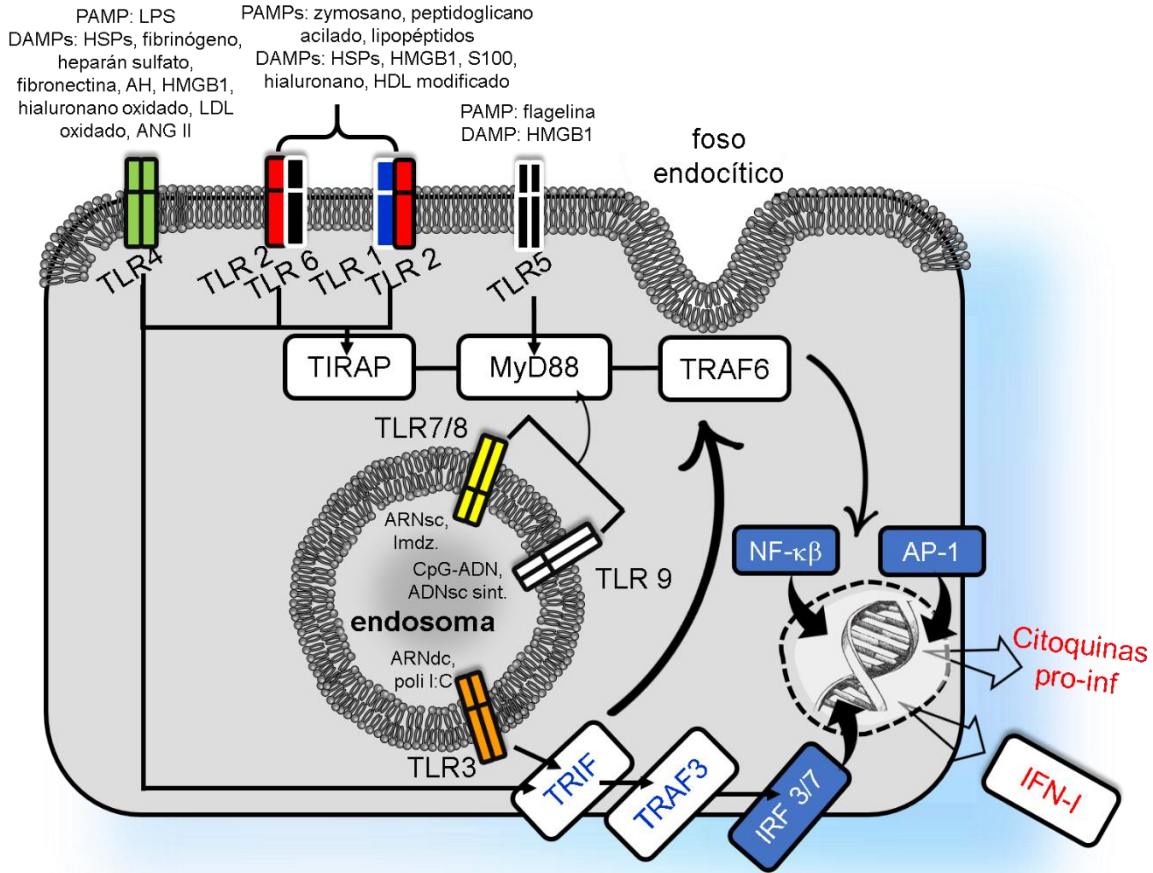


Figura 32: esquema simplificado de las vías de activación de TLRs y sus ligandos. Los TLRs reconocen una amplia variedad de moléculas, tanto PAMPs (asociadas a microorganismos patógenos), como DAMPs (que se originan en el interior celular o en el espacio extracelular en respuesta al daño). Los TLRs de superficie reconocen componentes de las paredes celulares de bacterias y hongos, como LPS (TLR4), peptidoglicanos, lipoproteínas y polisacáridos (TLR2/6 o 2/1) o la proteína flagelina (TLR5) (Kaisho & Akira, 2006). Los receptores endosómicos (TLR3, 7, 8 y 9), cuyo dominio de unión a ligandos se enfrenta al lumen endosómico, a diferencia de los de superficie, sólo se activan por material endocitado (S. Akira, 2006). Estos TLRs reconocen diferentes clases de ácidos nucleicos bacterianos, virales y endógenos: TLR3 es un receptor de ARNdc y de la molécula sintética poli I:C y sus derivados; TLR7 y 8 reconocen ARNsc e imidazoquinolinas (imd.), mientras que el TLR9 es activado por ADN de bacterias y virus, que contiene una alta frecuencia de secuencias CpG no metiladas (CpG-ADN), y por secuencias de ADNsc sintéticas (ADNsc sint.) (Panter et al., 2009). TLR2 y TLR4 son los receptores de los que más se conocen ligandos DAMPs, entre los que se encuentran una amplia gama de proteínas como HMGB1 y S100, materiales derivados de matriz extracelular, como hialuronano, y otros compuestos no proteicos, como heparán sulfato (Schaefer, 2014). Ya sea por la unión de PAMPs o DAMPs, los TLRs desencadenan su respuesta a través de su receptor de dominio intracelular TIR, habilitado por las proteínas adaptadoras MyD88, TIRAP, TRIF y TRAF (Kawasaki & Kawai, 2014), que aguas abajo activan a los factores de transcripción NF-κβ, AP-1 e IFN3/7, que traslocan al núcleo generando la expresión de citoquinas pro-inflamatorias e interferones tipo I (Shizuo Akira & Takeda, 2004; Fouzder et al., 2019; Medzhitov & Janeway, 1998; Takeda et al., 2003). Otras abreviaciones de este esquema: ANG II: angiotensina II; AH: ácido hialurónico; HSPs: proteínas de choque térmico.

Los adyuvantes inmunoestimuladores consisten en su mayoría en moléculas que imitan a PAMPs, actuando como agonistas de TLRs y evocando poderosas respuestas inmunológicas celulares adaptativas. Muchos de ellos se encuentran en desarrollo preclínico o en ensayos clínicos humanos y funcionan como antitumorales o como adyuvantes de vacunación contra patógenos intracelulares (Anwar et al., 2019). Los agonistas de TLR3 y TLR7 están incluidos en el ranking del Instituto Nacional del Cáncer (E.E.U.U.) como los agentes inmunoterapéuticos con mayor potencial para mejorar la terapia antitumoral en humanos (Mac Cheever, 2008).

7.2.3 Problemas de toxicidad sistémica en la administración de agonistas a TLRs y cómo solucionar esto con nanopartículas

Los agonistas de TLRs poseen la capacidad única de inducir una intensa respuesta pro-inflamatoria que permite su uso como inmunoestimuladores, pero esta es una cara de la moneda. La otra cara, responsable de dificultar su amplia aplicación, es la peligrosidad de su administración parenteral. Un agonista a TLR puede causar reacciones letales de tipo shock tóxico séptico y contribuir a la disfunción de órganos remotos, no relacionados físicamente con la zona tratada (Engel et al., 2011; Kanzler et al., 2007; Levy et al., 2007; Schmidt et al., 2007; Steiner et al., 2011). Por ejemplo, el adyuvante FCA contiene micobacterias muertas (consiste en *Mycobacterium tuberculosis* destruidas por calor [tienen ligandos para TLR2, TLR4 y TLR9] en aceites no metabolizables [aceite de parafina y monooleato de manida]) y dimicolato de trehalosa 6,6' (TDM), que estimula el receptor de lectina dependiente de Ca^{2+} inducible por macrófagos (Mincle, un CLR). El FCA puede utilizarse para producir emulsiones W/O de antígenos. La inyección de antígenos en FCA induce una respuesta dominada por Th1 en comparación con la inyección en el adyuvante FIA, que carece de componentes micobacterianos e induce una respuesta dominada por Th2 (©InvivoGen, 2020), y se asocia no sólo con respuestas de anticuerpos más altas (Freund et al., 1937; Stils Jr., 2005), sino también con una mayor toxicidad y reacciones de hipersensibilidad de tipo retardada en comparación con el IFA (Raffel, 1948). En experimentos con animales, la inyección local (s.c.) o

sistémica (i.p.) de 10 a 100 g/kg del agonista a TLR4, LPS, y de los agonistas a TLR2/6, MALP-2 (*lipopéptido-2 activador de macrófagos*) o FSL-1 (*lipopéptido-1 estimulante de fibroblastos*), induce fiebre, anorexia, adipsia y reducción en la locomoción de los individuos vacunados (Hübschle et al., 2006; Knorr et al., 2008, 2010; Ross et al., 2003; Rummel et al., 2004; Steiner et al., 2005, 2006). En cambio, los agonistas de TLR7 y TLR3, como IMQ y poli I:C, si bien no causan una toxicidad extrema al administrarlos (Voss et al., 2006), sí causan reacciones lo suficientemente intensas como para -como en el caso del IMQ- ser aprobados para su uso clínico en humanos como formulación tópica (European Medicines Agency, 2008). La administración s.c. de 5 mg/kg de IMQ, no sólo induce citoquinas inflamatorias locales, sino que también actúa en órganos distantes como el hígado y el bazo, incluida la expresión de genes inflamatorios en el cerebro. En una inyección s.c., el material inyectado se retiene en una “bolsa” de aire. La toxicidad de la inyección s.c., se debe al escape del IMQ (debido a su bajo peso molecular) de es “bolsa” (Damm et al., 2012). Además, incluso la administración tópica de altas dosis de IMQ induce toxicidad sistémica en los seres humanos (Hanger et al., 2005). Por otro lado, en ensayos clínicos en seres humanos, altas dosis de poli I:C administradas por vía parenteral inducen niveles bajos de IFN, pero efectos altamente tóxicos (Martins et al., 2015), como fiebre y anemia; y dosis similares en perros generan efectos adversos graves (Homan et al., 1972).

7.2.4 Las nanopartículas reducen la toxicidad de los agonistas de TLRs y proveen *targeting* endosómico

Una estrategia eficiente para reducir la toxicidad de administraciones s.c. o intradérmicas (i.d.) de agonistas de TLRs es encapsularlos en NPs (Lu et al., 2019). Al hacerlo, se cumplen tres importantes objetivos. El primero es un escape limitado de los agonistas desde el sitio de administración a la circulación sistémica. Confinados a su entorno cercano, cuando se cargan en NPs, los agonistas no se liberan, evitando la inducción de citoquinemia (presencia de citoquinas en la sangre) tóxica. Adicionalmente, en humanos y primates (pero no en ratones) se produce una rápida degradación de los agonistas (pesados y lábiles), como el poli I:C, por las

ribonucleasas, ubicuas en el plasma y en los tejidos (Steinhagen et al., 2011). Si se atrapa en NPs, la degradación previa del poli I:C lejos de su sitio objetivo puede reducirse. Además, la toxicidad de muchos agonistas, no mediada por los TLRs en sí sino por otros receptores, también puede reducirse cuando se cargan en NPs, como ocurre con la actividad antagonista del IMQ en los receptores de adenosina (Michael P. Schön et al., 2006). En general, las NPs pueden ser diseñadas como depósitos *in situ* de agonistas de TLRs (que mejoran su entrega en forma intacta a los TLRs de superficie) o para ser internalizadas. El segundo objetivo que se produce con la internalización de NPs, es la entrega endocítica masiva de los agonistas de TLRs (Donahue et al., 2019) **(Figura 33)**. Al producirse la endocitosis de las NPs, los agonistas llegan específicamente a los TLRs endosómicos, aumentando su actividad a dosis bajas (ver resultados de la sección 5). El tercer propósito está relacionado con el segundo, y consiste en una reducción de la toxicidad de los agonistas de TLRs, que resulta del tráfico intracelular inapropiado. Por ejemplo, el poli I:C no sólo activa al TLR3 endosómico en CDs o macrófagos, sino también a un RLR, el receptor citoplasmático MDA5 (*proteína-5 asociada a la diferenciación de melanoma*), distribuido de forma ubicua. En general, la activación de MDA5 causa la inflamación sistémica y la citoquinemia observada en infecciones virales. La vía de señalización de las proteínas RIG-I y MDA5 activadas converge en la proteína adaptadora crítica MAVS (*proteína de señalización antiviral mitocondrial*), responsable de la inflamación sistémica. Por lo tanto, el acceso citoplasmático del poli I:C es la causa de la toxicidad. El inmunoestimulante ARNAX, actualmente en ensayos clínicos (Seya et al., 2019), es una molécula híbrida de ADN/ARN, que difiere del poli I:C en que no induce la inflamación sistémica en ratones, tras su administración parenteral. La seguridad de ARNAX se debe a su captación endocítica, que le proporciona su orientación endosómica hacia el TLR3, mientras que se evita la activación de la ruta citoplasmática de MAVS. Encapsular poli I:C en NPs proporcionaría un *delivery* exclusivo del agonista a los endosomas, evitando su acceso citoplasmático.

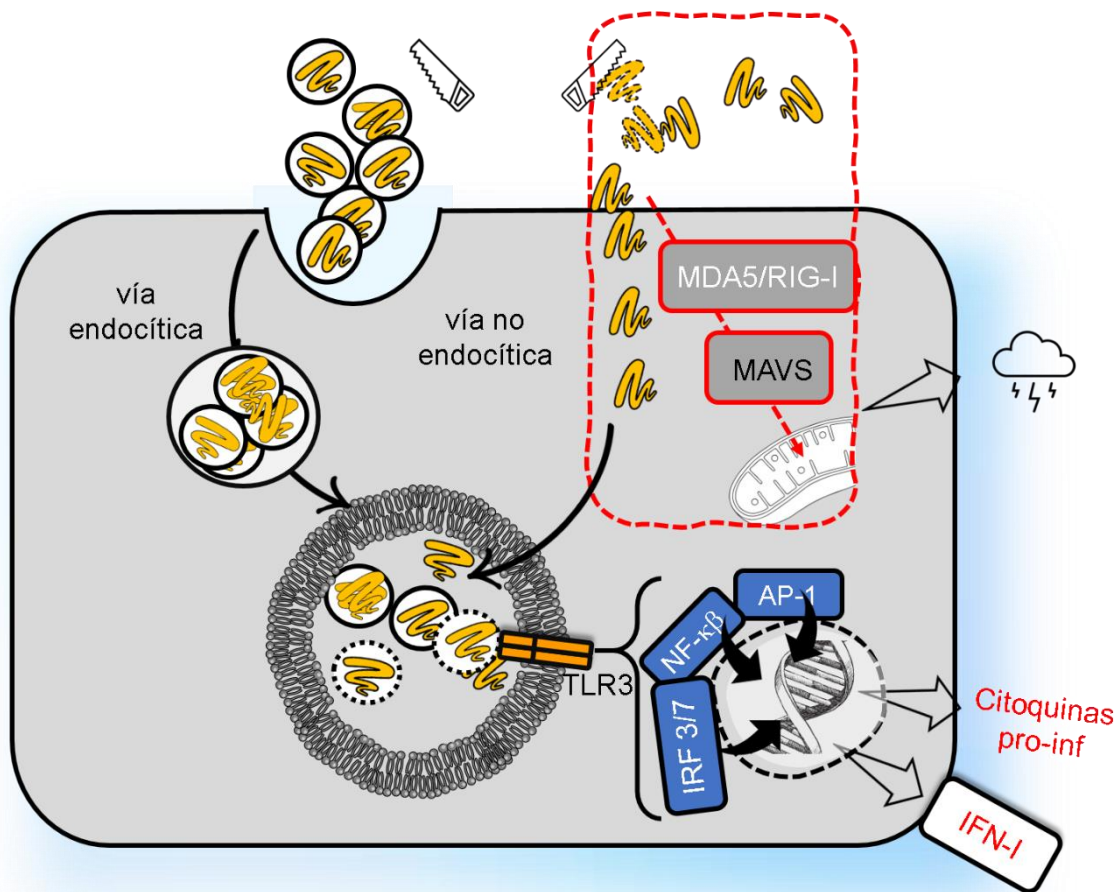


Figura 33: esquema simplificado de targeting endosomal de un agonista de TLR3 mediado por NPs. Se observa claramente cómo, a partir de su encapsulación en una NP, el agonista escapa de la ruta citoplasmática de la proteína de señalización antiviral mitocondrial (MAVS), ya que, gracias a la captación de las NPs por la vía endocítica, el agonista es entregado directamente en el endosoma, donde se encuentra el receptor TLR3. Símbolos representados en este esquema: inflamación sistémica no relacionada con TLR3; nucleasas; agonista de TLR; TLR-NP; agonista de TLR degradado; NP degradada

Finalmente, encapsular agonistas en NPs ofrece la oportunidad de activar simultáneamente dos TLRs. Por ejemplo, en los macrófagos de ratones, los TLR3 y 7 se expresan en el mismo compartimiento endosómico (Nishiya et al., 2005). Cargar agonistas de TLR3 y TLR7 en las mismas NPs permite un doble *targeting* endosómico. Recientemente se informó de que al captar endocíticamente micelas de fosfolípidos que contienen IMQ complejadas con poli I:C, se produce una activación sincrónica y sinérgica de TLR7 y TLR3, lo que da lugar a potentes adyuvantes antitumorales en ausencia de inflamación sistémica (Bocanegra

Gondan et al., 2018). Ejemplos adicionales de *targeting* endosomal se encuentran en (Lynn et al., 2015; Song et al., 2019).

7.2.5 Nuevos desafíos de la inmunización veterinaria

Las vacunas de organismos vivos atenuados, aunque son eficaces y proporcionan inmunidad en la mucosa, necesitan un almacenamiento y transporte en cadena de frío, presentan una vida útil corta, problemas de seguridad (en animales preñados) y pueden causar inmunosupresión. Incluso, los virus de tipo silvestre pueden volver a la virulencia por mutación o recombinación genética (Lowenthal et al., 2005; Peek et al., 2008). La vacunación con microorganismos inactivados o con subunidades, a pesar de ser más segura e inducir principalmente una inmunidad sistémica humoral, es menos eficaz porque no induce una respuesta en la mucosa (esencial para evitar la entrada de la mayoría de los patógenos que invaden el huésped en las superficies de la mucosa). Este tipo de vacunas suelen requerir frecuentes inmunizaciones de refuerzo con potentes adyuvantes, como los basados en aceites minerales, que sólo se aceptan en veterinaria debido a su toxicidad (Burakova et al., 2018; McVey & Shi, 2010; M. Singh & O'Hagan, 2003). La vacuna veterinaria ideal debe ser segura, eficaz y proporcionar una protección robusta y duradera contra un amplio espectro de patógenos. Al mismo tiempo, la vacunación debe ser fácil de administrar, a menudo a gran escala, y ser rentable.

Por otra lado, el uso indiscriminado de antibióticos es en parte responsable de la aparición de cepas resistentes de patógenos, y puede potencialmente aumentar la contaminación ambiental y el contenido residual en productos consumibles, como la carne o los huevos (Cummings, 2006; Vidovic & Vidovic, 2020). Se prevé que el uso mundial de antibióticos en la producción ganadera y la agricultura (estimado en 63000-240000 toneladas métricas al año) aumentará en un 67% de 2010 a 2030, especialmente en las economías emergentes (Jonas et al., 2017). Las inmunoterapias son la mejor alternativa al uso de antibióticos (Hoelzer et al., 2018; Postma et al., 2015) (**Figura 34**) y aquí es donde los TLR-NPs podrían contribuir significativamente, superando los defectos de seguridad, eficacia y/o facilidad de uso que limitan la capacidad de las vacunas para sustituir el uso de antibióticos.

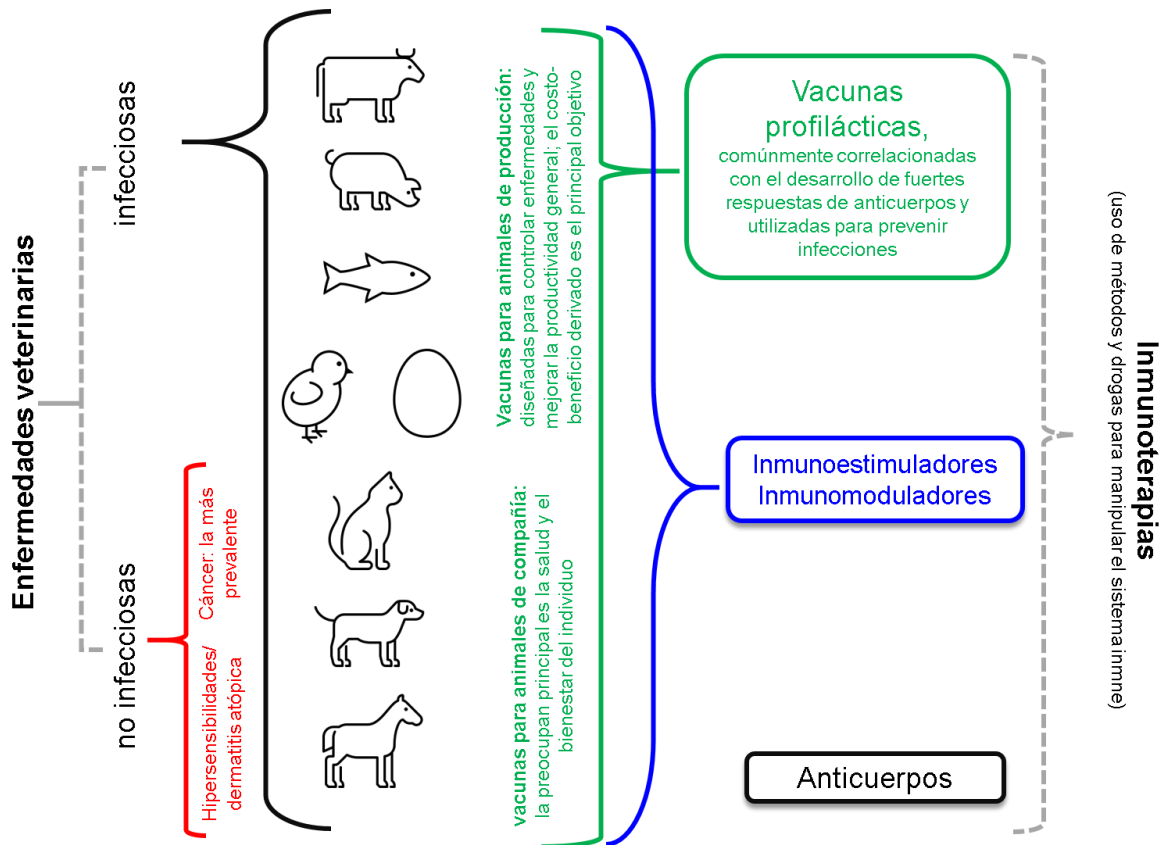


Figura 34: enfermedades veterinarias e inmunoterapias. Tanto animales de producción como de compañía sufren de enfermedades infecciosas, aunque en perros y gatos, por ejemplo, también hay una alta prevalencia de cáncer (Klingemann, 2018) y dermatitis atópica (Gedon & Mueller, 2018), mientras que los caballos son afectados más fuertemente por hipersensibilidades en las vías aéreas. Las inmunoterapias son la mejor alternativa para atacar estas enfermedades reduciendo al mismo tiempo el uso de antimicrobianos. Las vacunas profilácticas son las inmunoterapias más utilizadas, y buscan, de manera general, desarrollar fuertes respuestas de anticuerpos en los animales vacunados y así prevenir las infecciones (Tizard & Payne, 2011). A la hora de diseñar nuevas estrategias de vacunación, los objetivos son diferentes para uno u otro grupo de animales: mientras que para el ganado se busca mejorar la productividad privilegiando el costo/beneficio, para las mascotas, la principal preocupación es la salud del animal (Burakova et al., 2018; Meeusen et al., 2007). Siendo que las inmunoterapias pasivas (anticuerpos) no han dado los mejores resultados y su producción es costosa, las moléculas inmunomoduladoras o inmunostimuladoras del sistema inmune son una alternativa atractiva para mejorar las actuales inmunoterapias activas, específicas (como las vacunas) o inespecíficas (la utilización por sí mismas como agentes terapéuticos). Dibujos representados en esta figura:

Vacas; cerdos; peces; pollos; perros; gatos; caballos

7.3 Inmunoterapéuticos veterinarios basados en sistemas de *delivery* nanoparticulados de agonistas de TLRs

Como señalamos anteriormente, en el contexto actual, el diseño y la producción de NPs que encapsulen agonistas de TLRs puede ayudar a superar los defectos de que limitan la capacidad de las vacunas para sustituir el uso de antibióticos. En primer lugar, los TLR-NPs pueden ayudar a sustituir la vacunación con microorganismos atenuados, inactivados o subunidades, cuyas desventajas ya hemos nombrado.

Los TLR-NPs pueden ayudar a reducir el uso de antibióticos, ya sea por una acción directa como inmunoestimuladores o como adyuvantes de vacunación, mediante: a) la sustitución de adyuvantes extremadamente tóxicos; b) la reducción del número de inmunizaciones de refuerzo requeridas para que la vacuna logre una determinada eficiencia; c) el cambio de la administración por vía parenteral a vía mucosa, induciendo inmunidad secretora (ya que la NP puede proteger las moléculas asociadas contra la digestión enzimática y adherirse a las superficies de la mucosa) (Holmgren et al., 2003); d) proporcionar protección cruzada de serotipos, en particular para serovariedades menores para los que no se dispone de vacunas vivas atenuadas, lo que es importante, por ejemplo, en la vacunación contra la *Salmonella*, *E. coli* y algunos virus. Además de actuar como antimicrobianos, su capacidad de modificar el perfil de las citoquinas de alergénicas a pro-inflamatorias, permite que los TLR-NPs actúen como inmunomoduladores.

A partir de aquí, se describirá el rendimiento de distintos agonistas nanoparticulados de TLR3, TLR4, TLR5 y TLR9, como adyuvantes de vacunación o por sí solos, para cada enfermedad y especie animal, y en el final, se hará una discusión crítica. Las características estructurales de cada TLR-NP y su esquema de tratamiento, se muestran en la **Tabla 4**.

Receptor; agonista	Sistema de <i>delivery</i> ; composición; método de preparación; propiedades	Enfermedad; tipo de antígeno	Animal; ruta de administración; dosis; desafío
TLR3; Poli I:C	Liposomas (lecitina:Chol 10:1 p/p) en emulsiones W/O (VaccinMax®) (Saravanan et al., 2015).	FA; antígeno: virus inactivado (serotipos O, A y Asia1).	Vacas; 1 o 2 dosis s.c. o i.m. (días 0 y 180); desafío: 365 d.p.v. y 210 d.p.r., respectivamente.
	Liposomas catiónicos (CAF 09); (DDA:MMG:pIC 2,5:0,5:0,5 mg/mL); tam: 213 nm, ZP: +60 mV (Thakur et al., 2018).	PTBC; antígenos: proteínas Map recombinantes.	Vacas; 2 dosis s.c. (días 0 y 31); sin desafío.
	NPs de PLGA (AL:AG 50:50 ratio molar, PM: 7-17 kDa); método de doble emulsión; tam: 500 nm, carga: neutra, EE: 20% NS3, 16,2% E2, 17% pIC (Riitho et al., 2017).	DVB; antígenos: proteínas NS3 y E2 recombinantes.	Vacas; 2 dosis s.c. (días 0 y 21); desafío: 41 d.p.v.
	NPs de quitosano; tam: 368 nm, ZP: +36 mV, EE: 85% pIC (Kavaliauskis et al., 2016).	SHV; antígenos: glicoproteína G recombinante o virus inactivado	Peces cebrá; 1 dosis i.p; desafío: 28 d.p.v.
TLR4; MPLA	Liposomas (HSPC:Chol) (Z. Li et al., 2019).	EQ; antígeno: proteína 14-3-3 de <i>E. granulosus</i> recombinante.	Ratones; 3 dosis s.c. una vez a la sem.; desafío: 28 d.p.v.

TLR5; Flagelina	SAPNs; tam: 15-20 nm (Karch et al., 2017).	VIA; antígenos: secuencias M2e y Hélice C de la cepa A/chicken/Pennsylvania/1/1983 H5N2.	Pollos; 3 dosis i.m. (sem. 0, 2 y 4). Ratones; 3 dosis i.m. (días 0, 14 y 28); desafío: 42 d.p.v.
	SAPNs; tam: 23 nm (J. Li et al., 2018).	BI; secuencia recombinante de AA correspondiente al extremo C-terminal de la proteína S del virus de la BI cepa M2118.	Pollos; 3 dosis i.m. (días 1, 11 y 21); desafío: a los 58 días de edad con cepa M41.
	NPs de PA; método de desplazamiento del solvente; agente de entrecruzamiento: 1,3-diaminopropano; tam: 215 nm, PDI: 0,2, ZP: -38 mV, EE: 78% OMPs, 25% flagelina (Renu et al., 2018).	Salmonelosis; antígenos: proteínas OMPs aisladas de SE fagotipo 13a.	Pollos; 3 dosis orales (sem. 0, 9 y 12); desafío: a las 15 semanas de edad por sonda oral.
	NPs de quitonaso; método de gelificación iónica con TPP; tam: 517 nm, EE: 70% OMPs, 40% flagelina (Renu et al., 2020).	Salmonelosis; antígenos: proteínas OMPs aisladas de SE fagotipo 13a.	Pollos; 3 dosis orales (días 0, 21 y 42); desafío: con una dosis de <i>Salmonella</i> altamente virulenta 1 d.p.v. por sonda oral.

TLR9-21; CpG- ODNs	NPs de quitosano; método de coacervación; tam: 93 nm, PDI: 0,78, ZP: +5 mV (T. Huang et al., 2018).	Infección por <i>Trueperella pyogenes</i> ; antígeno: plásmido de ADN con múltiples epitopes de <i>T. pyogenes</i> cepa TP8.	Ratones; dos dosis i.m. (días 0 y 21); desafío: 21 d.p.v.
	NPs de PLGA (AL:AG 50:50 ratio molar, PM 24–38 kDa) complejadas con PEI-CpG; método de emulsificación-evaporación; tam: 680 nm (S. M. Singh, Alkie, Abdelaziz, et al., 2016; S. M. Singh, Alkie, Nagy, et al., 2016).	VIA; antígeno: virus H9N2 inactivado con formalina.	Pollos; dos dosis i.m. (días 7 y 21 post-nacimiento) o tres dosis nebulizadas (días 7, 21 y 65 post-nacimiento); desafío: 15 d.p.v. por ruta oculo-nasal.
	NPs de PLGA (ídem anterior); tam: 680 nm (Taha-Abdelaziz et al., 2018).	Infección por <i>Campilobacter jejuni</i> ; sin antígeno.	Pollos; una dosis oral (día 13 de vida); desafío: oral 24 hs. post-tratamiento.
	NPs poliméricas (surfactante Gemini 12-3-12:PEG400:PVP10000:CpG 10:2,2:10:4,87:1 mg/mL); tam: 200 nm, ZP: +50 mV (Calderon-nieva, 2018).	Infección por <i>Escherichia coli</i> ; sin antígeno.	Pollos; una dosis nebulizada (en el día del nacimiento); desafío a los días 2, 3 y 4 post-tratamiento.
	Liposomas (surfactante Gemini:SPC:Chol) y SWCN (Gunawardana et al., 2015).	Infección por <i>E. coli</i> ; sin antígeno.	Pollos; 1 dosis <i>in ovo</i> al día de embrionado 18; desafío: s.c. al día 1 pots-nacimiento.

TLR9-21; CpG- ODNs	NPs de PLGA (AL:AG 50:50 ratio molar, PM 24–38 kDa) complejadas con CpG-PEI; método de doble emulsion-evaporación del solvente; tam: 670 nm, ZP: +5 mV a -2 mV, EE: 69% CpG (Bavananthasivam, Alkie, et al., 2018; Bavananthasivam, Read, et al., 2018).	MD; sin antígeno.	Pollos; 1 dosis <i>in ovo</i> al día de embrionado 18 y 1 dosis i.m. al día de nacimiento.
	MWCNT comerciales unido a CpG con linker PySE o complejados con CpG-PEI (Tompsonowski et al., 2019).	Salmonelosis; sin antígeno.	Pollos; 1 dosis s.c. al día 1 de vida; desafío: a las 25 sem. de vida.
	NPs de PA con copolímeros (CPTEG:CPH 20:80); método de emulsión doble (Dhakal et al., 2019).	VGP; antígeno: virus H1N2-OH10 inactivado con BEI.	Cerdos; 2 dosis intranasales (sem. 0 y 3); desafío: intranasal con virus heterólogos.
	NPs de gelatina (tipo A derivada de cerdo); método de desolvatación en dos pasos; agentes de entrecruzamiento: glutaraldehído y EDC; tam: 250 nm, PDI: 0,15, ZP: +20 mV ZP, EE: 98% CpG (J. Klier et al., 2015; John Klier et al., 2018, 2019).	RAO; sin antígeno.	Caballos; nebulización a pacientes sanos (3 dosis) y alérgicos (5 dosis) con intervalos de dos días.

TLR9-21; CpG- ODNs	NPs de gelatina (ídem Klier et al.) (I. Wagner et al., 2017).	Dermatitis atópica; sin antígeno.	Perros; 4 o 7 dosis s.c. (sem. 0, 2, 4 y 6 o 0, 2, 4, 6, 8, 12 y 16).
TLR4 + TLR9;	Liposomas catiónicos (DOTAP:Chol 1:1 ratio molar) (Contreras et al., 2019; Wheat, Chow, Coy, et al., 2019).	Herpesvirus (FHV-1); sin antígeno.	Gatos; 1 dosis mucosa (nasal + oral) 24 hs. antes de la inoculación con FHV- 1.
poli I:C + ADNp	Liposomas catiónicos (idénticos al anterior) (Wheat, Chow, Kuzmik, et al., 2019).	Herpesvirus; sin antígeno.	Perros; 1 dosis mucosa (nasal + oral) a pacientes sanos y con brote de herpesvirus.
TLR3 + TLR4; Poli I:C + LPS	Liposomas catiónicos (DOPA: DLPC:Chol:colesteril:Chol- PEG600 0,5:0,35:0,10:0,05 ratio molar); tam: 125 nm, carga superficial neutra (Ji et al., 2019; Ruyra et al., 2014).	VPC, infección por <i>Pseudomonas</i> <i>aeruginosa</i> y por <i>Aeromonas hydrophila</i> ; sin antígeno.	Peces cebrá; 1 dosis i.p. o por inmersión (2 d.p.f. por 48 hs.); desafío 5 d.p.f. con cepa de <i>P. aeruginosa</i> PA01 altamente virulenta y con el virus de la VPC.

Tabla 4: TLR-NPs analizados. Abreviaturas: AA: aminoácidos; ADNp: plásmido de ADN no codificante PCR2.1 comercial; AG: ácido glicólico; AL: ácido láctico; BEI: etilenimina binaria; BI: bronquitis infecciosa; CPTG: 1,8-bis(p-carboxifenoxi)-3,6-dioxaoctano; CPH: 1,6-bis(p-carboxifenoxi)hexano; DA: dermatitis atópica; DDA: dimetildeoctadecilamonio; DLPC: 1,2-dilauroil-sn-glicero-3-fosfolina; DOPA: 1,2-dioleoil-sn-glicero-3-fosfato; DOTAP: 1,2-dioleoil-3-trimetilamonio-propano; DPPC: 1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfolina; d.p.f: días post-fertilización; d.p.r.: días post-refuerzo; d.p.v.: días post-vacunación; DVB: diarrea viral bovina; EDC: 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida; EE: eficiencia de encapsulación; EQ: equinococosis quística; ERB: enfermedad respiratoria bovina; FA: fiebre aftosa; FHV-1: herpesvirus felino-1 HSPC: fosfatidilcolina de soja hidrogenada MD: enfermedad de Marek; MMA: monomelicil glicerol; MWCNT: nanotubos de carbono de paredes múltiple; OMPs: proteínas de la membrana externa; PA: polianhídrido; PDI: índice de polidispersidad; PEI: polietilenimina; pIC: poli I:C; PLGA: ácido poli(láctico-co-glicólico); PM: peso molecular; PTBC: paratuberculosis; PVP: polivinilpirrolidona; PySE: ácido 1-pirenbutanoico succinidil éster; RAO: obstrucción recurrente de las vías aéreas; SAPNs: nanopartículas de proteínas auto-ensamblantes; SE: Salmonella enterica serotipo Enteritidis; sem: semana(s); SHV: septicemia hemorrágica viral; SWCNT: nanotubos de carbono de paredes simple; tam: tamaño; VIA: virus de la influenza aviar; VGP: virus de la gripe porcina; VPC: viremia primaveral de la carpa; ZP: potencial ζ .

7.3.1 Animales de producción

7.3.1.1 Vacunos

La fiebre aftosa (FA), la enfermedad respiratoria bovina (ERB), la diarrea viral bovina (DVB), la paratuberculosis (PTBC) y la mastitis son enfermedades infecciosas relevantes que afectan al ganado vacuno y en las que se ha examinado el efecto de la vacunación y la inmunoterapia inespecífica con poli I:C y CpG-ODNs en NPs.

En 2015 se introdujo en el mercado veterinario el primer inmunoestimulador de ADN nanotecnológico comercial ZelNate® (Bayer HealthCare, MO, EE.UU.) para reducir el uso de antibióticos. Este producto consiste en liposomas catiónicos liofilizados (DOTIM/Chol) cargados con ADN plasmídico bacteriano rico en motivos CpG no metilados. ZelNate® está indicado como un auxiliar para el tratamiento de la ERB en ganado de 4 meses o más, cuando se administra en el momento de (o dentro de las 24 hs. después de) un evento estresante percibido (Nickell et al., 2016). La ERB es causada por diferentes agentes etiológicos y es una de las principales causas de morbilidad y pérdida de vidas para la industria ganadera en todo el mundo, a pesar de la vacunación, los medicamentos antimicrobianos y las estrategias ambientales y de gestión. Un evento estresante es reconocido como el primer daño que lleva un eventual compromiso del estado inmunológico pulmonar del animal. En tal situación, la bacteria comensal *Mannheimia haemolytica* del tracto respiratorio superior, invade e infecta el sistema respiratorio inferior induciendo lesiones pulmonares e inflamación, reducción sustancial del ritmo diario y posiblemente la muerte. Estudios de campo demostraron que ZelNate® administrado por vía i.v. era igualmente eficaz que el antibiótico tilmicosina aplicado s.c., y actualmente aprobado para el control de la enfermedad broncopulmonar en el ganado de engorde en condiciones de riesgo medio (Bayer HealthCare Animal Health, 2015). ZelNate® es un potente inductor de IFNs I a través de la vía cGAS-STING-IRF3, lo que da lugar a una acción anti-inflamatoria pulmonar, a la mitigación de las lesiones pulmonares y a la disminución de la mortalidad del ganado expuesto a *M. haemolytica* (Ilg, 2017).

En 2014 el rendimiento de poli I:C o CpG-ODNs asociados a VacciMax®, una plataforma de *delivery* de vacunación hecha de liposomas formulados en una

emulsión W/O desarrollada por ImmunoVaccine Technologies Inc. (aún no aprobada para uso veterinario o humano) contra la FA, fue informado por (Saravanan et al., 2015). La FA es causada por un aftovirus que genera fiebre alta, ampollas y cojeras, siendo endémica en muchos países del Oriente Medio, África, Asia y en partes de América del Sur. La respuesta humoral de anticuerpos desempeña un papel importante en la protección contra la FA y las vacunas actuales no protegen contra diferentes cepas del mismo serotipo a menos que se utilicen vacunas de alta potencia (Brehm et al., 2008). Las formulaciones de VacciMax® consisten en liposomas que contienen poli I:C o CpG-ODNs con antígenos inactivados del virus de la FA preparados por homogeneización. Se pueden preparar diferentes formulaciones Vaccimax® mezclando igual volumen de liposomas y distintas fases oleosas como FIA (Daftarian et al., 2006), Montanide™ ISA 51 (Mansour, Pohajdak, et al., 2007) o el aceite mineral oleato de manida (8,5:1,5 vol/vol) (Mansour, Brown, et al., 2007). El trabajo de referencia (Saravanan et al., 2015) no especifica la naturaleza de la emulsión oleosa. Las formulaciones desarrolladas, administradas, ya sea i.m. o s.c., a terneros, indujeron una inmunidad protectora contra la FA, pero poli I:C-Vaccimax® i.m. fue superior a la vacuna de CpG-ODNs en cuanto a los títulos de anticuerpos generados e indujo una inmunidad protectora más prolongada. La primera dosis indujo una respuesta lenta pero después de la aplicación de un refuerzo se generó una respuesta más rápida y 100% protectora en comparación con la vacuna comercial. Por lo que sabemos, no se han publicado más estudios en esta área.

Más recientemente, en 2018, se utilizó un adyuvante liposomal catiónico con poli I:C adsorbido en su superficie (CAF09) para vacunar a ganado vacuno sano en combinación con proteínas de *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (Map) (Thakur et al., 2018). Map causa una infección crónica del tracto intestinal en bovinos y otros rumiantes y se distribuye en América del Sur y Central. La vacunación no se utiliza ampliamente en el control de la PTBC en el ganado, debido principalmente al riesgo de interferencia con las pruebas i.d. para la tuberculosis bovina. Se cree que los LT CD4+ son críticamente necesarios para la defensa del hospedador contra los patógenos micobacterianos intracelulares tanto en el hombre

como en los animales. Los CAF son una serie de formulaciones catiónicas con capacidad de adyuvancia basadas en liposomas hechos con el surfactante catiónico dimetildioctadecilamonio (DDA), que crea un depósito duradero en el lugar de la inyección y aumenta la captación celular de antígenos, en combinación con diferentes inmunoestimuladores. El CAF01, de primera generación, comprende al DDA y al inmunomodulador micobacteriano sintético TDB (dibehenato de trehalosa) (Davidsen et al., 2005). El TDB estabiliza los liposomas DDA y es un agonista del receptor de superficie Mincle que activa CPA a través de la vía Syk-CARD9 independiente de TLR (Desel et al., 2013). El CAF09 es una segunda generación de CAF que incluye poli I:C adsorbido electrostáticamente en la superficie liposomal. Además, en el CAF09, el TDB es reemplazado por monomicolilglicerol (MMG)-1. Al igual que el TDB, el MMG-1 es un análogo sintético de un lípido de pared celular micobacteriano que envía señales a través del receptor Mincle, sin embargo, el MMG-1 es un estimulador de CDs mucho mejor que el TDB, y es más fácil de fabricar (Korsholm et al., 2014). Proteínas recombinantes de Map mezcladas con CAF01, CAF09 o Montanide™ ISA 61 VG (une emulsión W/O [aceite mineral]), se utilizaron para la inmunización s.c. de terneros Jersey masculinos. La respuesta inmune celular y humoral de los animales vacunados con CAF09 resultó mayor que con CAF01. En comparación con Montanide™ ISA 61 VG, una inmunización repetida con CAF09 mantuvo una mayor frecuencia de células T CD4+ inductoras de IFN- γ , TNF- α e IL-2 (Thakur et al., 2018). Sin embargo, se necesitan más estudios para evaluar la respuesta protectora contra un desafío. Dado que el CAF09 induce una mejor respuesta de células T CD8+ en inmunizaciones i.p. o nasales que por vía s.c. e i.m. en ratones (Korsholm et al., 2014), se debería probar la administración por vías mucosas en el ganado.

CpG-ODNs mezclados con liposomas catiónicos y dos antígenos recombinantes de *Staphylococcus aureus* fueron probados recientemente contra la mastitis bovina, buscando la prevención de infecciones intramamarias antes del comienzo de la lactancia (Reidel et al., 2019). La mastitis bovina causada por *S. aureus* es una infección inflamatoria de la glándula mamaria potencialmente mortal que causa las mayores pérdidas económicas a los productores de leche y a la industria en todo el

mundo (Petrovski et al., 2006). Sólo unas pocas vacunas basadas en lisados u organismos inactivados están disponibles comercialmente y han demostrado una eficacia limitada para prevenir las infecciones intramamarias (Middleton et al., 2009; Schukken et al., 2014). En este trabajo, a pesar de inducir una respuesta inmunológica humoral similar a la del adyuvante tradicional $\text{Al}(\text{OH})_3$, los CpG-ODNs mezclados con liposomas catiónicos y no con $\text{Al}(\text{OH})_3$, produjeron IgG2 específicas para ambas proteínas recombinantes de *S. aureus* (Reidel et al., 2019). Los liposomas catiónicos también estimularon niveles más altos de anticuerpos en la leche, 30 y 45 días después de la inmunización de refuerzo, previa al parto. Los resultados sugieren que un solo refuerzo, 21 días antes del parto, sería suficiente para aumentar rápidamente los niveles IgG específicas en el suero en un período de alta susceptibilidad a las infecciones intramamarias.

Recientemente, poli I:C y dos antígenos del virus de la DVB encapsulados en NPs de ácido poli(láctico-co-glicólico) (pIC-PLGA) fueron probados en bovinos (Riitho et al., 2017). La DVB causada por un pestivirus es la enfermedad infecciosa más prevalente en el ganado. La DVB es endémica en todo el mundo y tiene un profundo impacto en la industria ganadera como resultado de las pérdidas de producción y reproducción. La DVB presenta diferentes resultados clínicos, incluyendo efectos reproductivos e inmunosupresores. Con el objetivo de inducir una respuesta tanto de células B como de células T, las NPs de pIC-PLGA desarrolladas en este trabajo contenían dos antígenos dispuestos espacialmente: la glicoproteína E2 de la envoltura estructural adsorbida en la superficie de las NPs y la proteína NS3 encapsulada en el núcleo de las NPs. Las NPs de pIC-PLGA indujeron una protección comparable a la de las vacunas comerciales. Para controlar la DVB se utilizan vacunas vivas atenuadas e inactivadas. Sin embargo, además de las preocupaciones de seguridad de las primeras, los potentes adyuvantes de las segundas pueden ser problemáticos, como ocurrió con PregSure® BVD (Pfizer, Karlsruhe, Alemania), vacuna que contiene como adyuvantes Quil A, colesterol, Amphigen Base y parafina líquida (ProCision-A™). El fuerte adyuvante fue

sospechado de desempeñar un papel en la inducción de aloanticuerpos²⁹ transmitidos a través del calostro a los terneros y se retiró del mercado en 2010 (Deutskens et al., 2011).

CpG-ODNs y una construcción de ADN que incluye las secuencias de ácido nucleico de varios factores de virulencia de *Trueperella pyogenes* incorporados en NPs de quitosano, fueron probados recientemente en ratones infectados con *T. pyogenes* (T. Huang et al., 2018). *T. pyogenes* es un patógeno oportunista que puede causar mastitis, abscesos hepáticos y neumonía. No existe una vacuna y, aunque se dispone de una terapia antibiótica, los aislados resistentes a los medicamentos suponen un gran reto para la práctica veterinaria y una posible amenaza para la salud humana. Se necesita una respuesta inmunológica de tipo Th1 para contener una infección por *T. pyogenes*. En este caso, las NPs de quitosano aumentaron notablemente la síntesis y liberación de IFN- γ , IL-2 e IL-4 respecto al ADN no encapsulado e indujeron fuertes respuestas inmunológicas humorales y celulares que protegieron a los ratones contra un desafío contra una infección altamente virulenta con *T. pyogenes* TP7. Aun así, se necesitan más estudios en ganado para dar conclusiones pertinentes.

7.3.1.2 Aves de corral

La influenza aviar (IA), la bronquitis infecciosa (BI), la enfermedad de Marek (MD), la campilobacteriosis, la salmonelosis e infecciones de *Escherichia coli* son enfermedades de los pollos contra las que se han utilizado CpG-ODNs encapsulados o flagelina asociada a NPs y se ha comprobado que inducen una inmunización protectora.

Presentando la misma nanoestructura que ZelNate®, Victrio® (Bayer HealthCare Animal Health, s. f.) fue lanzado recientemente para su administración *in ovo* con el fin de reducir la mortalidad causada por *E. coli* en los huevos embrionados y los

²⁹ Un aloanticuerpo es aquel que puede detectar un aloantígeno (antígeno procedente de un individuo de la misma especie, pero genéticamente distinto, que provoca, al inyectarlo, una respuesta inmune).

polluelos recién nacidos. La transmisión de *E. coli* por los huevos es común y puede provocar onfalitis, colibacilosis, colisepticemia o incluso la muerte en los pollos. La mortalidad puede oscilar entre el 5 y el 20%, y las infecciones más graves se producen en pollos jóvenes. Las vacunas actuales no son eficaces y la reducción del alto uso de antibióticos es una prioridad en las infecciones por *E. coli*. Las inmunoterapias *in ovo* proporcionan una buena salud durante la primera semana de crecimiento de pollos de engorde, proporcionando un mejor rendimiento y rentabilidad. Actualmente en la industria de pollos de engorde, las aves pueden alcanzar un peso corporal de 2 kg a los 30-35 días después del nacimiento. Por lo tanto, la vacunación o la inmunoestimulación *in ovo* puede proporcionar una alternativa de protección efectiva a los antibióticos. Victrio® administrado *in ovo* (en huevos embrionados de 18 días) un día antes del desafío con *E. coli* (huevos embrionados de 19 días), ha mostrado una mortalidad significativamente menor (6,6%) que el grupo no tratado (17,2%) y que el grupo tratado con el antibiótico comercial sulfato de gentamicina (8%) (Ilg, 2020).

Al mismo tiempo, se determinaron los efectos de seguridad e inmunoestimulación de CpG-ODNs formulados con nanotubos de carbono de pared simple (CpG-SWCNT) o liposomas que contienen surfactante Gemini (CpG-G) en pollos de engorde neonatales contra septicemia por *E. coli* (Gunawardana et al., 2015). Los surfactantes Gemini contienen dos colas hidrófobas (12 C) y dos grupos de amonio cuaternario como grupos de cabeza polar unidos por un grupo espaciador (3 C), y pueden autoensamblarse en una gama de estructuras que incluyen micelas comunes, micelas invertidas o bicapas, dependiendo de las modificaciones moleculares (Yang et al., 2010). Las aves que recibieron ambas formulaciones de CpG-ODNs mostraron una tasa de supervivencia significativamente mayor (60%-80%) en comparación con el control salino (20-30%). Las cargas bacterianas y las puntuaciones clínicas fueron significativamente más bajas en los grupos tratados con CpG-SWCNT o CpG-G en comparación con los grupos que recibieron CpG-ODNs libres. Además, no hubo evidencia de ningún efecto adverso de estas formulaciones en ningún órgano o en las tasas de crecimiento de las aves hasta los 42 días de edad.

Más recientemente, se determinaron los efectos inmunoestimuladores de CpG-ODNs formulados en NPs preparadas con el polímero bioadhesivo polivinilpirrolidona y recubiertas con lípido Gemini (CpG-PVP-G), nebulizadas (con nebulizador de compresor) en pollos neonatales (Calderon-nieva, 2018). La nebulización es un método de inmunización eficaz, en función de los costos, en aves de corral, debido al fácil acceso, la alta vascularidad y la permeabilidad de la mucosa pulmonar. En comparación con la vacunación parenteral, la inmunización sin agujas es más segura debido a la disminución del riesgo de contaminación por agujas infectadas y a la posible irritación por la inyección (Lycke, 2012). La presencia del BALT (tejido linfático asociado a los bronquios) en las uniones de los bronquios primarios y secundarios caudales en el pulmón de las aves puede ayudar a la estimulación inmunológica y al reclutamiento de linfocitos. Las partículas de menos de 3 μm , evitan el transporte mucociliar y llegan a sitios profundos del pulmón (Corbanie et al., 2006). NPs de CpG-PVP-G fueron capaces de llegar al sistema respiratorio de los pollos (depositándose en la tráquea, la bifurcación traqueal, y que parecería difundirse a través del tejido pulmonar conectivo), e iniciar una respuesta inmune en el lugar de la infección. NPs de CpG-PVP-G mejoraron la protección contra *E. coli* cuando se realizó un desafío en el día 2 o 3 después de la inmunización, con una toxicidad mínima con respecto a los CpG-ODNs libres, pero mostraron una protección baja (similar a CpG-ODNs) en el día 4.

El efecto de NPs de PLGA con CpG incorporado (CpG-PLGA) más el virus de la IA H9N2 inactivado se determinó al administrarlas i.m. o al nebulizarlas en pollos (S. M. Singh, Alkie, Abdelaziz, et al., 2016; S. M. Singh, Alkie, Nagy, et al., 2016). El virus de la IA (VIA) es un patógeno de las mucosas asociado con grandes pérdidas económicas en aves de corral (Pasick et al., 2009) e implicaciones para la salud pública de los seres humanos (Katz et al., 2009). Existen cepas de VIA de baja y alta patogenicidad. Las primeras, aunque no son tan agresivas como las segundas, se distribuyen por todo el mundo. Los VIA (Influenzavirus A de la familia Orthomyxoviridae) causan síntomas que pueden ir desde enfermedades respiratorias simples a sistémicas (insuficiencia multiorgánica), con un alto porcentaje de morbilidad y mortalidad. Las vacunas comerciales existentes,

predominantemente de virus inactivados son formuladas como emulsiones W/O, requieren administración parenteral y son poco capaces de inducir anticuerpos locales de mucosas (Swayne & Kapczynski, 2008). Este es el único trabajo en el que encontramos que se informa sobre la importancia de asegurar la estabilidad y la biodistribución de las NPs al momento de la nebulización. Las NPs de CpG-PLGA más el VIA libre administradas i.m. redujeron la diseminación del virus induciendo mayores títulos de anticuerpos sistémicos y de mucosas, así como de anticuerpos de inhibición de la hemaglutinación³⁰, que las NPs de CpG-PLGA más el VIA encapsulado (S. M. Singh, Alkie, Nagy, et al., 2016). Por otra parte, las NPs de CpG-PLGA nebulizadas (con nebulizador tipo jet) más el VIA libre indujeron respuestas en la mucosa más elevadas que los CpG-ODNs libres y las NPs de CpG-PLGA administradas i.m. (S. M. Singh, Alkie, Abdelaziz, et al., 2016). Aun así, se necesitan más estudios sobre pollos desafiados con el virus para determinar la utilidad de este enfoque.

NPs de proteínas autoensamblables (*Self assembling protein nanoparticles*, SAPNs) ligadas a la flagelina de *Salmonella enterica* serovariedad Typhimurium (F-SAPNs) fueron probadas contra el VIA (Karch et al., 2017). Las SAPNs son NPs hechas de monómeros de proteínas que se autoensamblan. Cada monómero de SAPN contiene dos dominios de oligomerización unidos por un *linker*. Tanto en el dominio N terminal como en el C terminal del monómero, los antígenos pueden ser enlazados conservando su conformación nativa (Raman et al., 2006). Aquí, F-SAPNs (24 monómeros autoensamblados en simetría octaédrica) fueron vinculadas a dos antígenos del VIA conservados, M2e y Hélice C (M2e/HC-F-SAPNs). En estos ensayos, por un lado, pollos inmunizados i.m. con M2e/HC-F-SAPNs mostraron títulos significativamente más altos de anticuerpos neutralizantes en comparación

³⁰ En presencia de virus que poseen en su superficie las proteínas hemaglutininas (como los influenzavirus), los eritrocitos se “aglutinan”, impidiéndoles depositarse por gravedad en el fondo, si es que se encuentran en suspensión en un líquido. Haciendo uso de este fenómeno se ha desarrollado una técnica de diagnóstico barata y rápida, aunque no muy precisa, para constatar la presencia de virus en sangre. Combinando esta prueba con un test que utiliza anticuerpos específicos para un determinado virus, se obtiene la prueba de la inhibición de la hemaglutinación, que permite determinar el título de anticuerpos de un suero frente al virus concreto (Universidad Complutense de Madrid, s. f.).

con los vacunados con SAPNs que carecían de flagelina, y un mayor grado de actividad de neutralización cruzada en comparación con una vacuna comercial de virus inactivado. Por otro, la vacunación con M2e/HC-F-SAPNs protegió completamente a ratones contra un desafío letal en la misma medida que aquellos ratones que fueron inmunizados con una vacuna humana comercial. Sin embargo, no se midió la inducción de la inmunidad de la mucosa, y se necesitarían más estudios con desafíos sobre pollos para llegar a conclusiones comercialmente relevantes.

F-SAPNs también se probaron vinculadas a una proteína recombinante del virus de la BI en su conformación trimérica nativa (VBI-F-SAPNs) (J. Li et al., 2018). La BI causada por coronavirus es una enfermedad aviar altamente contagiosa que causa importantes pérdidas económicas a la industria avícola. Las pérdidas comerciales se deben principalmente a la disminución del aumento de peso y la producción de huevos y la mala calidad de los mismos. Tanto las vacunas de virus vivos atenuados como las de virus inactivados se utilizan para proteger a los pollos contra la BI, pero ambas presentan limitaciones de seguridad y protección débil, respectivamente. Es evidente que se necesitan nuevas vacunas para responder con seguridad y rapidez a los brotes de nuevas cepas de estos virus. VBI-F-SAPNs inyectadas i.m. mostraron una alta respuesta de anticuerpos sistémicos, una reducción significativa de la excreción del virus en la tráquea y menores puntuaciones de lesiones traqueales que los animales inmunizados con buffer o F-SAPNs solas.

Además, se ha observado que NPs mucoadhesivas con flagelina adsorbida en su superficie, y con proteínas inmunogénicas de la membrana externa de *Salmonella* (OMPs) encapsuladas (F-OMP) inducen protección inmune al ser administradas oralmente en pollos (Renu et al., 2018, 2020). La *Salmonella enterica* serovariedad Enteritidis (SE) es el agente infeccioso más común de la salmonelosis animal y humana (Santos et al., 2011). Los serotipos de *S. enterica* resistentes a los antibióticos de importancia clínica causan por lo menos 100000 infecciones humanas transmitidas por alimentos al año (V T Nair et al., 2018). La SE reduce la producción de huevos en los pollos y es responsable de grandes pérdidas

económicas de la industria avícola (S. K. Lee et al., 2013). Es importante señalar que la carne de ave infectada por SE y los huevos contaminados son las principales fuentes de salmonelosis humana (Humphrey & Jørgensen, 2006). Las vacunas sólo disminuyen marginalmente, en lugar de eliminar, la colonización y la diseminación de *Salmonella* en el intestino de los pollos (Barrow, 2007). Además, las vacunas comerciales de *Salmonella* inactivadas deben ser inyectadas parenteralmente en cada ave, lo que dificulta la labor de los granjeros y es muy estresante para los animales. Como alternativa, una vacuna oral contra *Salmonella*, que induzca una robusta respuesta inmune IgA en las mucosas y mediada por células, debería ser un enfoque de control efectivo para la salmonelosis en aves de corral. En un primer trabajo se demostró que pollos inmunizados por vía oral con NPs de polianhídrido con F-OMPs (F-OMP-PA) mostraron una mayor respuesta de IgG OMP-específica y secreción de IFN- γ en el suero, una mayor proporción de células CD8+/CD4+ en el bazo y una mayor proliferación de linfocitos OMP-específicos, que el grupo que recibió antígenos solubles. Además, las NPs de F-OMP-PA estuvieron mejor dirigidas a las células inmunes en la sangre periférica, en los esplenocitos y en las placas de Peyer intestinales de los pollos, que las NPs no recubiertas con flagelina. Es importante señalar que la vacuna eliminó la colonización cecal de *Salmonella* en el 33% de los pollos desafiados (Renu et al., 2018). En otro trabajo, se inmunizó a pollos por vía oral con NPs de quitosano catiónico electrostático complejoado con OMPs con carga negativa y flagelina (F-OMP-Chi). NPs de F-OMP-Chi se adhirieron a la mucosa, entraron en la lámina propia y en las placas de Peyer del íleon y mostraron una producción de IgA específica en la mucosa y una respuesta de proliferación de linfocitos significativamente más alta que la de los grupos vacunados con una mezcla de OMPs+flagelina y antígenos solubles. La vacunación también aumentó la expresión de los receptores TLR2, TLR4, de IFN- γ , TGF- β y la expresión de ARNm de IL-4 en las amígdalas cecales de los pollos (Renu et al., 2020). A pesar de estos resultados promisorios, es necesario realizar más estudios que supongan un desafío.

Recientemente también se informó que bajas dosis de CpG-ODNs adsorbidos en nanotubos de carbono de paredes múltiples (MWCNT) mediante el enlazador PySE

(CpG-MWCNT) protegieron a pollos contra un desafío de *S. enterica* Typhimurium (Tompson et al., 2019). Estudios *in vitro* utilizando células de pollos establecieron que los CpG-MWCNT fueron entregados intracelularmente de mejor manera que los CpG-ODNs libres y fueron igualmente efectivos en el cebado de células en una concentración 1000 veces menor que los CpG-ODNs libres. Una dosis significativamente menor de CpG-MWCNT administrada s.c. fue capaz de atraer a las células inmunitarias y proporcionar una respuesta inmune protectora contra una infección bacteriana letal, lo que no se observó con la misma dosis de CpG-ODNs libres (Tompson et al., 2019).

En otro trabajo, NPs de CpG-PLGA fueron administradas por vía oral a pollos para combatir la campilobacteriosis (Taha-Abdelaziz et al., 2018). *Campylobacter jejuni* es una de las principales causas de las enfermedades bacterianas transmitidas por los alimentos en los seres humanos. Dado que los pollos no suelen estar clínicamente afectados por la colonización, para reducir el riesgo de campilobacteriosis humana es esencial reducir la carga de *C. jejuni* en los productos avícolas mediante la reducción de la carga intestinal de la bacteria en las bandadas de aves de corral. Una vez más, las vacunas existentes contra *Campylobacter* muestran una eficacia protectora limitada, y se necesitan estrategias de vacunación más eficaces (Neal-McKinney et al., 2014). En este caso, las NPs de CpG-PLGA co-administradas con un lisado de *C. jejuni* redujeron sinérgicamente los recuentos de *Campylobacter* mejor que las NPs de CpG-PLGA o el lisado de *C. jejuni* solos en gallinas ponedoras y pollos de engorde.

LPS o CpG-ODNs encapsulados en NPs de PLGA (LPS- o CpG-PLGA) fueron recientemente administrados *in ovo* como inmunoestimuladores. Tanto los inmunoestimuladores libres o encapsulados en NPs de PLGA indujeron respuestas inmunes innatas similares en embriones de pollos (incluyendo IFN- γ , IFN α , IL-1 β e IL-10 en bazo, pulmones y bolsa de Fabricio) que las reportadas en pollos maduros, pero con una expresión tisular de los genes de citoquinas diferente para las NPs de LPS- o CpG-PLGA, sin afectar la viabilidad de los embriones (Bavananthasivam et al., 2019). En un trabajo posterior se mostraron los efectos protectores de las NPs

de LPS- o CpG-PLGA administrados *in ovo* y post-eclosión en pollos contra el virus de la MD (VMD), una de las infecciones aviares más omnipresentes (Bavananthasivam, Alkie, et al., 2018). El VMD infecta a los pollos por la vía respiratoria y causa la MD, caracterizada por producir linfoma de células T e inmunosupresión. La mitad de los países del mundo han reportado casos de MD. Las vacunas actuales previenen la enfermedad, pero no la transmisión o la infección, lo que lleva a la aparición de cepas cada vez más virulentas. En este caso, el porcentaje de reducción de la incidencia tumoral en el grupo tratado con NPs de CpG-PLGA (60%), asociado al aumento de la regulación de IL-18 e IL-1 β , fue notablemente mayor que el de los grupos de control y tratados con NPs de LPS-PLGA (42%).

7.3.1.3 Cerdos

En un trabajo reciente ha quedado demostrado que CpG-ODNs co-encapsulados con antígenos virales solubles del virus de la gripe H1N2-OH10 en NPs de polianhídrido (CpG-H1N12-PA) inducen una respuesta inmunitaria protectora contra la gripe porcina después de una inmunización intranasal (Dhakal et al., 2019). Los cerdos son considerados como el "recipiente mezclador" para la generación de nuevos reordenamientos del virus de la gripe A con potencial zoonótico y pandémico. El virus de la gripe A porcina (VGP) es una amenaza constante en la industria porcina mundial y uno de los patógenos respiratorios más prevalentes del mundo porcino. El VGP causa la aparición repentina de una neumonía broncointersticial altamente contagiosa y genera una carga económica considerable para los productores. Las vacunas intramusculares monovalentes o multivalentes de virus inactivados enteros que se utilizan predominantemente, no protegen contra los virus heterólogos de la gripe no relacionados, e inducen respuestas ineficaces de inmunidad mediada por células y de anticuerpos de la mucosa (Van Reeth & Ma, 2012; Vincent et al., 2017). Es más, ocasionalmente se observa también una intensificación de la enfermedad respiratoria asociada a las vacunas (que se conoce como VAERD) y una interferencia de anticuerpos maternos en los lechones tras la administración de vacunas inactivadas (Kitikoon et al., 2006; Vincent et al., 2008).

Los adyuvantes que contienen aceites minerales, como EMULSIGEN®-D y Amphigen Base, han sido asociados con el desarrollo de VAERD y de aparición de pancitopenia neonatal (disminución de las plaquetas y de los glóbulos rojos y blancos). Por lo tanto, existe la necesidad de producir vacunas que induzcan eficientes respuestas inmunes celulares y de mucosa, que anulen los anticuerpos maternos, que protejan a los cerdos contra el amplio espectro de VGP y que no resulten en VAERD. En comparación con la administración oral, la vía nasal ofrece una mayor superficie para el depósito de antígenos, con menores posibilidades de degradación enzimática y química. La vacunación por vía nasal presenta antígenos a las células inmunes de manera similar a la infección natural, constituyéndose como una excelente ruta para inducir anticuerpos IgA de mucosa local como primera línea de defensa. La mucosa nasal altamente vascularizada contiene un gran número de células M, que pueden aumentar la captación de antígenos y provocar respuestas inmunes humorales y celulares en la mucosa. Los resultados del trabajo de Dhakal y colaboradores demostraron que, en comparación con los antígenos solos (que contienen cantidades cinco veces mayores que las NPs), las NPs de CpG-H1N2-OH10-PA indujeron mayores anticuerpos IgA de mucosa, mejoraron la respuesta inmune celular y generaron una mejor respuesta linfoproliferativa y una mayor secreción de IFN- γ después de la inducción con antígenos en células mononucleares de sangre periférica. Más aun, las NPs proporcionaron una mejor eficacia protectora mediante una reducción significativa de la fiebre inducida por la gripe, una disminución de 16 veces de la excreción de virus nasales y una reducción de 80 veces de los títulos de virus pulmonares, en comparación con los cerdos inmunizados con el antígeno soluble, al ser desafiados con un virus heterólogo.

7.3.1.4 Peces

La septicemia hemorrágica viral (SHV), la viremia primaveral de la carpa (VPC) e infecciones bacterianas con *Pseudomonas aeruginosa* y *Aeromonas hydrophila* son enfermedades infecciosas relevantes en las que se ha encontrado que poli I:C y LPS cargados en NPs inducen una inmunización protectora.

NPs de quitosano cargadas con poli I:C (pIC-Chi) y mezcladas con antígenos del virus de la SHV indujeron una respuesta protectora ante una infección modelo en peces cebra (Kavaliauskis et al., 2016). La SHV es una infección sistémica de varios salmónidos y una lista creciente de peces marinos y de agua dulce. La SHV causa letargo, oscurecimiento de la piel, exoftalmia, anemia, hemorragias, natación anormal y un rápido comienzo de la mortalidad y todavía no se dispone de una vacuna comercial o un tratamiento antiviral. En el trabajo, NPs de pIC-Chi inyectadas i.p. en peces cebra, en su mayor parte permanecieron en el lugar de la inyección hasta 7 días; se calculó que su estructura se degradó a un ritmo de ~50% por semana y se observó que fueron internalizadas por monocitos y macrófagos de los animales. En un modelo de infección con el virus de la SHV en los mismos peces, las NPs de pIC-Chi, tanto mezcladas con un antígeno recombinante (la glicoproteína G del virus) o con el virus entero inactivado, fueron protectoras. Estos resultados son prometedores, pero requieren de más pruebas de campo en las especies relevantes.

Ruyra y colaboradores obtuvieron resultados interesantes, luego de co-encapsular LPS y poli I:C en liposomas catiónicos (LPS-pIC-Lipo). Los autores demostraron que estos liposomas pueden inducir una inmunoestimulación inespecífica y proteger a peces cebra contra infecciones de *P. aeruginosa* PA01, *A. hydrophila*, y del virus de la VPC, que de otro modo serían letales, independientemente de si se administran por inyección o por inmersión (Ruyra et al., 2014). *P. aeruginosa* y *A. hydrophila* son enfermedades para las que la aplicación de nuevas o mejoradas vacunas reducirían significativamente la necesidad de antibióticos. Tras una inyección i.p., los LPS-pIC-LIPO se acumularon en tejidos inmunes y en células inmunológicamente relevantes, como macrófagos de la trucha arco iris adulta (Ruyra et al., 2014). La mayoría de las vacunas comerciales son formulaciones de células enteras de patógenos muertos, para ser administradas por vía i.p. La falta de adyuvantes eficaces y de conocimientos básicos sobre la respuesta inmunológica de los peces, ha obstaculizado el desarrollo de vacunas de mucosa. En consecuencia, se utilizan vías de administración no óptimas, como la i.p., o, debido a lo costoso de las inyecciones en los peces, en muchos casos suelen

preferirse los antibióticos en lugar de otras medidas preventivas (Adams, 2019). Los peces tienen grandes superficies mucosas (piel, branquias, intestinos y mucosas nasales); por lo tanto, la vacunación por la vía mucosa (por inmersión y por vía oral) resultaría así más práctica y asequible que la inyección. En línea con esto, quedó demostrado que los LPS-pIC-Lipo administrados por inmersión en baño a larvas de peces cebras se acumularon en el intestino y aumentaron significativamente la expresión de genes relacionados con la inmunidad innata (TNF- α , IL-1 β , nos2a, irf1a y ptgs2a), que protegieron a las larvas contra una infección letal por *A. hydrophila* (Ji et al., 2019). Por el contrario, ni los liposomas vacíos ni el LPS o el poli I:C por sí solos protegieron a las larvas contra desafíos letales. Una vez más, estos resultados prometedores requieren otras pruebas de campo en las especies pertinentes.

7.3.2 Mascotas

7.3.2.1 Caballos

El asma equina (AE) es una enfermedad relevante para la cual CpG-ODNs unidos a la superficie de NPs de gelatina mostraron beneficios como inmunoterapia no específica.

El AE comprende a todas las enfermedades inflamatorias crónicas de las vías respiratorias inferiores de los caballos, incluida la enfermedad inflamatoria de las vías respiratorias (IAD), la obstrucción recurrente de las vías respiratorias (RAO) y la enfermedad obstructiva de las vías respiratorias asociada a los pastos de verano, causada por desencadenantes alérgicos como las sustancias orgánicas e inorgánicas del polvo de heno y la paja. Hasta el 80% de los caballos en diferentes poblaciones pueden sufrir de AE de leve a moderada, mientras que entre el 11 y el 17% pueden adquirir asma severa (Ivester et al., 2018). El AE puede tener un impacto significativo en el rendimiento y la calidad de vida de los caballos. Con el tiempo, los caballos severamente asmáticos pueden desarrollar cambios en el pulmón, lo que les dificulta la respiración, incluso en reposo. La evitación de alérgenos constituye actualmente la medida terapéutica más importante, además

de la terapia sintomática con glucocorticoides y broncodilatadores. Dado que la evitación absoluta de los alérgenos es difícil (por no decir imposible) y que el tratamiento con medicamentos a largo plazo con corticoides puede generar efectos adversos, existe una gran necesidad de nuevos conceptos terapéuticos. En este sentido, los tratamientos por inhalación están llegando al mercado, como demuestra la aprobación en 2020 del primer tratamiento por inhalación basado en la pro-droga corticoesteroide ciclesonida para el AE grave de Boehringer Ingelheim para reducir la inflamación de las vías respiratorias inferiores (Boehringer Ingelheim International GmbH, 2020).

Un grupo de investigadores ha realizado varios estudios utilizando CpG-ODNs unidos electrostáticamente a la superficie de NPs de gelatina catiónica (CpG-Gel). En primer término, demostraron que estas NPs pueden inducir una expresión reguladora de la citoquina anti-inflamatoria y anti-alérgica IL-10 y reducir significativamente los síntomas clínicos de la RAO al ser inhaladas por caballos (nebulizador de malla vibratoria) (J. Klier et al., 2012). Luego verificaron que las NPs de CpG-Gel nebulizadas disminuyeron el esfuerzo respiratorio, la secreción nasal, la secreción traqueal, la viscosidad del moco y la infiltración de neutrófilos y aumentaron la presión arterial de oxígeno en los caballos, hasta 4 semanas después del tratamiento (J. Klier et al., 2015). Finalmente, probaron que caballos afectados por AE que recibieron NPs de CpG-Gel nebulizadas, solas o combinadas con alérgenos relevantes, experimentaron una mejora clínica de la secreción nasal, la frecuencia respiratoria, la cantidad de secreción de moco y la viscosidad, el porcentaje de neutrófilos y la presión parcial de oxígeno, directamente después e incluso hasta 6 semanas después del tratamiento (John Klier et al., 2018).

7.3.2.2 Gatos

El herpesvirus felino 1 (FHV-1) es una importante enfermedad respiratoria en la que poli I:C complejo con liposomas catiónicos mostró beneficios como inmunoterapia inespecífica.

El FHV-1 es una causa común de infecciones oculares y de las vías respiratorias superiores en los gatos, que puede ser una causa importante de morbilidad y a

veces de mortalidad, especialmente en los gatitos jóvenes (Gould, 2011). La vacunación actual proporciona una inmunidad incompleta (Summers et al., 2017). Los signos clínicos de la infección por el FHV-1 pueden reactivarse ante una re-exposición, tras la inducción de estrés o tras la administración de fármacos inmunosupresores.

Poli I:C y ADN plasmídico no codificante complejados a liposomas catiónicos (complejos de receptores de TLR liposomales, LTC) mezclados con carboximetilcelulosa (para aumentar la adhesión a la mucosa), generaron respuestas inmunológicas locales en la mucosa del tracto respiratorio superior de los gatos tratados (Wheat, Chow, Coy, et al., 2019). Las células inmunitarias y epiteliales de las vías respiratorias superiores captaron a los LTC administrados en la mucosa de los gatos sanos (0,2 ml por vía intranasal en cada fosa nasal y 0,6 ml por vía oral) y reclutaron y activaron los leucocitos felinos, lo que aumentó la expresión de moléculas costimuladoras (OX40 y MHC II). Además, los LTC indujeron citoquinas asociadas a respuestas inmunitarias innatas, como INF- α , INF- γ , TNF- α , e IL-12. El tratamiento con LTC redujo significativamente la conjuntivitis y disminuyó la diseminación del ADN del FHV-1 por parte de los gatos en algunos días posteriores a la inoculación. Sin embargo, a pesar de que las puntuaciones clínicas fueron coherentes con un efecto positivo del tratamiento con LTC, la importancia estadística se perdió después de ajustar las observaciones repetidas a lo largo del tiempo (Contreras et al., 2019).

7.3.2.3 Perros

La dermatitis atópica (DA) y las generadas por el herpesvirus canino y el *Echinococcus granulosus* son enfermedades para las que se probaron CpG-ODNs unidos o poli I:C y MPLA encapsuladas en NPs.

Un artículo del 2017 describe la utilización de CpG-ODNs unidos a NPs de gelatina (CpG-Gel) para tratar perros con DA (I. Wagner et al., 2017). La DA canina es una enfermedad cutánea inflamatoria alérgica congénita asociada a signos clínicos distintivos, tratada sólo con inmunoterapia con alérgenos (AIT). La AIT es un procedimiento largo, no completamente exitoso, y costoso, ya que requiere la

identificación y formulación de los alérgenos que contribuyen a la enfermedad para cada perro (Saridomichelakis & Olivry, 2016). En este caso, sería deseable una inmunoterapia moduladora eficaz para la DA que no requiera la identificación de los alérgenos. En este trabajo, la administración de NPs de CpG-Gel disminuyó significativamente la expresión del ARNm de IL-4, y después de 18 semanas se observó una mejora de al menos el 50% de los pacientes, un resultado comparable al obtenido por la inmunoterapia tradicional con alérgenos, pero con menos efectos colaterales (I. Wagner et al., 2017).

En otro estudio se evaluó la capacidad del tratamiento con LTC (los mismos que en el ensayo con felinos) para provocar una inmunidad antiviral eficaz en perros tras un brote de herpesvirus canino (Wheat, Chow, Kuzmik, et al., 2019). Los LTC administrados en la mucosa de perros sanos (0,5 ml de LTC en cada fosa nasal y 2 ml por vía oral) indujeron citoquinas inmunes innatas clave, como IL-8, MCP-1, IL-12p40, IFN- γ y TNF- α en cultivos de PBMC y células orofaríngeas. El tratamiento con LTC dio lugar a la infiltración de células inmunitarias (monocitos y linfocitos alcanzaron su máximo a las 72 hs.) y a la activación de las vías respiratorias superiores y los tejidos orofaríngeos. Se desencadenó la producción de TNF- α , aumentó la expresión del MHC II e incrementó la actividad bactericida de los macrófagos. La celularidad general permaneció elevada en la nariz durante al menos 7 días, mientras que el recuento de células volvió a la normalidad en la orofaringe a los 7 días. En conclusión, una sola administración de LTC indujo una respuesta terapéutica (disminución de los días de observación de la conjuntivitis) consistente con la inducción de una inmunidad antiviral temprana, sin perturbar el microbioma de la orofaringe.

En un experimento más reciente, MPLA co-encapsulado con un antígeno recombinante de *E. granulosus* en liposomas (MPLA-Eg-Lipo) se vio que indujo una respuesta inmune protectora en ratones desafiados con *E. granulosus* (Z. Li et al., 2019). *E. granulosus* es el patógeno causante de la equinococosis quística (EQ), una enfermedad importante para varias especies de animales domésticos, que causa un impacto considerable en la salud humana y animal con importantes

pérdidas socioeconómicas en las zonas endémicas (Craig et al., 2007). Al mismo tiempo, no se dispone de ninguna vacuna contra esta enfermedad parasitaria crónica que se distribuye en todo el mundo, sobre todo en los países en desarrollo. En un modelo de animales de laboratorio, la inmunización s.c. con MPLA-Eg-Lipo indujo niveles más altos de IgG específica y de IFN- γ y generó un 95% de inmunidad protectora, evidenciada por el número de quistes hidatídicos, en comparación con los ratones que recibieron PBS.

7.4 Discusión y conclusiones

Como se resume en la **Figura 35**, este capítulo reunió todos los datos disponibles sobre el rendimiento de los TLR-NPs comerciales y experimentales, utilizados para reducir el uso de antibióticos en animales de producción, o como antialérgicos y antiherpéticos, en animales de compañía.

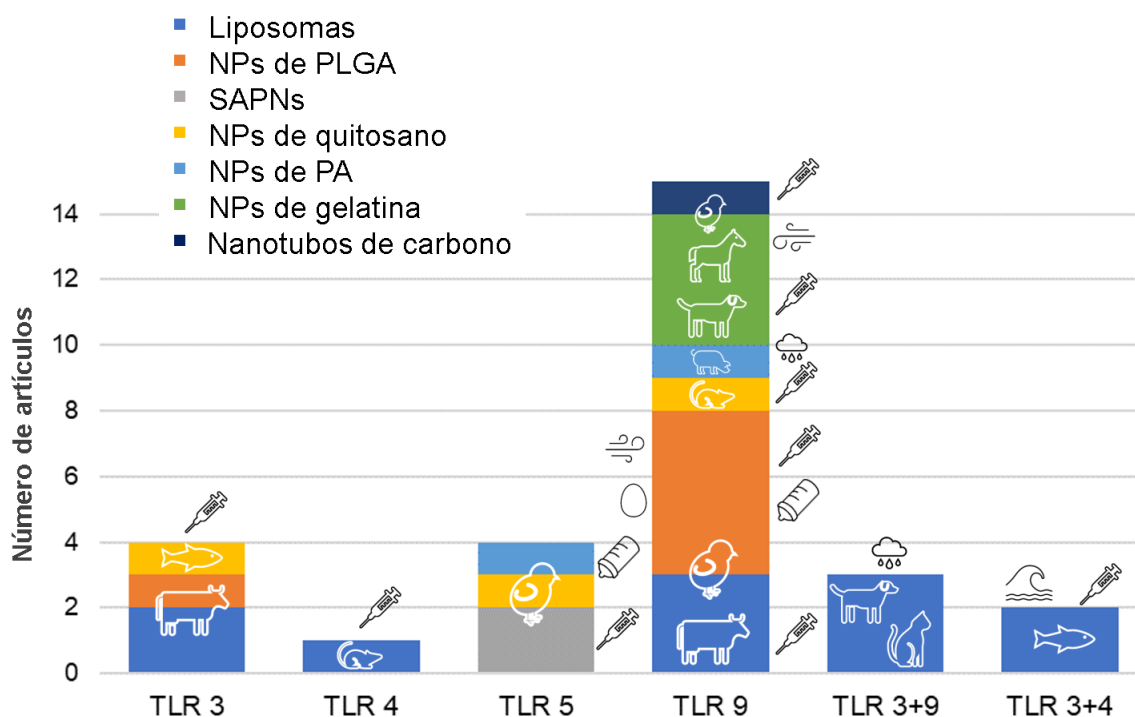


Figura 35: número de artículos científicos publicados vs. tipo de TLR-NP, ruta de administración y especie animal. 🐭 Ratones; 🪡 parenteral (i.m., s.c., i.p.); 🍷 oral; ☁️ intranasal; 🌫️ nebulización; 🐟 inmersión; 🥚 in ovo

Observamos dos importantes incertidumbres que contrarrestan los prometedores resultados publicados en los últimos 5 años. Una es sobre la verdadera necesidad de producir agentes inmunoterapéuticos utilizando nanotecnología, en lugar de hacerlo con partículas de tamaño micro o macrométricas, más sencillas y económicas de sintetizar. Si las partículas actúan como depósitos de los agonistas de TLRs, su tamaño no será relevante, a menos que se requiera su internalización endocítica. En ese caso, el tamaño de las partículas debe ser inferior a 500 nm para entrar en los vasos linfáticos iniciales. Excepto las SAPNs, consideradas como partículas endocíticas por su pequeño tamaño, la mayoría de los trabajos revisados

no abordan cuestiones que, a priori, son de lo más importantes. Faltan, por lo tanto, los elementos para responder a la segunda pregunta conexa sobre la viabilidad técnica de la producción de agentes nanoparticulados a escala industrial de acuerdo con las buenas prácticas de manufactura (GMP).

Los TLR-NPs revisados se prepararon con materiales de diferente naturaleza química, pero sólo los basados en liposomas llegaron al mercado en 2015. Este hecho sugiere que la cartera de productos veterinarios sigue la misma tendencia, en cuanto a los materiales utilizados para construir agentes nanoparticulados, observada en la nanomedicina humana. Los desafíos de la producción industrial de liposomas de tamaño nanométrico, de acuerdo con las normas de control de calidad astringente, ya fueron resueltos a principios de los años 90 (Worsham et al., 2019). Además, las formulaciones liposomales son consideradas como medicamentos complejos no biológicos y las complejas cuestiones técnicas que presenta su caracterización estructural ya han sido superadas y normalizadas (Worsham et al., 2019). Los liposomas se fabrican con materiales GRAS³¹ (que van desde los de origen animal, vegetal o microbiano, hasta los de origen sintético) que carecen de problemas de toxicidad para los seres humanos si se administran por vías distintas de la intravenosa. Presumiblemente, la misma falta de toxicidad se daría en el campo veterinaria, y, además, los liposomas admiten todas las vías de administración. Según los trabajos citados, los inmunoestimulantes comerciales, Zelnate® y Victrio®, que comparten una estructura idéntica, se administraron i.m. al ganado vacuno e *in ovo* a los pollos; mientras que las formulaciones experimentales como Vaccimax® y CAF09 se administraron s.c. al ganado vacuno; y otras formulaciones liposomales se nebulizaron en los pollos, se administraron por vía mucosa a gatos y perros e i.p. o por inmersión a los peces.

Por el contrario, la situación dista mucho de estar resuelta en el caso de las NPs fabricadas con materiales no lipídicos, que están menos caracterizadas en cuanto a su estructura, producción y toxicidad. Por ejemplo, la producción industrial de NPs

³¹ Acrónimo de “*Generally Recognized As Safe*” (“Generalmente Reconocidos como Seguros”)

poliméricas, parece ser más desafiante que la de los liposomas. Para el uso humano, sólo existen micropartículas y microesferas de PLGA disponibles comercialmente (Malik et al., 2010) y matrices macroscópicas de polianhídrido (Ghadi et al., 2017). Existe una dificultad intrínseca para escalar la producción de NPs de PLGA, en particular las de diámetro inferior a 100 nm. Para la traslación clínica y la comercialización de NPs poliméricas es imprescindible realizar estudios de caracterización sólidos que correlacionen los atributos de calidad críticos del producto, como el peso y el tamaño molecular promedio, en un amplio espacio de diseño (Sims et al., 2020). Muchas formulaciones muestran una carga de droga pobre y estos sistemas a menudo exhiben una cinética de liberación muy rápida (Essa et al., 2020). Por otra parte, la ausencia de métodos que proporcionen consistencia de lote a lote, las condiciones heterogéneas de mezcla necesarias para el autoensamblaje y los pasos adicionales de purificación dificultan los procesos GMP. Hasta 2009 (no se dispone de más datos) la preparación de NPs poliméricas mediante los métodos de difusión de disolventes por emulsificación (evaporación), nanoprecipitación (potencialmente escalable) y *salting out* sólo se han trasladado de la escala de laboratorio (volúmenes de 60 ml) a la escala piloto (volúmenes de 2 L), lejos de aquellos necesarios para el trabajo de campo (Colombo et al., 2001; Vauthier & Bouchemal, 2009). La microfluídica es una técnica que puede permitir la ampliación a escala industrial de las NPs poliméricas, aumentando las posibilidades de *targeting* endocítico y magnificando la actividad inmunoestimulante (Rezvantab & Keshavarz Moraveji, 2019). Sin embargo, los productos fabricados con esa tecnología todavía no están disponibles en el mercado.

El PLGA es un poli(α -hidroxi éster) que sufre una degradación masiva mediada por la ruptura de los enlaces en toda la estructura de las partículas. Esto lleva a un cambio en el peso molecular del polímero, aumentando el contenido de agua, la liberación de monómeros solubles, fragmentos de cadena y APIs encapsulados. Una característica importante de las partículas de PLGA es la falta de necesidad de agentes *linkers*. En los artículos revisados, la mayoría de las NPs de PLGA (500-700 nm) se formularon con CpG-ODNs, agonistas a TLR21, para la administración en mucosa como adyuvantes (oral y aerosol) e *in ovo* como inmunoestimulantes;

sólo un trabajo informó de NPs de PLGA con un agonista a TLR3 para la administración parenteral al ganado. Para evitar una liberación descontrolada (rápida y tipo ráfaga), los CpG-ODNs se complejizaron con polietilenimina; sin embargo, no se proporcionaron datos sobre la estabilidad o el perfil de liberación a lo largo del tracto gastrointestinal o después de la nebulización. Tampoco se informó si las NPs actuaban como depósitos de los agonistas o si proporcionaban un *targeting* endocítico. Esto es importante, ya que la orientación hacia los TLRs endosómicos se magnificaría en caso de que las NPs sean endocitadas, lo cual no sucedería si los agonistas se van liberando desde las NPs, que actuarían como depósitos, al microambiente. En este último caso, las micropartículas o incluso los depósitos macroscópicos podrían ser útiles para la liberación de agonistas de los TLRs de superficie.

Los polianhídridos son copolímeros de metilvinilo y anhídrido maleico; las NPs de PA presentan vínculos de anhídrido muy lábiles y una espina dorsal hidrófoba; su degradación es superficial y muestran un perfil típico de liberación de orden cero; al mismo tiempo que son mucoadhesivos (Ghadi et al., 2017). Por otra parte, el quitosano es un copolímero lineal de monosacáridos unidos con enlaces β -(1 $\rightarrow$ 4) (2-acetamido-2-deoxi- β -d-glucopiranososa y 2-amino-2-deoxi- β -d-glucopiranososa), obtenidos por desacetilación de la quitina en condiciones alcalinas o por hidrólisis enzimática con quitina deacetilasa. Se trata de un polisacárido natural con propiedades antimicrobianas y mucoadhesivas. Sin embargo, en la actualidad no ha llegado al mercado ninguna partícula de quitosano, ni siquiera en la microescala (Mohammed et al., 2017). Debido a su carácter mucoadhesivo, NPs de quitosano y de PA de entre 200 y 500 nm se utilizaron para inducir inmunidad en la mucosa mediante su administración oral y nasal. NPs de OMP-Chi o de PA recubiertas con flagelina, dirigidas a células M de las placas de Peyer, indujeron IgA y redujeron la colonización de *Salmonella*. Un agonista de TLR9 cargado en NPs de PA administrado por vía intranasal indujo una respuesta mucosa que protegió eficazmente a cerdos contra un desafío heterólogo evitando la VAERD. Sin embargo, los productos alimenticios que contienen NPs insolubles, indigeribles y potencialmente biopersistentes son un área de gran preocupación (Chaudhry &

Castle, 2011). Las incertidumbres sobre la viabilidad del escalado industrial de NPs de quitosano se suman a las dudas sobre la biodegradabilidad y biocompatibilidad de estas NPs preparadas con agentes de entrecruzamiento como el TPP y el glutaraldehído (Islam et al., 2019). Las NPs de PA, por el contrario, no se verían afectadas por estas cuestiones de seguridad.

Las NPs de gelatina de ~250 nm unidas a agonistas de TLR9, se administraron en su mayoría por nebulización a caballos asmáticos. Las NPs de gelatina derivadas de huesos o pieles de bovinos o porcinos, con una amplia gama de pesos moleculares, presentan una distribución heterogénea de tamaños. Dadas sus posibles toxicidades, se ha sugerido como opción más segura el uso de gelatina humana recombinante, para evitar el riesgo de contaminación con encefalopatía espongiforme transmisible y la sustitución de ciertos agentes de entrecruzamiento, como glutaraldehído y carbodiimida, por genipina (Farjadian et al., 2019; Won & Kim, 2009).

En fin, dado que los TLR-NPs fueron testeados contra diferentes patologías en diversas especies animales, fue difícil establecer comparaciones o conclusiones sobre la eficacia de un determinado agonista. Todos los casos analizados mostraron mejores resultados para los TLR-NPs (actuando, ya sea como adyuvantes o inmunoestimulantes por sí solos) en comparación con los agonistas libres o (cuando estaba disponible) con una terapia convencional. Y si bien se examinaron distintos tipos de NPs poliméricas y liposomas, estos últimos serían los más adecuados para satisfacer más rápidamente los requisitos de producción y las vías de administración versátiles de las inmunoterapias veterinarias.

8 Epílogo

“This is the end, beautiful friend.

This is the end, my only friend, the end.

Of our elaborated plans, the end

Of everything that stands the end...”

(The Doors – “The end”)

Seguro alguno se acordará de ese capítulo de “Los Simpsons”.

De esta manera, la historia de mi tesis ha llegado a su final. Culmino el relato haciendo un *racconto* sobre lo más importante, y dejo un final abierto para que otro autor, en algunos años, tenga la posibilidad de continuar esta historia.

Dadas las características singulares de los lípidos de arqueobacterias (estereoisomería *sn* 2,3, cadenas de fitanilos sin insaturaciones y enlaces éteres), las vesículas preparadas con APT, son más resistentes a las enzimas lipolíticas, a la hidrólisis y a la oxidación y a estrés físicos como la nebulización o la esterilización, que aquellas vesículas carentes de APT. En este caso, la particular geometría de los APT nos permitió, además, obtener una formulación con una alta proporción de IMQ incorporada, “atrapada” (de acuerdo a los análisis estructurales) entre las membranas de los APT, a diferencia de formulaciones preparadas con lípidos convencionales, por ejemplo, SPC o DPPC:DPPG:Chol (Fox et al., 2014), en las cuales el IMQ se incorpora en el interior acuoso en cantidades pequeñas. Una mayor relación IMQ/PL en nanoARC-IMQ haría de esta formulación un candidato ideal para usar como adyuvante de vacunación o como inmunoterapia *per se*, por dos motivos. Primero, porque los APT son ligandos del RS-A1, gracias al PGP-Me (componente lipídico mayoritario), lo que facilitaría la llegada del IMQ al compartimento endosomal y potenciaría la respuesta inmune en comparación con otras formulaciones carente de APT. Segundo, porque la mayor proporción IMQ/PL en los nanoARC-IMQ permitiría, con una misma dosis de PL lograr un efecto más

potente comparado con otras formulaciones nanoparticuladas o, incluso, un efecto similar disminuyendo drásticamente la dosis de IMQ y sus efectos secundarios.

En la sección 5 vemos que una dosis de nanoARC-IMQ que no es citotóxica sobre células de macrófagos de ratones, es capaz de inducir la liberación de una mayor cantidad de citoquinas pro-inflamatorias, en comparación con la misma dosis de IMQ y de LIPO-IMQ. Estos resultados demuestran *in vitro*, que la combinación del IMQ dentro de nanoARC tiene un efecto diferencial en la respuesta inmune. En esa misma sección describo los experimentos que se realizaron en ratones de laboratorio para testear la capacidad adyuvante de los nanoARC-IMQ. Observamos que la combinación (es decir, la simple mezcla física) del antígeno soluble de *L. amazonensis* con nanoARC-IMQ generó una buena respuesta inmune humoral y celular. La inmunización subcutánea de ratones BALB/c con tres dosis de nanoARC-IMQ produjo títulos de IgG antígeno-específicos más altos que el IMQ libre, que nanoARC vacíos, que LIPO-IMQ e incluso que el antígeno formulado en la emulsión agua-en-aceite MONTANIDE™ ISA 763 A VG (adyuvante comercial para aplicación veterinaria de comprobada eficacia y preparación simple). Adicionalmente, se vio una respuesta celular similar respecto al mismo adyuvante (medida por la reacción de hipersensibilidad retardada y la expresión de citoquinas pro-inflamatorias en las células del bazo de ratones). Bien es posible, entonces, que estos efectos positivos que no se obtienen con los nanoARC vacíos se deben a la alta incorporación de IMQ por las razones anteriormente nombradas. Comprobamos, con estos estudios, que la vacunación profiláctica con nanoARC-IMQ mezclado con ATL (adyuvante+antígeno), fue capaz de inducir una respuesta humoral y celular potente, que posiblemente pueda proteger a los individuos vacunados ante una infección. Esta última suposición todavía debe ser contrastada.

Como dije más arriba, otra de las posibilidades era utilizar nuestra formulación como agente inmunoterapéutico *per se* (es decir, como inmunoterapia activa inespecífica, sin la utilización de antígenos específicos). Esto lo testeamos en ratones C3H/HeN en colaboración con el laboratorio de Inmunología y Parasitología Médica de la UBA. Los ratones fueron infectados con parásitos de *T. cruzi* y luego fueron tratados con

distintas formulaciones, incluyendo al BZ, uno de los dos agentes antiparasitarios empleados en el tratamiento de la enfermedad de Chagas. Al igual que con el BZ, los nanoARC-IMQ mantuvieron la sobrevivencia de los ratones en un 100% y disminuyeron significativamente la parasitemia, comparado con el IMQ libre, nanoARC vacíos y solución salina. Asimismo, los ratones tratados con nanoARC-IMQ tuvieron un aumento significativo en los niveles de anticuerpos IgG específicos anti-*T. cruzi* en comparación con BZ y, en lo que respecta a los isotipos IgG2a/IgG1, se vio una mayor proporción de IgG2a con el tratamiento con nanoARC-IMQ, lo que indicaría que se desarrolló en ese grupo de ratones una respuesta inmune de perfil Th1, o celular. Aún más, los niveles de citoquinas pro-inflamatorias se vieron aumentados en aquellos ratones que recibieron nanoARC-IMQ, en comparación con BZ. Y, lo más remarcable es que nuestra formulación logró proteger a los ratones sin generar daños adversos en otros órganos. En general, el tratamiento con BZ, si bien es efectivo en la eliminación del parásito, tiene asociados efectos adversos y no es eficaz para prevenir la progresión de la enfermedad, que, en un cierto porcentaje de los infectados, conlleva a serios daños cardíacos (Morillo et al., 2015).

A diferencia del BZ, que actúa directamente induciendo la formación de radicales libres y metabolitos electrofílicos dentro del parásito, y generando daños sobre su el ADN (Rajao et al., 2014), los nanoARC-IMQ ejercerían su efecto potenciando el sistema inmune del animal infectado, para que el mismo genere protección contra el parásito.

Con estos resultados concluimos que los nanoARC-IMQ son capaces de actuar como moduladores del sistema inmune, sin la necesidad de incorporar antígenos. Dado que la terapia tripanocida sin antígenos funcionó en los ratones, hipotetizamos que podríamos utilizar a los nanoARC-IMQ como agentes terapéuticos contra enfermedades no infecciosas en otros animales. Antes de abordar de lleno experimentalmente esta cuestión decidimos revisar extensivamente la bibliografía, buscando publicaciones en revistas de referato donde se utilizaran sistemas nanoparticulados para el *delivery* de ligandos de TLRs en el campo veterinario. Este

trabajo de investigación es lo que comentamos en la sección 7. Potencialmente, los sistemas nanoparticulados de *delivery* de agonistas de TLRs podrían generar grandes beneficios en la industria ganadera y veterinaria, sobre todo en lo que refiere a su uso como adyuvantes de vacunación profiláctica contra enfermedades infecciosas del ganado o, incluso, como inmunoterapia contra otras enfermedades que afectan animales domésticos. Sin embargo, existe una dificultad aun no resuelta, en lo que refiere al escalado de ciertos tipos de agentes nanoparticulados. Los liposomas, por ejemplo, ya se fabrican industrialmente, y así como son los predominantes el campo de la medicina humana, parece que también son los que mayores expectativas tienen en veterinaria. Nombramos como ejemplo, a dos liposomas catiónicos comerciales formulados con CpG-ODNs (agonista de TLR9) fabricados por Bayer Animal Healthcare. Los resultados vistos con otros tipos de NPs poliméricas (como PLGA, PA o quitosano) son realmente prometedores, pero los procesos de escalado de esos sistemas aún no han sido puestos a puntos eficientemente.

Por otro lado, parece ser que las NPs para el tratamiento de cáncer en animales domésticos todavía tienen mucho potencial para dar. Eso que ya es una realidad para los seres humanos, está lejos de ser así para los animales. En consecuencia, suponemos que la puesta a punto de la preparación y caracterización de los nanoARC-IMQ de este trabajo de tesis, ha abierto la puerta para investigar su eficacia terapéutica en otros animales. Por ejemplo, su utilidad como terapia contra cáncer de células basales en perros y gatos es algo que se comenzó a evaluar pero que quedó a mitad de camino, debido al evento epidemiológico que ha sacudido enormemente las actividades en este comienzo del año 2020, y es, sin dudas, algo que deberá ser retomado.

Si han llegado hasta acá, ya sea porque se han tomado el trabajo de leer todo el documento o simplemente alguna sección, les agradezco por su tiempo y espero que les haya servido.

Sin más, ¡los saludo con un abrazo fraterno!

A handwritten signature in dark ink, featuring a stylized 'F' and 'L' followed by 'Parra'. The signature is written in a cursive, flowing style with a long horizontal stroke at the end.

Federico L. Parra

9 Bibliografía

- ©InvivoGen. (2020). CFA. Complete Freund's Adjuvant. <https://www.invivogen.com/cfa>
- Abbas, A. K., Lichtman, A. H., & Pillai, S. (2016). *Basic immunology: functions and disorders of the immune system* (5th ed.). Elsevier Inc.
- Ada, G. (2005). Overview of vaccines and vaccination. En *Molecular Biotechnology* (Vol. 29, Número 3, pp. 255–271). Springer. <https://doi.org/10.1385/MB:29:3:255>
- Adams, A. (2019). Progress, challenges and opportunities in fish vaccine development. *Fish and Shellfish Immunology*, 90, 210–214. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2019.04.066>
- Aderem, A., & Ulevitch, R. J. (2000). Toll-like receptors in the induction of the innate immune response. En *Nature* (Vol. 406, Número 6797, pp. 782–787). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/35021228>
- Akagi, T., Baba, M., & Akashi, M. (2012). Biodegradable nanoparticles as vaccine adjuvants and delivery systems: Regulation of immune responses by nanoparticle-based vaccine. En *Advances in Polymer Science* (Vol. 247, Número 1, pp. 31–64). Springer, Berlin, Heidelberg. https://doi.org/10.1007/12_2011_150
- Akira, S. (2006). TLR signaling. En *Current Topics in Microbiology and Immunology* (Vol. 311, pp. 1–16). Springer, Berlin, Heidelberg . https://doi.org/10.1007/3-540-32636-7_1
- Akira, Shizuo, & Takeda, K. (2004). Toll-like receptor signalling. En *Nature Reviews Immunology* (Vol. 4, Número 7, pp. 499–511). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/nri1391>
- Akira, Shizuo, Takeda, K., & Kaisho, T. (2001). Toll-like receptors: Critical proteins linking innate and acquired immunity. En *Nature Immunology* (Vol. 2, Número 8, pp. 675–680). <https://doi.org/10.1038/90609>

- Allen, T. M., & Cullis, P. R. (2004). Drug Delivery Systems: Entering the Mainstream. En *Science* (Vol. 303, Número 5665, pp. 1818–1822). American Association for the Advancement of Science. <https://doi.org/10.1126/science.1095833>
- Allen, T. M., & Cullis, P. R. (2013). Liposomal drug delivery systems: From concept to clinical applications. En *Advanced Drug Delivery Reviews* (Vol. 65, Número 1, pp. 36–48). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2012.09.037>
- Allen, T. M., Hansen, C., & Rutledge, J. (1989). Liposomes with prolonged circulation times: factors affecting uptake by reticuloendothelial and other tissues. *BBA - Biomembranes*, 981(1), 27–35. [https://doi.org/10.1016/0005-2736\(89\)90078-3](https://doi.org/10.1016/0005-2736(89)90078-3)
- Altube, M. J. (2018). *Nanovesículas arqueolípicas para targeting activo de agentes antiinflamatorios y antibioticos a macrófagos* [Universidad Nacional de Quilmes (Argentina)]. <http://hdl.handle.net/11336/83149>
- Altube, M. J., Cutro, A., Bakas, L., Morilla, M. J., Disalvo, E. A., & Romero, E. L. (2017). Nebulizing novel multifunctional nanovesicles: The impact of macrophage-targeted-pH-sensitive archaeosomes on a pulmonary surfactant. *Journal of Materials Chemistry B*, 5(40), 8083–8095. <https://doi.org/10.1039/c7tb01694h>
- Altube, M. J., Selzer, S. M., De Farias, M. A., Portugal, R. V., Morilla, M. J., & Romero, E. L. (2016). Surviving nebulization-induced stress: Dexamethasone in pH-sensitive archaeosomes. *Nanomedicine*, 11(16), 2103–2117. <https://doi.org/10.2217/nnm-2016-0165>
- Alving, C. R., Peachman, K. K., Rao, M., & Reed, S. G. (2012). Adjuvants for human vaccines. En *Current Opinion in Immunology* (Vol. 24, Número 3, pp. 310–315). Elsevier Current Trends. <https://doi.org/10.1016/j.coi.2012.03.008>
- Ambach, A., Bonnekoh, B., Nguyen, M., Schön, M. P., & Gollnick, H. (2004). Imiquimod, a Toll-like receptor-7 agonist, induces perforin in cytotoxic T lymphocytes in vitro. *Molecular Immunology*, 40(18), 1307–1314. <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2004.01.002>
- Amiel, E., Alonso, A., Uematsu, S., Akira, S., Poynter, M. E., & Berwin, B. (2009).

- Pivotal Advance: Toll-like receptor regulation of scavenger receptor-A-mediated phagocytosis. *Journal of Leukocyte Biology*, 85(4), 595–605.
<https://doi.org/10.1189/jlb.1008631>
- Anselmo, A. C., & Mitragotri, S. (2019). Nanoparticles in the clinic: An update. *Bioengineering & Translational Medicine*, 4(3).
<https://doi.org/10.1002/btm2.10143>
- Anwar, M. A., Shah, M., Kim, J., & Choi, S. (2019). Recent clinical trends in Toll-like receptor targeting therapeutics. En *Medicinal Research Reviews* (Vol. 39, Número 3, pp. 1053–1090). John Wiley and Sons Inc.
<https://doi.org/10.1002/med.21553>
- Aunsmo, A., Øvretveit, S., Breck, O., Valle, P. S., Larssen, R. B., & Sandberg, M. (2009). Modelling sources of variation and risk factors for spinal deformity in farmed Atlantic salmon using hierarchical- and cross-classified multilevel models. *Preventive Veterinary Medicine*, 90(1–2), 137–145.
<https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2009.03.015>
- Bahia, M. T., de Andrade, I. M., Martins, T. A. F., Nascimento, Á. F. da S. do, Diniz, L. de F., Caldas, I. S., Talvani, A., Trunz, B. B., Torreele, E., & Ribeiro, I. (2012). Fexinidazole: A Potential New Drug Candidate for Chagas Disease. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 6(11).
<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0001870>
- Bai, D. P., Lin, X. Y., Huang, Y. F., & Zhang, X. F. (2018). Theranostics aspects of various nanoparticles in veterinary medicine. En *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 19, Número 11). MDPI AG.
<https://doi.org/10.3390/ijms19113299>
- Balleza, D., Garcia-Arribas, A. B., Sot, J., Ruiz-Mirazo, K., & Goñi, F. M. (2014). Ether- Versus ester-linked phospholipid bilayers containing either linear or branched apolar chains. *Biophysical Journal*, 107(6), 1364–1374.
<https://doi.org/10.1016/j.bpj.2014.07.036>
- Bangham, A. D., & Horne, R. W. (1964). Negative staining of phospholipids and their

- structural modification by surface-active agents as observed in the electron microscope. *Journal of Molecular Biology*, 8(5), 660–668. [https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(64\)80115-7](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(64)80115-7)
- Bangham, A. D., Standish, M. M., & Watkins, J. C. (1965). Diffusion of univalent ions across the lamellae of swollen phospholipids. *Journal of Molecular Biology*, 13(1), 238–252. [https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(65\)80093-6](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(65)80093-6)
- Bangham, A. D., Standish, M. M., & Weissmann, G. (1965). The action of steroids and streptolysin S on the permeability of phospholipid structures to cations. *Journal of Molecular Biology*, 13(1), 253–259. [https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(65\)80094-8](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(65)80094-8)
- Barchet, W., Wimmenauer, V., Schlee, M., & Hartmann, G. (2008). Accessing the therapeutic potential of immunostimulatory nucleic acids. En *Current Opinion in Immunology* (Vol. 20, Número 4, pp. 389–395). Curr Opin Immunol. <https://doi.org/10.1016/j.coi.2008.07.007>
- Bareford, L. M., & Swaan, P. W. (2007). Endocytic mechanisms for targeted drug delivery. En *Advanced Drug Delivery Reviews* (Vol. 59, Número 8, pp. 748–758). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2007.06.008>
- Barrow, P. A. (2007). Salmonella infections: Immune and non-immune protection with vaccines. *Avian Pathology*, 36(1), 1–13. <https://doi.org/10.1080/03079450601113167>
- Bavananthasivam, J., Alkie, T. N., Astill, J., Abdul-Careem, M. F., Wootton, S. K., Behboudi, S., Yitbarek, A., & Sharif, S. (2018). In ovo administration of Toll-like receptor ligands encapsulated in PLGA nanoparticles impede tumor development in chickens infected with Marek's disease virus. *Vaccine*, 36(28), 4070–4076. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2018.05.091>
- Bavananthasivam, J., Alkie, T. N., Matsuyama-Kato, A., Hodgins, D. C., & Sharif, S. (2019). Characterization of innate responses induced by in ovo administration of encapsulated and free forms of ligands of Toll-like receptor 4 and 21 in chicken embryos. *Research in Veterinary Science*, 125, 405–415.

<https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2017.10.002>

Bavananthasivam, J., Read, L., Astill, J., Yitbarek, A., Alkie, T. N., Faizal, M., Careem, A., Wootton, S. K., Behboudi, S., & Sharif, S. (2018). The effects of in ovo administration of encapsulated Toll-like receptor 21 ligand as an adjuvant with Marek's disease vaccine OPEN. *SCiEntiFiC RepoRtS* |, 8, 16370. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-34760-6>

Bayer HealthCare Animal Health. (s. f.). *Victrio® DNA immunostimulant*. Recuperado 1 de julio de 2020, de <https://www.bayerlivestock.com/products/victrio-dna-immunostimulant/>

Bayer HealthCare Animal Health. (2015). *A Clinical Field Study of Zelnate® Versus Micotil® (tilmicosin) Injection for the Treatment of Bovine Respiratory Disease in Medium-Risk Cattle*. [https://www.zelnate.com/static/documents/ZNT152056Zelnate vs Micotil Tech Report.pdf](https://www.zelnate.com/static/documents/ZNT152056Zelnate%20vs%20Micotil%20Tech%20Report.pdf)

Bazin, H. (2011). *Vaccination: a History. From Lady Montagu to Genetic Engineering*. Jonh Libbey Eurotext Ltd.

BD Biosciences. (2019). *Cytokine ELISA Protocol*. <https://wwwbdbiosciences.com/en-us/applications/research-applications/multicolor-flow-cytometry/cytokine-elisa>

Beloscar, J., Pérez, A. R., & Revelli, S. (2013). *Aportes al conocimiento de la ENFERMEDAD DE CHAGAS (1°)*. Corpus.

Benvegna, T., Lemiegre, L., & Cammas-Marion, S. (2009). New Generation of Liposomes Called Archaeosomes Based on Natural or Synthetic Archaeal Lipids as Innovative Formulations for Drug Delivery. *Recent Patents on Drug Delivery & Formulation*, 3(3), 206–220. <https://doi.org/10.2174/187221109789105630>

Berger, N., Sachse, A., Bender, J., Schubert, R., & Brandl, M. (2001). Filter extrusion of liposomes using different devices: Comparison of liposome size, encapsulation efficiency, and process characteristics. *International Journal of Pharmaceutics*, 223(1–2), 55–68. <https://doi.org/10.1016/S0378->

- Bern, C. (2015). Chagas' disease. En D. L. Longo (Ed.), *New England Journal of Medicine* (Vol. 373, Número 5, pp. 456–466). Massachussetts Medical Society. <https://doi.org/10.1056/NEJMra1410150>
- Bern, C., Martin, D. L., & Gilman, R. H. (2011). Acute and Congenital Chagas Disease. En *Advances in Parasitology* (Vol. 75, pp. 19–47). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-385863-4.00002-2>
- Bertrand, N., Wu, J., Xu, X., Kamaly, N., & Farokhzad, O. C. (2014). Cancer nanotechnology: The impact of passive and active targeting in the era of modern cancer biology. En *Advanced Drug Delivery Reviews* (Vol. 66, pp. 2–25). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2013.11.009>
- Blanco, E., Shen, H., & Ferrari, M. (2015). Principles of nanoparticle design for overcoming biological barriers to drug delivery. En *Nature Biotechnology* (Vol. 33, Número 9, pp. 941–951). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/nbt.3330>
- Bobo, D., Robinson, K. J., Islam, J., Thurecht, K. J., & Corrie, S. R. (2016). Nanoparticle-Based Medicines: A Review of FDA-Approved Materials and Clinical Trials to Date. En *Pharmaceutical Research* (Vol. 33, Número 10, pp. 2373–2387). Springer New York LLC. <https://doi.org/10.1007/s11095-016-1958-5>
- Bocanegra Gondan, A. I., Ruiz-de-Angulo, A., Zabaleta, A., Gómez Blanco, N., Cobaleda-Siles, B. M., García-Granda, M. J., Padro, D., Llop, J., Arnaiz, B., Gato, M., Escors, D., & Mareque-Rivas, J. C. (2018). Effective cancer immunotherapy in mice by polyIC-imiquimod complexes and engineered magnetic nanoparticles. *Biomaterials*, 170, 95–115. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2018.04.003>
- Boehringer Ingelheim International GmbH. (2020). *Boehringer Ingelheim receives approval for Aservo® EquiHaler®, industry first therapy for severe equine asthma.* <https://www.boehringer-ingelheim.com/press-release/approval->

- Borish, L. C., & Steinke, J. W. (2003). 2. Cytokines and chemokines. En *Journal of Allergy and Clinical Immunology* (Vol. 111, Número 2 SUPPL. 2, pp. S460–S475). Mosby Inc. <https://doi.org/10.1067/mai.2003.108>
- Böttcher, C. J. F., Van gent, C. M., & Pries, C. (1961). A rapid and sensitive sub-micro phosphorus determination. *Analytica Chimica Acta*, 24(C), 203–204. [https://doi.org/10.1016/0003-2670\(61\)80041-X](https://doi.org/10.1016/0003-2670(61)80041-X)
- Bovier, P. A. (2008). Epaxal®: A virosomal vaccine to prevent hepatitis A infection. En *Expert Review of Vaccines* (Vol. 7, Número 8, pp. 1141–1150). Taylor & Francis. <https://doi.org/10.1586/14760584.7.8.1141>
- Böyum, A. (1968). Isolation of Mononuclear Cells and Granulocytes From Human Blood. Isolation of Monuclear Cells by One Centrifugation, and of Granulocytes by Combining Centrifugation and Sedimentation at 1 G. *Scand J Clin Lab Invest Suppl*, 97, 77–89.
- Bozzuto, G., & Molinari, A. (2015). Liposomes as nanomedical devices. En *International Journal of Nanomedicine* (Vol. 10, pp. 975–999). Dove Medical Press Ltd. <https://doi.org/10.2147/IJN.S68861>
- Brehm, K. E., Kumar, N., Thulke, H. H., & Haas, B. (2008). High potency vaccines induce protection against heterologous challenge with foot-and-mouth disease virus. *Vaccine*, 26(13), 1681–1687. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2008.01.038>
- Brewer, J. M., Pollock, K. G. J., Tetley, L., & Russell, D. G. (2004). Vesicle Size Influences the Trafficking, Processing, and Presentation of Antigens in Lipid Vesicles. *The Journal of Immunology*, 173(10), 6143–6150. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.173.10.6143>
- Brewer, J. M., Tetley, L., Richmond, J., Liew, F. Y., & Alexander, J. (1998). Lipid vesicle size determines the Th1 or Th2 response to entrapped antigen. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 161(8), 4000–4007. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9780169>

- Brown, D. A., Venegas, B., Cooke, P. H., English, V., & Chong, P. L. G. (2009). Bipolar tetraether archaeosomes exhibit unusual stability against autoclaving as studied by dynamic light scattering and electron microscopy. *Chemistry and Physics of Lipids*, 159(2), 95–103. <https://doi.org/10.1016/j.chemphyslip.2009.03.004>
- Bubna, A. (2015). Imiquimod-Its role in the treatment of cutaneous malignancies. En *Indian Journal of Pharmacology* (Vol. 47, Número 4, pp. 354–359). Medknow Publications. <https://doi.org/10.4103/0253-7613.161249>
- Burakova, Y., Madera, R., McVey, S., Schlup, J. R., & Shi, J. (2018). Adjuvants for Animal Vaccines. *Viral Immunology*, 31(1), 11–22. <https://doi.org/10.1089/vim.2017.0049>
- Caimi, A. T. (2019). *Nanovesículas arqueolípicas ultradeformables como adyuvantes tópicos listos para usar*. Universidad Nacional de Quilmes.
- Caimi, A. T., Parra, F. L., de Farias, M. A., Portugal, R. V., Perez, A. P., Romero, E. L., & Morilla, M. J. (2017). Topical vaccination with super-stable ready to use nanovesicles. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 152, 114–123. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2016.12.039>
- Calabro, S., Tritto, E., Pezzotti, A., Taccone, M., Muzzi, A., Bertholet, S., De Gregorio, E., O'Hagan, D. T., Baudner, B., & Seubert, A. (2013). The adjuvant effect of MF59 is due to the oil-in-water emulsion formulation, none of the individual components induce a comparable adjuvant effect. *Vaccine*, 31(33), 3363–3369. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2013.05.007>
- Calderon-nieva, D. (2018). *Improving the delivery and immunogenicity of an inhalable CpG-ODN DNA vaccine by bio-adhesive gemini nanoparticles in neonatal chickens* [University of Waterloo]. <http://hdl.handle.net/10012/12812>
- Calmette, A., Guérin, C., Boquet, A., & Nègre, L. (1927). La Vaccination Preventive Contre la Tuberculose par le “BCG”. *Masson et cie*, 233.
- Canton, J., Neculai, D., & Grinstein, S. (2013). Scavenger receptors in homeostasis and immunity. En *Nature Reviews Immunology* (Vol. 13, Número 9, pp. 621–

634). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/nri3515>

- Cargnelutti, D. E., Salomón, M. C., Celedon, V., García Bustos, M. F., Morea, G., Cuello-Carrión, F. D., & Scodeller, E. A. (2016). Immunization with antigenic extracts of *Leishmania* associated with Montanide ISA 763 adjuvant induces partial protection in BALB/c mice against *Leishmania* (*Leishmania*) *amazonensis* infection. *Journal of Microbiology, Immunology and Infection*, 49(1), 24–32. <https://doi.org/10.1016/j.jmii.2014.01.006>
- Carstens, M. G., Camps, M. G. M., Henriksen-Lacey, M., Franken, K., Ottenhoff, T. H. M., Perrie, Y., Bouwstra, J. A., Ossendorp, F., & Jiskoot, W. (2011). Effect of vesicle size on tissue localization and immunogenicity of liposomal DNA vaccines. *Vaccine*, 29(29–30), 4761–4770. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2011.04.081>
- Carvalho, S. G., Araujo, V. H. S., dos Santos, A. M., Duarte, J. L., Silvestre, A. L. P., Fonseca-Santos, B., Villanova, J. C. O., Gremião, M. P. D., & Chorilli, M. (2020). Advances and challenges in nanocarriers and nanomedicines for veterinary application. En *International Journal of Pharmaceutics* (Vol. 580). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2020.119214>
- Castro, J. A., & Diaz de Toranzo, E. G. (1988). Toxic effects of nifurtimox and benznidazole, two drugs used against American trypanosomiasis (Chagas' disease). En *Biomedical and environmental sciences : BES* (Vol. 1, Número 1, pp. 19–33).
- Cavalier-Smith, T. (1998). A revised six-kingdom system of life. *Biological Reviews of the Cambridge Philosophical Society*, 73(3), 203–266. <https://doi.org/10.1017/s0006323198005167>
- Cavicchioli, R., Curmi, P. M. G., Saunders, N., & Thomas, T. (2003). Pathogenic archaea: do they exist? *BioEssays*, 25(11), 1119–1128. <https://doi.org/10.1002/bies.10354>
- Cazorla, S. I., Becker, P. D., Frank, F. M., Ebensen, T., Sartori, M. J., Corral, R. S., Malchiodi, E. L., & Guzmán, C. A. (2008). Oral vaccination with *Salmonella*

- enterica as a cruzipain-DNA delivery system confers protective immunity against *Trypanosoma cruzi*. *Infection and Immunity*, 76(1), 324–333. <https://doi.org/10.1128/IAI.01163-07>
- Cell Signaling Technology Inc. (2014). *Toll-like Receptor Signaling*. CST Pathways. <https://www.cellsignal.com/contents/science-cst-pathways-immunology-inflammation/toll-like-receptor-signaling/pathways-tlr>
- Centers for Disease Control and Prevention. (2015). *Epidemiology and Prevention of Vaccine-Preventable Diseases* (J. Hamborsky, A. Kroger, & C. Wolfe (eds.); 13th ed.). Public Health Foundation.
- Cevey, Á. C., Mirkin, G. A., Penas, F. N., & Goren, N. B. (2016). Low-dose benznidazole treatment results in parasite clearance and attenuates heart inflammatory reaction in an experimental model of infection with a highly virulent *Trypanosoma cruzi* strain. *International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance*, 6(1), 12–22. <https://doi.org/10.1016/j.ijpddr.2015.12.001>
- Chaudhry, Q., & Castle, L. (2011). Food applications of nanotechnologies: An overview of opportunities and challenges for developing countries. *Trends in Food Science and Technology*, 22(11), 595–603. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2011.01.001>
- Cher, D. J., & Mosmann, T. R. (1987). Two types of murine helper T cell clone. II. Delayed-type hypersensitivity is mediated by TH1 clones. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 138(11), 3688–3694. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2953788>
- Choi, Y., & Hong, S. (2020). Qualitative and quantitative analysis of patent data in nanomedicine for bridging the gap between research activities and practical applications. *World Patent Information*, 60, 101943. <https://doi.org/10.1016/j.wpi.2019.101943>
- Chollet, J. L., Jozwiakowski, M. J., Phares, K. R., Reiter, M. J., Roddy, P. J., Schultz, H. J., Ta, Q. V., & Tomai, M. A. (1999). Development of a Topically Active Imiquimod Formulation. *Pharmaceutical Development and Technology*, 4(1),

35–43. <https://doi.org/10.1080/10837459908984222>

Choquet, C. G., Patel, G. B., Beveridge, T. J., & Sprott, G. D. (1992). Formation of unilamellar liposomes from total polar lipid extracts of methanogens. *Applied and environmental microbiology*, 58(9), 2894–2900. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1444403>

Christensen, D., Agger, E. M., Andreasen, L. V., Kirby, D., Andersen, P., & Perrie, Y. (2009). Liposome-based cationic adjuvant formulations (CAF): past, present, and future. *Journal of liposome research*, 19(1), 2–11. <https://doi.org/10.1080/08982100902726820>

Clem, A. S. (2011). Fundamentals of vaccine immunology. *Journal of Global Infectious Diseases*, 3(1), 73–78. <https://doi.org/10.4103/0974-777X.77299>

Coffman, R. L., Seymour, B. W. P., Lebman, D. A., Hiraki, D. D., Christiansen, J. A., Shrader, B., Cherwinski, H. M., Savelkoul, H. F. J., Finkelman, F. D., Bond, M. W., & Mosmann, T. R. (1988). The Role of Helper T Cell Products in Mouse B Cell Differentiation and Isotype Regulation. *Immunological Reviews*, 102(1), 5–28. <https://doi.org/10.1111/j.1600-065X.1988.tb00739.x>

Coffman, R. L., Sher, A., & Seder, R. A. (2010). Vaccine adjuvants: Putting innate immunity to work. En *Immunity* (Vol. 33, Número 4, pp. 492–503). Cell Press. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2010.10.002>

Coherent Market Insights. (2019). *Veterinary oncology market analysis*. <https://www.coherentmarketinsights.com/market-insight/veterinary-oncology-market-2995>

Coller, S. P., & Paulnock, D. M. (2001). Signaling pathways initiated in macrophages after engagement of type A scavenger receptors. *Journal of Leukocyte Biology*, 70(1), 142–148. <https://doi.org/10.1189/jlb.70.1.142>

Colombo, A. P., Briançon, S., Lieto, J., & Fessi, H. (2001). Project, design, and use of a pilot plant for nanocapsule production. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 27(10), 1063–1072. <https://doi.org/10.1081/DDC-100108369>

- Conner, S. D., & Schmid, S. L. (2003). Regulated portals of entry into the cell. En *Nature* (Vol. 422, Número 6927, pp. 37–44). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/nature01451>
- Contreras, E. T., Olea-Popelka, F., Wheat, W., Dow, S., Hawley, J., & Lappin, M. R. (2019). Evaluation of liposome toll-like receptor ligand complexes for non-specific mucosal immunoprotection from feline herpesvirus-1 infection. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 33(2), 831–837. <https://doi.org/10.1111/jvim.15427>
- Cooper, N. R., & Nemerow, G. R. (1984). The role of antibody and complement in the control of viral infections. *Journal of Investigative Dermatology*, 83(1 SUPPL.), S121–S127. <https://doi.org/10.1038/jid.1984.33>
- Corbanie, E. A., Matthijs, M. G. R., Van Eck, J. H. H., Remon, J. P., Landman, W. J. M., & Vervaet, C. (2006). Deposition of differently sized airborne microspheres in the respiratory tract of chickens. *Avian Pathology*, 35(6), 475–485. <https://doi.org/10.1080/03079450601028845>
- Corcelli, A., & Lobasso, S. (2006). 25 Characterization of Lipids of Halophilic Archaea. *Methods in Microbiology*, 35, 585–613. [https://doi.org/10.1016/S0580-9517\(08\)70028-X](https://doi.org/10.1016/S0580-9517(08)70028-X)
- Corral, R. S., & Petray, P. B. (2000). CpG DNA as a Th1-promoting adjuvant in immunization against *Trypanosoma cruzi*. *Vaccine*, 19(2–3), 234–242. [https://doi.org/10.1016/S0264-410X\(00\)00172-9](https://doi.org/10.1016/S0264-410X(00)00172-9)
- Cotena, A., Gordon, S., & Platt, N. (2004). The Class A Macrophage Scavenger Receptor Attenuates CXC Chemokine Production and the Early Infiltration of Neutrophils in Sterile Peritonitis. *The Journal of Immunology*, 173(10), 6427–6432. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.173.10.6427>
- Coura, J. R., & De Castro, S. L. (2002). A critical review on chagas disease chemotherapy. En *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz* (Vol. 97, Número 1, pp. 3–24). Fundacao Oswaldo Cruz. <https://doi.org/10.1590/S0074-02762002000100001>

- Cox, J. C., & Coulter, A. R. (1992). Advances in Adjuvant Technology and Application. En W. K. Young (Ed.), *Animal Parasite Control Using Biotechnology*. CRC Press, Inc.
- Cox, J. C., & Coulter, A. R. (1997). Adjuvants - A classification and review of their modes of action. En *Vaccine* (Vol. 15, Número 3, pp. 248–256). Elsevier. [https://doi.org/10.1016/S0264-410X\(96\)00183-1](https://doi.org/10.1016/S0264-410X(96)00183-1)
- Craig, P. S., McManus, D. P., Lightowers, M. W., Chabalgoity, J. A., Garcia, H. H., Gavidia, C. M., Gilman, R. H., Gonzalez, A. E., Lorca, M., Naquira, C., Nieto, A., & Schantz, P. M. (2007). Prevention and control of cystic echinococcosis. En *Lancet Infectious Diseases* (Vol. 7, Número 6, pp. 385–394). Lancet Publishing Group. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(07\)70134-2](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(07)70134-2)
- Crommelin, D. J. A., van Hoogevest, P., & Storm, G. (2020). The role of liposomes in clinical nanomedicine development. What now? Now what? *Journal of Controlled Release*, 318, 256–263. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2019.12.023>
- Crowle, A. J. (1975). Delayed Hypersensitivity in the Mouse. *Advances in Immunology*, 20(C), 197–264. [https://doi.org/10.1016/S0065-2776\(08\)60209-6](https://doi.org/10.1016/S0065-2776(08)60209-6)
- Croy, S., & Kwon, G. (2006). Polymeric Micelles for Drug Delivery. *Current Pharmaceutical Design*, 12(36), 4669–4684. <https://doi.org/10.2174/138161206779026245>
- Cummings, T. S. (2006). Stakeholder position paper: Poultry. *Preventive Veterinary Medicine*, 73(2–3), 209–212. <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2005.09.011>
- Cunha-Neto, E., Nogueira, L. G., Teixeira, P. C., Ramasawmy, R., Drigo, S. A., Goldberg, A. C., Fonseca, S. G., Bilate, A. M., & Kalil, J. (2009). Immunological and non-immunological effects of cytokines and chemokines in the pathogenesis of chronic Chagas disease cardiomyopathy. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, 104(SUPPL. 1), 252–258. <https://doi.org/10.1590/S0074-02762009000900032>
- Cutrullis, R. A., Postan, M., Petray, P. B., & Corral, R. S. (2009). Timing of expression

of inflammatory mediators in skeletal muscles from mice acutely infected with the RA strain of *trypanosoma cruzi*. *Pathobiology*, 76(4), 170–180. <https://doi.org/10.1159/000218333>

Daemen, T., De Mare, A., Bungener, L., De Jonge, J., Huckriede, A., & Wilschut, J. (2005). Virosomes for antigen and DNA delivery. En *Advanced Drug Delivery Reviews* (Vol. 57, Número 3 SPEC. ISS., pp. 451–463). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2004.09.005>

Daftarian, P., Mansour, M., Benoit, A. C., Pohajdak, B., Hoskin, D. W., Brown, R. G., & Kast, W. M. (2006). Eradication of established HPV 16-expressing tumors by a single administration of a vaccine composed of a liposome-encapsulated CTL-T helper fusion peptide in a water-in-oil emulsion. *Vaccine*, 24(24), 5235–5244. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2006.03.079>

Damm, J., Wiegand, F., Harden, L. M., Gerstberger, R., Rummel, C., & Roth, J. (2012). Fever, sickness behavior, and expression of inflammatory genes in the hypothalamus after systemic and localized subcutaneous stimulation of rats with the toll-like receptor 7 agonist imiquimod. *Neuroscience*, 201, 166–183. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2011.11.013>

Dasu, M. R., Devaraj, S., Park, S., & Jialal, I. (2010). Increased Toll-Like Receptor (TLR) activation and TLR ligands in recently diagnosed type 2 diabetic subjects. *Diabetes Care*, 33(4), 861–868. <https://doi.org/10.2337/dc09-1799>

Davidson, J., Rosenkrands, I., Christensen, D., Vangala, A., Kirby, D., Perrie, Y., Agger, E. M., & Andersen, P. (2005). Characterization of cationic liposomes based on dimethyldioctadecylammonium and synthetic cord factor from *M. tuberculosis* (trehalose 6,6'- dibehenate) - A novel adjuvant inducing both strong CMI and antibody responses. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, 1718(1–2), 22–31. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2005.10.011>

Davis, M. E., Chen, Z., & Shin, D. M. (2008). Nanoparticle therapeutics: An emerging treatment modality for cancer. En *Nature Reviews Drug Discovery* (Vol. 7, Número 9, pp. 771–782). Nature Publishing Group.

<https://doi.org/10.1038/nrd2614>

- De Meyer, I., Martinet, W., Schrijvers, D. M., Timmermans, J. P., Bult, H., & De Meyer, G. R. Y. (2012). Toll-like receptor 7 stimulation by imiquimod induces macrophage autophagy and inflammation in atherosclerotic plaques. *Basic Research in Cardiology*, 107(3), 1–13. <https://doi.org/10.1007/s00395-012-0269-1>
- De Souza, A. P., Olivieri, B. P., De Castro, S. L., & Araújo-Jorge, T. C. (2000). Enzymatic markers of heart lesion in mice infected with *Trypanosoma cruzi* and submitted to benznidazole chemotherapy. *Parasitology Research*, 86(10), 800–808. <https://doi.org/10.1007/s004360000262>
- De Souza, W., De Carvalho, T. M. U., & Barrias, E. S. (2010). Review on *Trypanosoma cruzi*: Host cell interaction. En *International Journal of Cell Biology*. <https://doi.org/10.1155/2010/295394>
- De Temmerman, M. L., Rejman, J., Demeester, J., Irvine, D. J., Gander, B., & De Smedt, S. C. (2011). Particulate vaccines: On the quest for optimal delivery and immune response. *Drug Discovery Today*, 16(13–14), 569–582. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2011.04.006>
- de Winther, M. P. J., van Dijk, K. W., Havekes, L. M., & Hofker, M. H. (2000). Macrophage Scavenger Receptor Class A. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 20(2), 290–297. <https://doi.org/10.1161/01.ATV.20.2.290>
- Delany, I., Rappuoli, R., & De Gregorio, E. (2014). Vaccines for the 21st century. En *EMBO Molecular Medicine* (Vol. 6, Número 6, pp. 708–720). Blackwell Publishing Ltd. <https://doi.org/10.1002/emmm.201403876>
- Dempsey, P. W., Vaidya, S. A., & Cheng, G. (2003). The Art of War: Innate and adaptive immune responses. En *Cellular and Molecular Life Sciences* (Vol. 60, Número 12, pp. 2604–2621). Springer. <https://doi.org/10.1007/s00018-003-3180-y>
- Desel, C., Werninghaus, K., Ritter, M., Jozefowski, K., Wenzel, J., Russkamp, N., Schleicher, U., Christensen, D., Wirtz, S., Kirschning, C., Agger, E. M., da

- Costa, C. P., & Lang, R. (2013). The Mincle-Activating Adjuvant TDB Induces MyD88-Dependent Th1 and Th17 Responses through IL-1R Signaling. *PLoS ONE*, 8(1). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0053531>
- Deshpande, P. P., Biswas, S., & Torchilin, V. P. (2013). Current trends in the use of liposomes for tumor targeting. En *Nanomedicine* (Vol. 8, Número 9, pp. 1509–1528). Future Medicine Ltd. <https://doi.org/10.2217/nnm.13.118>
- Deutskens, F., Lamp, B., Riedel, C. M., Wentz, E., Lochnit, G., Doll, K., Thiel, H. J., & Rümenapf, T. (2011). Vaccine-induced antibodies linked to bovine neonatal pancytopenia (BNP) recognize cattle major histocompatibility complex class I (MHC I). *Veterinary Research*, 42(1). <https://doi.org/10.1186/1297-9716-42-97>
- Dhakal, S., Ghimire, S., Renu, S., Ross, K. A., Lakshmanappa, Y. S., Hogshead, B. T., Bernardo, P., Lee, C. W., Wannemuehler, M. J., Narasimhan, B., & Renukaradhya, G. J. (2019). Evaluation of CpG-ODN-adjuvanted polyanhydride-based intranasal influenza nanovaccine in pigs. *Veterinary Microbiology*, 237. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2019.108401>
- Dhawan, A., & Sharma, V. (2010). Toxicity assessment of nanomaterials: Methods and challenges. En *Analytical and Bioanalytical Chemistry* (Vol. 398, Número 2, pp. 589–605). Springer. <https://doi.org/10.1007/s00216-010-3996-x>
- Didierlaurent, A. M., Laupèze, B., Di Pasquale, A., Hergli, N., Collignon, C., & Garçon, N. (2017). Adjuvant system AS01: helping to overcome the challenges of modern vaccines. En *Expert Review of Vaccines* (Vol. 16, Número 1, pp. 55–63). Taylor and Francis Ltd. <https://doi.org/10.1080/14760584.2016.1213632>
- Doherty, G. J., & McMahon, H. T. (2009). Mechanisms of Endocytosis. *Annual Review of Biochemistry*, 78(1), 857–902. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.78.081307.110540>
- Donahue, N. D., Acar, H., & Wilhelm, S. (2019). Concepts of nanoparticle cellular uptake, intracellular trafficking, and kinetics in nanomedicine. En *Advanced Drug Delivery Reviews* (Vol. 143, pp. 68–96). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2019.04.008>

- Dowling, J. K., & Mansell, A. (2016). Toll-like receptors: the swiss army knife of immunity and vaccine development. *Clinical & Translational Immunology*, 5(5), e85. <https://doi.org/10.1038/cti.2016.22>
- Drugs for Neglected Diseases Initiative. (2014). *K777 (Chagas)*. <https://www.dndi.org/diseases-projects/portfolio/completed-projects/k777/>
- Drugs for Neglected Diseases Initiative. (2019). *The BENDITA study: Chagas disease*. https://www.dndi.org/wp-content/uploads/2019/03/2page_BenditatStudyOverview_ENG.pdf
- Dudani, R., Chapdelaine, Y., Van Faassen, H., Smith, D. K., Shen, H., Krishnan, L., & Sad, S. (2002). Preexisting inflammation due to Mycobacterium bovis BCG infection differentially modulates T-cell priming against a replicating or nonreplicating immunogen. *Infection and Immunity*, 70(4), 1957–1964. <https://doi.org/10.1128/IAI.70.4.1957-1964.2002>
- Dudek, N. L., Perlmutter, P., Aguilar, M.-I., Croft, N. P., & Purcell, A. W. (2010). Epitope Discovery and Their Use in Peptide Based Vaccines. *Current Pharmaceutical Design*, 16(28), 3149–3157. <https://doi.org/10.2174/138161210793292447>
- Dunkelberger, J. R., & Song, W. C. (2010). Complement and its role in innate and adaptive immune responses. *Cell Research*, 20(1), 34–50. <https://doi.org/10.1038/cr.2009.139>
- Eckburg, P. B., Lepp, P. W., & Relman, D. A. (2003). Archaea and their potential role in human disease. En *Infection and Immunity* (Vol. 71, Número 2, pp. 591–596). American Society for Microbiology Journals. <https://doi.org/10.1128/IAI.71.2.591-596.2003>
- Edwards, K. M., Decker, M. D., & Mortimer, E. A. (1999). Pertussis Vaccine. En S. A. Plotkin & W. A. Orenstein (Eds.), *Vaccine* (3rd ed., pp. 293–344). Saunders Company.
- El-Sayed, A., & Kamel, M. (2018). Advanced applications of nanotechnology in veterinary medicine. *Environmental Science and Pollution Research*.

<https://doi.org/10.1007/s11356-018-3913-y>

- El Sabry, M. I., McMillin, K. W., & Sabliov, C. M. (2018). Nanotechnology Considerations for Poultry and Livestock Production Systems - A Review. En *Annals of Animal Science* (Vol. 18, Número 2, pp. 319–334). Walter de Gruyter GmbH. <https://doi.org/10.1515/aoas-2017-0047>
- Eme, L., Spang, A., Lombard, J., Stairs, C. W., & Ettema, T. J. G. (2017). Archaea and the origin of eukaryotes. En *Nature Reviews Microbiology* (Vol. 15, Número 12, pp. 711–723). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2017.133>
- Eng, H. L., Hsu, Y. Y., & Lin, T. M. (2018). Differences in TLR7/8 activation between monocytes and macrophages. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 497(1), 319–325. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2018.02.079>
- Engel, A. L., Holt, G. E., & Lu, H. (2011). The pharmacokinetics of Toll-like receptor agonists and the impact on the immune system. *Expert Review of Clinical Pharmacology*, 4(2), 275–289. <https://doi.org/10.1586/ecp.11.5>
- Esper, L., Talvani, A., Pimentel, P., Teixeira, M. M., & Machado, F. S. (2015). Molecular mechanisms of myocarditis caused by *Trypanosoma cruzi*. En *Current Opinion in Infectious Diseases* (Vol. 28, Número 3, pp. 246–252). Lippincott Williams and Wilkins. <https://doi.org/10.1097/QCO.0000000000000157>
- Essa, D., Kondiah, P. P. D., Choonara, Y. E., & Pillay, V. (2020). The Design of Poly(lactide-co-glycolide) Nanocarriers for Medical Applications. En *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology* (Vol. 8). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2020.00048>
- Etheridge, M. L., Campbell, S. A., Erdman, A. G., Haynes, C. L., Wolf, S. M., & McCullough, J. (2013). The big picture on nanomedicine: The state of investigational and approved nanomedicine products. En *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine* (Vol. 9, Número 1, pp. 1–14). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/j.nano.2012.05.013>

- European Comission. (2011). *Definition of a nanomaterial*.
https://ec.europa.eu/environment/chemicals/nanotech/faq/definition_en.htm
- European Medicines Agency. (2008). *EUROPEAN PUBLIC ASSESSMENT REPORT (EPAR) – ALDARA*.
https://www.ema.europa.eu/en/documents/overview/aldara-epar-summary-public_es.pdf
- FAO. (2014). *The State of World Fisheries and Aquaculture 2014*.
<http://www.fao.org/3/a-i3720e.pdf>
- Farjadian, F., Ghasemi, A., Gohari, O., Roointan, A., Karimi, M., & Hamblin, M. R. (2019). Nanopharmaceuticals and nanomedicines currently on the market: Challenges and opportunities. En *Nanomedicine* (Vol. 14, Número 1, pp. 93–126). Future Medicine Ltd. <https://doi.org/10.2217/nnm-2018-0120>
- Feldmann, M., & Steinman, L. (2005). Design of effective immunotherapy for human autoimmunity. En *Nature* (Vol. 435, Número 7042, pp. 612–619). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/nature03727>
- Fender, K. R. (2018). *Genes and cancer: Hot trend in veterinary product development*. dvm360. <https://www.dvm360.com/view/genes-and-cancer-hot-trend-veterinary-product-development>
- Fernández, M. L., Hernández, Y., Scollo, K., Esteva, M. I., Riarte, A. R., & Prado, N. G. (2018). Chagas cardiomyopathy associated with serological cure after trypanocidal treatment during childhood. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 51(4), 557–559. <https://doi.org/10.1590/0037-8682-0364-2017>
- Fischer, H. C., & Chan, W. C. (2007). Nanotoxicity: the growing need for in vivo study. En *Current Opinion in Biotechnology* (Vol. 18, Número 6, pp. 565–571). Elsevier Current Trends. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2007.11.008>
- Fischer, M., & Ehlers, M. (2008). Toll-like Receptors in Autoimmunity. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1143(1), 21–34. <https://doi.org/10.1196/annals.1443.012>

- Fitch, F. W., McKisic, M. D., Lancki, D. W., & Gajewski, T. F. (1993). Differential Regulation of Murine T Lymphocyte Subsets. *Annual Review of Immunology*, 11(1), 29–48. <https://doi.org/10.1146/annurev.iy.11.040193.000333>
- Flannagan, R. S., Jaumouillé, V., & Grinstein, S. (2012). The Cell Biology of Phagocytosis. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease*, 7(1), 61–98. <https://doi.org/10.1146/annurev-pathol-011811-132445>
- Forth Institute of Molecular Biology & Biotechnology. (s. f.). *Signaling and endocytic pathways*. Recuperado 14 de noviembre de 2019, de <https://www.imbb.forth.gr/imbb-people/en/fotsis-murphy-laboratory/signalling-and-endocytic-trafficking>
- Fouzder, C., Mukhuty, A., Das, S., & Chattopadhyay, D. (2019). TLR Signaling on Protozoan and Helminthic Parasite Infection. En N. Rezaei (Ed.), *Toll-like Receptors*. IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/intechopen.84711>
- Fox, C. B., Sivananthan, S. J., Duthie, M. S., Vergara, J., Guderian, J. A., Moon, E., Coblentz, D., Reed, S. G., & Carter, D. (2014). A nanoliposome delivery system to synergistically trigger TLR4 AND TLR7. *Journal of Nanobiotechnology*, 12(1), 17. <https://doi.org/10.1186/1477-3155-12-17>
- Fransson, J., & Espander-Jansson, A. (1996). Local Tolerance of Subcutaneous Injections. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 48(10), 1012–1015. <https://doi.org/10.1111/j.2042-7158.1996.tb05892.x>
- Frederik, P. M., & Hubert, D. H. W. (2005). Cryoelectron microscopy of liposomes. *Methods in Enzymology*, 391(SPEC. ISS.), 431–448. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(05\)91024-0](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(05)91024-0)
- Freund, J., Casals, J., & Hosmer, E. P. (1937). Sensitization and Antibody Formation after Injection of Tubercle Bacilli and Paraffin Oil. *Experimental Biology and Medicine*, 37(3), 509–513. <https://doi.org/10.3181/00379727-37-9625>
- Furudate, S., Fujimura, T., Kambayashi, Y., Kakizaki, A., Hidaka, T., & Aiba, S. (2017). Immunomodulatory Effect of Imiquimod Through CCL22 Produced by Tumor-associated Macrophages in B16F10 Melanomas. *Anticancer research*,

37(7), 3461–3471. <https://doi.org/10.21873/anticancerres.11714>

Gabizon, A. A. (2001). Pegylated liposomal doxorubicin: Metamorphosis of an old drug into a new form of chemotherapy. En *Cancer Investigation* (Vol. 19, Número 4, pp. 424–436). Taylor & Francis. <https://doi.org/10.1081/CNV-100103136>

Gabizon, A., Shmeeda, H., Horowitz, A. T., & Zalipsky, S. (2004). Tumor cell targeting of liposome-entrapped drugs with phospholipid-anchored folic acid-PEG conjugates. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 56(8), 1177–1192. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2004.01.011>

Gangloff, M. (2012). Different dimerisation mode for TLR4 upon endosomal acidification? *Trends in Biochemical Sciences*, 37(3), 92–98. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2011.11.003>

García, M. C., Ponce, N. E., Sanmarco, L. M., Manzo, R. H., Jimenez-Kairuz, A. F., & Aoki, M. P. (2016). Clomipramine and benznidazole act synergistically and ameliorate the outcome of experimental chagas disease. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 60(6), 3700–3708. <https://doi.org/10.1128/AAC.00404-16>

Gay, N. J., & Gangloff, M. (2007). Structure and Function of Toll Receptors and Their Ligands. *Annual Review of Biochemistry*, 76(1), 141–165. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.76.060305.151318>

Gedon, N. K. Y., & Mueller, R. S. (2018). Atopic dermatitis in cats and dogs: A difficult disease for animals and owners. En *Clinical and Translational Allergy* (Vol. 8, Número 1, pp. 1–12). BioMed Central Ltd. <https://doi.org/10.1186/s13601-018-0228-5>

Gerster, J. F. (1987). *1H-Imidazo[4,5-c]quinolin-4-amines and antiviral use* (Patent N° 4689338A). U.S. Patent and Trademark Office. <https://patents.google.com/patent/US4689338A/en>

Ghadi, R., Muntimadugu, E., Domb, A. J., Khan, W., & Zhang, X. (2017). Synthetic biodegradable medical polymer: Polyanhydrides. En *Science and Principles of Biodegradable and Bioresorbable Medical Polymers: Materials and Properties*

(pp. 153–188). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100372-5.00005-2>

- Gibson, S. J., Imbertson, L. M., Wagner, T. L., Testerman, T. L., Reiter, M. J., Miller, R. L., & Tomai, M. A. (1995). Cellular Requirements for Cytokine Production in Response to the Immunomodulators Imiquimod and S-27609. *Journal of Interferon and Cytokine Research*, 15(6), 537–545. <https://doi.org/10.1089/jir.1995.15.537>
- Gill, E. E., & Brinkman, F. S. L. (2011). The proportional lack of archaeal pathogens: Do viruses/phages hold the key? *BioEssays*, 33(4), 248–254. <https://doi.org/10.1002/bies.201000091>
- Glenny, A. T., Pope, C. G., Waddington, H., & Wallace, U. (1926). Immunological notes. XVII-XXIV. *The Journal of Pathology and Bacteriology*, 29(1), 31–40. <https://doi.org/10.1002/path.1700290106>
- Gogoll, K., Stein, P., Lee, K. D., Arnold, P., Peters, T., Schild, H., Radsak, M., & Langguth, P. (2016). Solid nanoemulsion as antigen and immunopotentiator carrier for transcutaneous immunization. *Cellular Immunology*, 308, 35–43. <https://doi.org/10.1016/j.cellimm.2016.06.001>
- Gogoll, K., Stein, P., Wei, H., Schild, H., Radsak, M., & Langguth, P. (2012). Comparative transcutaneous immunization with imiquimod-containing ointments and potential of in vitro methods to predict effects. *Biopharmaceutics & Drug Disposition*, 33(4), 218–228. <https://doi.org/10.1002/bdd.1787>
- Goldstein, J. L., Ho, Y. K., Basu, S. K., & Brown, M. S. (1979). Binding site on macrophages that mediates uptake and degradation of acetylated low density lipoprotein, producing massive cholesterol deposition. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 76(1), 333–337. <https://doi.org/10.1073/pnas.76.1.333>
- Gonzalez, R. O., Higa, L. H., Cutrullis, R. A., Bilen, M., Morelli, I., Roncaglia, D. I., Corral, R. S., Morilla, M. J., Petray, P. B., & Romero, E. L. (2009). Archaeosomes made of Halorubrum tebenquichense total polar lipids: A new

source of adjuvancy. *BMC Biotechnology*, 9, 71. <https://doi.org/10.1186/1472-6750-9-71>

Gould, D. (2011). Feline Herpesvirus-1. Ocular manifestations, diagnosis and treatment options. En *Journal of Feline Medicine and Surgery* (Vol. 13, Número 5, pp. 333–346). J Feline Med Surg. <https://doi.org/10.1016/j.jfms.2011.03.010>

Gouvea Omote, H. D. S., & Sluszz, T. (2013). Market research for veterinary medicines R&D for cattle in Brazil. *Revista GEINTEC*, 3(5), 129–147. <https://doi.org/10.7198/S2237-0722201300050011>

Grand View Research. (2020). *Animal Health Market Size, Share & Trends Analysis 2020-2027*. <https://www.grandviewresearch.com/industry-analysis/animal-health-market>

Graversen, J. H., Svendsen, P., Dagnæs-Hansen, F., Dal, J., Anton, G., Etzerodt, A., Petersen, M. D., Christensen, P. A., Møller, H. J., & Moestrup, S. K. (2012). Targeting the hemoglobin scavenger receptor CD163 in macrophages highly increases the anti-inflammatory potency of dexamethasone. *Molecular Therapy*, 20(8), 1550–1558. <https://doi.org/10.1038/mt.2012.103>

Gregoriadis, G., Leathwood, P. D., & Ryman, B. E. (1971). Enzyme entrapment in liposomes. *FEBS Letters*, 14(2), 95–99. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(71\)80109-6](https://doi.org/10.1016/0014-5793(71)80109-6)

Gregoriadis, G., & Ryman, B. E. (1971). Liposomes as carriers of enzymes or drugs: a new approach to the treatment of storage diseases. *Biochemical Journal*, 124(5), 58P. <https://doi.org/10.1042/bj1240058p>

Gross, C. P., & Sepkowitz, K. A. (1998). The myth of the medical breakthrough: Smallpox, vaccination, and Jenner reconsidered. *International Journal of Infectious Diseases*, 3(1), 54–60. [https://doi.org/10.1016/S1201-9712\(98\)90096-0](https://doi.org/10.1016/S1201-9712(98)90096-0)

Gunawardana, T., Foldvari, M., Zachar, T., Popowich, S., Chow-Lockerbie, B., Ivanova, M. V., Tikoo, S., Kurukulasuriya, S., Willson, P., & Gomis, S. (2015). Protection of Neonatal Broiler Chickens Following in ovo Delivery of

- Oligodeoxynucleotides Containing CpG Motifs (CpG-ODN) Formulated with Carbon Nanotubes or Liposomes . *Avian Diseases*, 59(1), 31–37. <https://doi.org/10.1637/10832-032814-reg>
- Gupta, U., & Perumal, O. (2014). Dendrimers and Its Biomedical Applications. En *Natural and Synthetic Biomedical Polymers* (pp. 243–257). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-396983-5.00016-8>
- Gutierrez, F. R. S., Mariano, F. S., Miranda-Santos, I. K. F., & Silva, J. S. (2007). Effector mechanisms of macrophages infected with *Trypanosoma cruzi*. En *Protozoans in Macrophages* (pp. 207–220). Landes Biosciences.
- Hagar, J. M., & Rahimtoola, S. H. (1991). Chagas' Heart Disease in the United States. *New England Journal of Medicine*, 325(11), 763–768. <https://doi.org/10.1056/NEJM199109123251103>
- Hallett, F. R., Watton, J., & Krygsman, P. (1991). Vesicle sizing: Number distributions by dynamic light scattering. *Biophysical Journal*, 59(2), 357–362. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(91\)82229-9](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(91)82229-9)
- Hanger, C., Dalrymple, J., & Hepburn, D. (2005). Systemic side effects from topical imiquimod. *The New Zealand medical journal*, 118(1223), U1682.
- Harris, F. M., Best, K. B., & Bell, J. D. (2002). Use of laurdan fluorescence intensity and polarization to distinguish between changes in membrane fluidity and phospholipid order. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, 1565(1), 123–128. [https://doi.org/10.1016/S0005-2736\(02\)00514-X](https://doi.org/10.1016/S0005-2736(02)00514-X)
- Haugarvoll, E., Bjerkås, I., Szabo, N. J., Satoh, M., & Koppang, E. O. (2010). Manifestations of systemic autoimmunity in vaccinated salmon. *Vaccine*, 28(31), 4961–4969. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2010.05.032>
- Hayer, A., Stoeber, M., Ritz, D., Engel, S., Meyer, H. H., & Helenius, A. (2010). Caveolin-1 is ubiquitinated and targeted to intraluminal vesicles in endolysosomes for degradation. *Journal of Cell Biology*, 191(3), 615–629. <https://doi.org/10.1083/jcb.201003086>

- Heikkinen, A. K., & Susitaival, P. (2011). Severe systemic reaction to topical imiquimod. En *Acta Dermato-Venereologica* (Vol. 91, Número 5, pp. 594–595). <https://doi.org/10.2340/00015555-1121>
- Hemmi, H., Kaisho, T., Takeuchi, O., Sato, S., Sanjo, H., Hoshino, K., Horiuchi, T., Tomizawa, H., Takeda, K., & Akira, S. (2002). Small-antiviral compounds activate immune cells via the TLR7 MyD88-dependent signaling pathway. *Nature Immunology*, 3(2), 196–200. <https://doi.org/10.1038/ni758>
- Hengge, U. R., & Ruzicka, T. (2004). Topical immunomodulation in dermatology: potential of toll-like receptor agonists. *Dermatologic Surgery*, 30(8), 1101–1112. <https://doi.org/10.1111/j.1524-4725.2004.30335.x>
- Henriksen-Lacey, M., Christensen, D., Bramwell, V. W., Lindenstrøm, T., Agger, E. M., Andersen, P., & Perrie, Y. (2010). Liposomal cationic charge and antigen adsorption are important properties for the efficient deposition of antigen at the injection site and ability of the vaccine to induce a CMI response. *Journal of Controlled Release*, 145(2), 102–108. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2010.03.027>
- Higa, L. H., Arnal, L., Vermeulen, M. E., Perez, A. P., Schilrreff, P., Mundiña-Weilenmann, C., Yantorno, O., Vela, M. E., Morilla, M. J., & Romero, E. L. (2016). Ultradeformable archaeosomes for needle free nanovaccination with leishmania braziliensis antigens. *PLoS ONE*, 11(3). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0150185>
- Higa, L. H., Corral, R. S., Morilla, M. J., Romero, E. L., & Petray, P. B. (2013). Archaeosomes display immunoadjuvant potential for a vaccine against Chagas disease. *Human Vaccines & Immunotherapeutics*, 9(2), 409–412. <https://doi.org/10.4161/hv.22780>
- Higa, L. H., Jerez, H., De Farias, M. A., Portugal, R. V., Romero, E. L., & Morilla, M. J. (2017). Ultra-small solid archaeolipid nanoparticles for active targeting to macrophages of the inflamed mucosa. *Nanomedicine*, 12(10), 1165–1175. <https://doi.org/10.2217/nnm-2016-0437>

- Higa, L. H., Schilrreff, P., Perez, A. P., Iriarte, M. A., Roncaglia, D. I., Morilla, M. J., & Romero, E. L. (2012). Ultradeformable archaeosomes as new topical adjuvants. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*, 8(8), 1319–1328. <https://doi.org/10.1016/j.nano.2012.02.008>
- Hill, E. K., & Li, J. (2017). Current and future prospects for nanotechnology in animal production. En *Journal of Animal Science and Biotechnology* (Vol. 8, Número 1). BioMed Central Ltd. <https://doi.org/10.1186/s40104-017-0157-5>
- Ho, D. D. (1998). Toward HIV eradication or remission: The tasks ahead. En *Science* (Vol. 280, Número 5371, pp. 1866–1867). American Association for the Advancement of Science. <https://doi.org/10.1126/science.280.5371.1866>
- Hoelzer, K., Bielke, L., Blake, D. P., Cox, E., Cutting, S. M., Devriendt, B., Erlacher-Vindel, E., Goossens, E., Karaca, K., Lemiere, S., Metzner, M., Raicek, M., Collell Suriñach, M., Wong, N. M., Gay, C., & Van Immerseel, F. (2018). Vaccines as alternatives to antibiotics for food producing animals. Part 1: Challenges and needs. En *Veterinary Research* (Vol. 49, Número 1). BioMed Central Ltd. <https://doi.org/10.1186/s13567-018-0560-8>
- Hoffman, W., Lakkis, F. G., & Chalasani, G. (2016). B cells, antibodies, and more. *Clinical Journal of the American Society of Nephrology*, 11(1), 137–154. <https://doi.org/10.2215/CJN.09430915>
- Holmgren, J., Czerkinsky, C., Eriksson, K., & Mharandi, A. (2003). Mucosal immunisation and adjuvants: A brief overview of recent advances and challenges. En *Vaccine* (Vol. 21, Número SUPPL. 2). Elsevier BV. [https://doi.org/10.1016/S0264-410X\(03\)00206-8](https://doi.org/10.1016/S0264-410X(03)00206-8)
- Homan, E. R., Zendzian, R. P., Schott, L. D., Levy, H. B., & Adamson, R. H. (1972). Studies on Poly I:C toxicity in experimental animals. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 23(4), 579–588. [https://doi.org/10.1016/0041-008X\(72\)90098-1](https://doi.org/10.1016/0041-008X(72)90098-1)
- Howard, K. A. (2016). *Nanomedicine: Working Towards Defining the Field* (pp. 1–12). Springer, New York, NY. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-3634-2_1
- Huang, D. B., Wu, J. J., & Tying, S. K. (2004). A review of licensed viral vaccines,

- some of their safety concerns, and the advances in the development of investigational viral vaccines. En *Journal of Infection* (Vol. 49, Número 3, pp. 179–209). W.B. Saunders Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.jinf.2004.05.018>
- Huang, T., Song, X., Jing, J., Zhao, K., Shen, Y., Zhang, X., & Yue, B. (2018). Chitosan-DNA nanoparticles enhanced the immunogenicity of multivalent DNA vaccination on mice against *Trueperella pyogenes* infection. *Journal of Nanobiotechnology*, 16(1), 8. <https://doi.org/10.1186/s12951-018-0337-2>
- Hübschle, T., Mütze, J., Mühlradt, P. F., Korte, S., Gerstberger, R., & Roth, J. (2006). Pyrexia, anorexia, adipsia, and depressed motor activity in rats during systemic inflammation induced by the Toll-like receptors-2 and -6 agonists MALP-2 and FSL-1. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 290(1), R180–R187. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00579.2005>
- Hug, L. A., Baker, B. J., Anantharaman, K., Brown, C. T., Probst, A. J., Castelle, C. J., Butterfield, C. N., Hernsdorf, A. W., Amano, Y., Ise, K., Suzuki, Y., Dudek, N., Relman, D. A., Finstad, K. M., Amundson, R., Thomas, B. C., & Banfield, J. F. (2016). A new view of the tree of life. *Nature Microbiology*, 1(5). <https://doi.org/10.1038/nmicrobiol.2016.48>
- Hughes, D. A., Fraser, I. P., & Gordon, S. (1995). Murine macrophage scavenger receptor: in vivo expression and function as receptor for macrophage adhesion in lymphoid and non-lymphoid organs. *European Journal of Immunology*, 25(2), 466–473. <https://doi.org/10.1002/eji.1830250224>
- Humphrey, T., & Jørgensen, F. (2006). Pathogens on meat and infection in animals - Establishing a relationship using campylobacter and salmonella as examples. En *Meat Science* (Vol. 74, Número 1, pp. 89–97). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2006.04.026>
- Hunter, R. J., Midmore, B. R., & Zhang, H. (2001). Zeta potential of highly charged thin double-layer systems. *Journal of Colloid and Interface Science*, 237(1), 147–149. <https://doi.org/10.1006/jcis.2001.7423>

- Hurwitz, D. J., Pincus, L., & Kupper, T. S. (2003). Imiquimod: a topically applied link between innate and acquired immunity. *Archives of Dermatology*, 139(10), 1347–1350. <https://doi.org/10.1001/archderm.139.10.1347>
- Hussain, M. J., Wilkinson, A., Bramwell, V. W., Christensen, D., & Perrie, Y. (2014). Th1 immune responses can be modulated by varying dimethyldioctadecylammonium and distearoyl-sn-glycero-3-phosphocholine content in liposomal adjuvants. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 66(3), 358–366. <https://doi.org/10.1111/jphp.12173>
- Igietseme, J. U., Eko, F. O., He, Q., & Black, C. M. (2004). Antibody regulation of T-cell immunity: Implications for vaccine strategies against intracellular pathogens. En *Expert Review of Vaccines* (Vol. 3, Número 1, pp. 23–34). Taylor & Francis. <https://doi.org/10.1586/14760584.3.1.23>
- Ilg, T. (2017). Investigations on the molecular mode of action of the novel immunostimulator ZelNate: Activation of the cGAS-STING pathway in mammalian cells. *Molecular Immunology*, 90, 182–189. <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2017.07.013>
- Ilg, T. (2020). The immunostimulator Victrio activates chicken toll-like receptor 21. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 220, 109977. <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2019.109977>
- Immordino, M. L., Dosio, F., & Cattel, L. (2006). Stealth liposomes: Review of the basic science, rationale, and clinical applications, existing and potential. En *International Journal of Nanomedicine* (Vol. 1, Número 3, pp. 297–315). Dove Press. <https://doi.org/10.2217/17435889.1.3.297>
- Islam, N., Dmour, I., & Taha, M. O. (2019). Degradability of chitosan micro/nanoparticles for pulmonary drug delivery. En *Heliyon* (Vol. 5, Número 5). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2019.e01684>
- Israelachvili, J. N., Marcelja, S., Horn, R. G., & Israelachvili, J. N. (1980). Physical principles of membrane organization. *Quarterly Reviews of Biophysics*, 13(2), 121–200. <https://doi.org/10.1017/S0033583500001645>

- Iversen, T. G., Skotland, T., & Sandvig, K. (2011). Endocytosis and intracellular transport of nanoparticles: Present knowledge and need for future studies. En *Nano Today* (Vol. 6, Número 2, pp. 176–185). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/j.nantod.2011.02.003>
- Ivester, K. M., Couëtil, L. L., & Moore, G. E. (2018). An observational study of environmental exposures, airway cytology, and performance in racing thoroughbreds. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 32(5), 1754–1762. <https://doi.org/10.1111/jvim.15226>
- Iwasaki, A., & Medzhitov, R. (2010). Regulation of adaptive immunity by the innate immune system. En *Science* (Vol. 327, Número 5963, pp. 291–295). American Association for the Advancement of Science. <https://doi.org/10.1126/science.1183021>
- Jäger, A., & Kuchroo, V. K. (2010). Effector and regulatory T-cell subsets in autoimmunity and tissue inflammation. En *Scandinavian Journal of Immunology* (Vol. 72, Número 3, pp. 173–184). Blackwell Publishing Ltd. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3083.2010.02432.x>
- Jain, K. K. (2017). The handbook of nanomedicine, third edition. En *The Handbook of Nanomedicine, Third Edition*. Springer New York. <https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6966-1>
- Jain, N. K., Mishra, V., & Mehra, N. K. (2013). Targeted drug delivery to macrophages. En *Expert Opinion on Drug Delivery* (Vol. 10, Número 3, pp. 353–367). Taylor & Francis. <https://doi.org/10.1517/17425247.2013.751370>
- Jain, S., Caforio, A., & Driessen, A. J. M. (2014). Biosynthesis of archaeal membrane ether lipids. En *Frontiers in Microbiology* (Vol. 5, Número NOV). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00641>
- Janeway, C. A., & Medzhitov, R. (2002). Innate Immune Recognition. *Annual Review of Immunology*, 20(1), 197–216. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.20.083001.084359>
- Ji, J., Merino, S., Tomás, J. M., & Roher, N. (2019). Nanoliposomes encapsulating

immunostimulants modulate the innate immune system and elicit protection in zebrafish larvae. *Fish and Shellfish Immunology*, 92, 421–429. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2019.06.016>

Jiménez-Dalmaroni, M. J., Gerswhin, M. E., & Adamopoulos, I. E. (2016). The critical role of toll-like receptors - From microbial recognition to autoimmunity: A comprehensive review. En *Autoimmunity Reviews* (Vol. 15, Número 1, pp. 1–8). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.autrev.2015.08.009>

Johannes, C. M. (2019). New Veterinary Oncology Therapeutics. *American Veterinarian*, 4(1), 16–18. <https://www.americanveterinarian.com/journals/amvet/2019/january2019/new-veterinary-oncology-therapeutics>

Jonas, O. B., Irwin, A., Berthe, F. C. J., Le Gall, F. G., & Marquez, P. V. (2017). *Drug-resistant infections: a threat to our economic future* (Nº 2). <http://documents.worldbank.org/curated/en/323311493396993758/final-report>

Junghanns, J.-U. A. H., & Müller, R. (2008). Nanocrystal technology, drug delivery and clinical applications. *International Journal of Nanomedicine*, 3(3), 295. <https://doi.org/10.2147/ijn.s595>

Jurk, M., Heil, F., Vollmer, J., Schetter, C., Krieg, A. M., Wagner, H., Lipford, G., & Bauer, S. (2002). Human TLR7 or TLR8 independently confer responsiveness to the antiviral compound R-848. *Nature Immunology*, 3(6), 499. <https://doi.org/10.1038/ni0602-499>

Kaisho, T., & Akira, S. (2006). Toll-like receptor function and signaling. En *Journal of Allergy and Clinical Immunology* (Vol. 117, Número 5, pp. 979–987). J Allergy Clin Immunol. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2006.02.023>

Kak, V., Sundareshan, V., Modi, J., & Khardori, N. M. (2012). Immunotherapies in Infectious Diseases. En *Medical Clinics of North America* (Vol. 96, Número 3, pp. 455–474). Med Clin North Am. <https://doi.org/10.1016/j.mcna.2012.04.002>

Kalish, R. S., & Askenase, P. W. (1999). Molecular mechanisms of CD8+T cell-mediated delayed hypersensitivity: Implications for allergies, asthma, and

autoimmunity. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 103(2 II), 192–199.
[https://doi.org/10.1016/s0091-6749\(99\)70489-6](https://doi.org/10.1016/s0091-6749(99)70489-6)

Kallerup, R. S., & Foged, C. (2015). *Classification of Vaccines* (pp. 15–29). Springer, New York, NY. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-1417-3_2

Kanzler, H., Barrat, F. J., Hessel, E. M., & Coffman, R. L. (2007). Therapeutic targeting of innate immunity with Toll-like receptor agonists and antagonists. En *Nature Medicine* (Vol. 13, Número 5, pp. 552–559). Nat Med. <https://doi.org/10.1038/nm1589>

Karch, C. P., Li, J., Kulangara, C., Paulillo, S. M., Raman, S. K., Emadi, S., Tan, A., Helal, Z. H., Fan, Q., Khan, M. I., & Burkhard, P. (2017). Vaccination with self-adjuvanted protein nanoparticles provides protection against lethal influenza challenge. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*, 13(1), 241–251. <https://doi.org/10.1016/j.nano.2016.08.030>

Kates, M. (1993). Biology of halophilic bacteria, Part II - Membrane lipids of extreme halophiles: biosynthesis, function and evolutionary significance. En *Experientia* (Vol. 49, Número 12, pp. 1027–1036). Birkhäuser-Verlag. <https://doi.org/10.1007/BF01929909>

Kates, M., & Kushwaha, S. C. (1995). Isoprenoids and polar lipids of extreme halophiles. En *Archaea, a laboratory manual. Halophiles*. (pp. 35–54). Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Katz, J. M., Veguilla, V., Belser, J. A., Maines, T. R., van Hoeven, N., Pappas, C., Hancock, K., & Tumpey, T. M. (2009). The public health impact of avian influenza viruses. *Poultry Science*, 88(4), 872–879. <https://doi.org/10.3382/ps.2008-00465>

Kaur, G., Garg, T., Rath, G., & Goyal, A. K. (2015). Archaeosomes: an excellent carrier for drug and cell delivery. *Drug Delivery*, 23(7), 1–16. <https://doi.org/10.3109/10717544.2015.1019653>

Kavaliuskis, A., Arnemo, M., Speth, M., Lagos, L., Rishovd, A. L., Estepa, A., Griffiths, G., & Gjøen, T. (2016). Protective effect of a recombinant VHSV-G

vaccine using poly(l: C) loaded nanoparticles as an adjuvant in zebrafish (*Danio rerio*) infection model. *Developmental and Comparative Immunology*, 61, 248–257. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2016.04.010>

Kawai, T., & Akira, S. (2010). The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: Update on toll-like receptors. En *Nature Immunology* (Vol. 11, Número 5, pp. 373–384). Nat Immunol. <https://doi.org/10.1038/ni.1863>

Kawasaki, T., & Kawai, T. (2014). Toll-like receptor signaling pathways. En *Frontiers in Immunology* (Vol. 5, Número SEP). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2014.00461>

Kellermann, M. (2012). *Lipid biomolecules reveal patterns of microbial metabolism in extreme environments* [Universität Bremen (Germany)]. <http://elib.suub.uni-bremen.de/edocs/00102577-1.pdf>

Kennedy, M. A. (2010). A Brief Review of the Basics of Immunology: The Innate and Adaptive Response. En *Veterinary Clinics of North America - Small Animal Practice* (Vol. 40, Número 3, pp. 369–379). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/j.cvsm.2010.01.003>

Kierszenbaum, F. (2007). Mechanisms of pathogenesis in Chagas disease. En *Acta Parasitologica* (Vol. 52, Número 1, pp. 1–12). Versita. <https://doi.org/10.2478/s11686-006-0048-y>

Kim, B. Y. S., Rutka, J. T., & Chan, W. C. W. (2010). Current concepts: Nanomedicine. En *New England Journal of Medicine* (Vol. 363, Número 25, pp. 2434–2443). Massachussetts Medical Society. <https://doi.org/10.1056/NEJMra0912273>

Kitano, T., Onoue, T., & Yamauchi, K. (2003). Archaeal lipids forming a low energy-surface on air-water interface. *Chemistry and Physics of Lipids*, 126(2), 225–232. <https://doi.org/10.1016/j.chemphyslip.2003.08.006>

Kitikoon, P., Nilubol, D., Erickson, B. J., Janke, B. H., Hoover, T. C., Sornsen, S. A., & Thacker, E. L. (2006). The immune response and maternal antibody interference to a heterologous H1N1 swine influenza virus infection following

- vaccination. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 112(3–4), 117–128. <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2006.02.008>
- Klier, J., Fuchs, S., May, A., Schillinger, U., Plank, C., Winter, G., Gehlen, H., & Coester, C. (2012). A nebulized gelatin nanoparticle-based CpG formulation is effective in immunotherapy of allergic horses. *Pharmaceutical Research*, 29(6), 1650–1657. <https://doi.org/10.1007/s11095-012-0686-8>
- Klier, J., Lehmann, B., Fuchs, S., Reese, S., Hirschmann, A., Coester, C., Winter, G., & Gehlen, H. (2015). Nanoparticulate CpG Immunotherapy in RAO-Affected Horses: Phase I and IIa Study. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 29(1), 286–293. <https://doi.org/10.1111/jvim.12524>
- Klier, John, Bartl, C., Geuder, S., Geh, K. J., Reese, S., Goehring, L. S., Winter, G., & Gehlen, H. (2019). Immunomodulatory asthma therapy in the equine animal model: A dose-response study and evaluation of a long-term effect. *Immunity Inflammation and Disease*, 7(3), 130–149. <https://doi.org/10.1002/iid3.252>
- Klier, John, Geis, S., Steuer, J., Geh, K., Reese, S., Fuchs, S., Mueller, R. S., Winter, G., & Gehlen, H. (2018). A comparison of nanoparticulate CpG immunotherapy with and without allergens in spontaneously equine asthma-affected horses, an animal model: *Immunity Inflammation and Disease*, 6(1), 81–96. <https://doi.org/10.1002/iid3.198>
- Klingemann, H. (2018). Immunotherapy for Dogs: Running Behind Humans. *Frontiers in Immunology*, 9(FEB), 133. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.00133>
- Knorr, C., Hübschle, T., Murgott, J., Mühlradt, P., Gerstberger, R., & Roth, J. (2008). Macrophage-activating lipopeptide-2 (MALP-2) induces a localized inflammatory response in rats resulting in activation of brain sites implicated in fever. *Brain Research*, 1205, 36–46. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2008.02.021>
- Knorr, C., Marks, D., Gerstberger, R., Mühlradt, P. F., Roth, J., & Rummel, C. (2010). Peripheral and central cyclooxygenase (COX) products may contribute to the

- manifestation of brain-controlled sickness responses during localized inflammation induced by macrophage-activating lipopeptide-2 (MALP-2). *Neuroscience Letters*, 479(2), 107–111. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2010.05.036>
- Kong, B., Seog, J. H., Graham, L. M., & Lee, S. B. (2011). Experimental considerations on the cytotoxicity of nanoparticles. En *Nanomedicine* (Vol. 6, Número 5, pp. 929–941). Future Medicine Ltd London, UK . <https://doi.org/10.2217/nnm.11.77>
- Korsholm, K. S., Hansen, J., Karlsen, K., Filskov, J., Mikkelsen, M., Lindenstrøm, T., Schmidt, S. T., Andersen, P., & Christensen, D. (2014). Induction of CD8+ T-cell responses against subunit antigens by the novel cationic liposomal CAF09 adjuvant. *Vaccine*, 32(31), 3927–3935. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2014.05.050>
- Korsmeyer, R. (2016). Critical questions in development of targeted nanoparticle therapeutics. *Regenerative Biomaterials*, 3(2), 143–147. <https://doi.org/10.1093/rb/rbw011>
- Kou, L., Sun, J., Zhai, Y., & He, Z. (2013). The endocytosis and intracellular fate of nanomedicines: Implication for rational design. *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 8(1), 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.ajps.2013.07.001>
- Krishnan, L., & Sprott, G. D. (2003). Archaeosomes as self-adjuvanting delivery systems for cancer vaccines. *Journal of Drug Targeting*, 11(8–10), 515–524. <https://doi.org/10.1080/10611860410001670044>
- Krishnan, Lakshmi, Sad, S., Patel, G. B., & Sprott, G. D. (2001). The Potent Adjuvant Activity of Archaeosomes Correlates to the Recruitment and Activation of Macrophages and Dendritic Cells In Vivo. *The Journal of Immunology*, 166(3), 1885–1893. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.166.3.1885>
- Krishnan, Lakshmi, & Sprott, G. D. (2008). Archaeosome adjuvants: Immunological capabilities and mechanism(s) of action. En *Vaccine* (Vol. 26, Número 17, pp. 2043–2055). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2008.02.026>

- Kunjachan, S., Pola, R., Gremse, F., Theek, B., Ehling, J., Moeckel, D., Hermanns-Sachweh, B., Pechar, M., Ulbrich, K., Hennink, W. E., Storm, G., Lederle, W., Kiessling, F., & Lammers, T. (2014). Passive versus active tumor targeting using RGD- and NGR-modified polymeric nanomedicines. *Nano Letters*, *14*(2), 972–981. <https://doi.org/10.1021/nl404391r>
- Kunsel, T., & Sumant, O. (2019). *Animal Vaccines Market by Product Type (Attenuated Vaccines, Inactivated Vaccines, Subunit Vaccines, Toxoid Vaccines, Conjugate Vaccines, Recombinant Vaccines, and DNA Vaccines) and Animal Type (Companion animals, Cattle, Fish, Pigs, Poultry, and Sheep)*: <https://www.alliedmarketresearch.com/animal-vaccines-market>
- Lacarrubba, F., Nasca, M. R., & Micali, G. (2008). Advances in the use of topical imiquimod to treat dermatologic disorders. En *Therapeutics and Clinical Risk Management* (Vol. 4, Número 1, pp. 87–97). <https://doi.org/10.2147/tcrm.s1109>
- Laguens, R. P., Cossio, P. M., Diez, C., Segal, A., Vasquez, C., Kreutzer, E., Khoury, E., & Arana, R. M. (1975). Immunopathologic and morphologic studies of skeletal muscle in Chagas' disease. *The American journal of pathology*, *80*(1), 153–162. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/125546>
- Lammers, T., Kiessling, F., Hennink, W. E., & Storm, G. (2012). Drug targeting to tumors: Principles, pitfalls and (pre-) clinical progress. En *Journal of Controlled Release* (Vol. 161, Número 2, pp. 175–187). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2011.09.063>
- Landesman-Milo, D., & Peer, D. (2016). Transforming Nanomedicines from Lab Scale Production to Novel Clinical Modality. En *Bioconjugate Chemistry* (Vol. 27, Número 4, pp. 855–862). American Chemical Society. <https://doi.org/10.1021/acs.bioconjchem.5b00607>
- Laplumé, H., Barousse, A. P., & Cabrera, H. (1982). Undesirable effects of nifurtimox and benznidazole. *Medicina*, *42*(2), 223.
- Le-flay, A. (2017). *The future of veterinary vaccines*. <https://www.healtheuropa.eu/the-future-of-veterinary-vaccines/82155/>

- Lee, C. K., Soike, K., Hill, J., Georgakopoulos, K., Tibbitts, T., Ingrassia, J., Gray, H., Boden, J., Kleanthous, H., Giannasca, P., Ermak, T., Weltzin, R., Blanchard, J., & Monath, T. P. (1999). Immunization with recombinant *Helicobacter pylori* urease decreases colonization levels following experimental infection of rhesus monkeys. *Vaccine*, 17(11–12), 1493–1505. [https://doi.org/10.1016/S0264-410X\(98\)00365-X](https://doi.org/10.1016/S0264-410X(98)00365-X)
- Lee, J. H., Huh, Y. M., Jun, Y. W., Seo, J. W., Jang, J. T., Song, H. T., Kim, S., Cho, E. J., Yoon, H. G., Suh, J. S., & Cheon, J. (2007). Artificially engineered magnetic nanoparticles for ultra-sensitive molecular imaging. *Nature Medicine*, 13(1), 95–99. <https://doi.org/10.1038/nm1467>
- Lee, S. K., Chon, J. W., Song, K. Y., Hyeon, J. Y., Moon, J. S., & Seo, K. H. (2013). Prevalence, characterization, and antimicrobial susceptibility of *Salmonella Gallinarum* isolated from eggs produced in conventional or organic farms in South Korea. *Poultry Science*, 92(10), 2789–2797. <https://doi.org/10.3382/ps.2013-03175>
- Lesterhuis, W. J., Haanen, J. B. A. G., & Punt, C. J. A. (2011). Cancer immunotherapy-revisited. En *Nature Reviews Drug Discovery* (Vol. 10, Número 8, pp. 591–600). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/nrd3500>
- Leung, A. K. C. (2011). “Variolation” and Vaccination in Late Imperial China, Ca 1570–1911. En *History of Vaccine Development* (pp. 5–12). Springer New York. https://doi.org/10.1007/978-1-4419-1339-5_2
- Levy, R. M., Mollen, K. P., Prince, J. M., Kaczorowski, D. J., Vallabhaneni, R., Liu, S., Tracey, K. J., Lotze, M. T., Hackam, D. J., Fink, M. P., Vodovotz, Y., & Billiar, T. R. (2007). Systemic inflammation and remote organ injury following trauma require HMGB1. *American Journal of Physiology - Regulatory Integrative and Comparative Physiology*, 293(4). <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00272.2007>
- Lewis, M. D., Fortes Francisco, A., Taylor, M. C., Burrell-Saward, H., Mclatchie, A. P., Miles, M. A., & Kelly, J. M. (2014). Bioluminescence imaging of chronic *Trypanosoma cruzi* infections reveals tissue-specific parasite dynamics and

- heart disease in the absence of locally persistent infection. *Cellular Microbiology*, 16(9), 1285–1300. <https://doi.org/10.1111/cmi.12297>
- Li, J., Helal, Z. H., Karch, C. P., Mishra, N., Girshick, T., Garmendia, A., Burkhard, P., & Khan, M. I. (2018). A self-adjuvanted nanoparticle based vaccine against infectious bronchitis virus. *PLoS ONE*, 13(9), e0203771. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0203771>
- Li, Z., Ding, S., & Li, Y. (2019). Study on the immunity protection of 14-3-3-MPLA-liposome vaccine against cystic echinococcosis in mice. *Frontiers in Laboratory Medicine*. <https://doi.org/10.1016/j.flm.2019.05.002>
- Lim, J. P., & Gleeson, P. A. (2011). Macropinocytosis: An endocytic pathway for internalising large gulps. En *Immunology and Cell Biology* (Vol. 89, Número 8, pp. 836–843). John Wiley & Sons, Ltd. <https://doi.org/10.1038/icb.2011.20>
- Lin, Y., Slight, S. R., & Khader, S. A. (2010). Th17 cytokines and vaccine-induced immunity. En *Seminars in Immunopathology* (Vol. 32, Número 1, pp. 79–90). Springer. <https://doi.org/10.1007/s00281-009-0191-2>
- Liu, X. Y., Yang, Q., Kamo, N., & Miyake, J. (2001). Effect of liposome type and membrane fluidity on drug-membrane partitioning analyzed by immobilized liposome chromatography. *Journal of chromatography. A*, 913(1–2), 123–131. [https://doi.org/10.1016/s0021-9673\(00\)01266-8](https://doi.org/10.1016/s0021-9673(00)01266-8)
- Lizama, C., Monteoliva-Sánchez, M., Suárez-García, A., Roselló-Mora, R., Aguilera, M., Campos, V., & Ramos-Cormenzana, A. (2002). Halorubrum tebenquichense sp. nov., a novel halophilic archaeon isolated from the Atacama Saltern, Chile. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 52(1), 149–155. <https://doi.org/10.1099/00207713-52-1-149>
- Lopez, P. A., Denny, M., Hartmann, A. K., Alflen, A., Probst, H. C., von Stebut, E., Tenzer, S., Schild, H., Stassen, M., Langguth, P., & Radsak, M. P. (2017). Transcutaneous immunization with a novel imiquimod nanoemulsion induces superior T cell responses and virus protection. *Journal of Dermatological Science*, 87(3), 252–259. <https://doi.org/10.1016/j.jdermsci.2017.06.012>

- Loré, K., Betts, M. R., Brenchley, J. M., Kuruppu, J., Khojasteh, S., Perfetto, S., Roederer, M., Seder, R. A., & Koup, R. A. (2003). Toll-Like Receptor Ligands Modulate Dendritic Cells to Augment Cytomegalovirus- and HIV-1-Specific T Cell Responses. *The Journal of Immunology*, 171(8), 4320–4328. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.171.8.4320>
- Lowenthal, J. W., Johnson, M. A., Tyack, S. G., Hilton, L. S., & Bean, A. G. D. (2005). Oral delivery of novel therapeutics: development of a fowl adenovirus vector expressing chicken IL-2 and MGF. *World's Poultry Science Journal*, 61(1), 87–94. <https://doi.org/10.1079/wps200444>
- Lu, R., Groer, C., Kleindl, P. A., Moulder, K. R., Huang, A., Hunt, J. R., Cai, S., Aires, D. J., Berkland, C., & Forrest, M. L. (2019). Formulation and preclinical evaluation of a toll-like receptor 7/8 agonist as an anti-tumoral immunomodulator. *Journal of Controlled Release*, 306, 165–176. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2019.06.003>
- Luo, Y., & Dorf, M. E. (2001). Delayed-Type Hypersensitivity. En *Current Protocols in Immunology* (Vol. 55, Número 1, pp. 4.5.1-4.5.5). John Wiley & Sons, Inc. <https://doi.org/10.1002/0471142735.im0405s55>
- Lycke, N. (2012). Recent progress in mucosal vaccine development: Potential and limitations. En *Nature Reviews Immunology* (Vol. 12, Número 8, pp. 592–605). Nat Rev Immunol. <https://doi.org/10.1038/nri3251>
- Lynn, G. M., Laga, R., Darrah, P. A., Ishizuka, A. S., Balaci, A. J., Dulcey, A. E., Pechar, M., Pola, R., Gerner, M. Y., Yamamoto, A., Buechler, C. R., Quinn, K. M., Smelkinson, M. G., Vanek, O., Cawood, R., Hills, T., Vasalatiy, O., Kastenmüller, K., Francica, J. R., ... Seder, R. A. (2015). In vivo characterization of the physicochemical properties of polymer-linked TLR agonists that enhance vaccine immunogenicity. *Nature Biotechnology*, 33(11), 1201–1210. <https://doi.org/10.1038/nbt.3371>
- Lyons, A. B., & Parish, C. R. (1994). Determination of lymphocyte division by flow cytometry. *Journal of Immunological Methods*, 171(1), 131–137.

[https://doi.org/10.1016/0022-1759\(94\)90236-4](https://doi.org/10.1016/0022-1759(94)90236-4)

Mac Cheever, M. A. (2008). Twelve immunotherapy drugs that could cure cancers. En *Immunological Reviews* (Vol. 222, Número 1, pp. 357–368). Immunol Rev. <https://doi.org/10.1111/j.1600-065X.2008.00604.x>

Machado, F. S., Tanowitz, H. B., & Teixeira, M. M. (2010). New drugs for neglected infectious diseases: Chagas' disease. *British Journal of Pharmacology*, 160(2), 258–259. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2010.00662.x>

Major, R. H. (1954). *A history of medicine*. Charles C. Thomas.

Malik, K., Singh, I., Nagpal, M., & Arora, S. (2010). Atrigel: A potential parenteral controlled drug delivery system. *Der Pharmacia Sinica*, 1(1), 74–81. www.pelagiaresearchlibrary.com

Mann, J. F. S., Shakir, E., Carter, K. C., Mullen, A. B., Alexander, J., & Ferro, V. A. (2009). Lipid vesicle size of an oral influenza vaccine delivery vehicle influences the Th1/Th2 bias in the immune response and protection against infection. *Vaccine*, 27(27), 3643–3649. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2009.03.040>

Mansour, M., Brown, R. G., Morris, A., Smith, B., & Halperin, S. A. (2007). Improved efficacy of a licensed acellular pertussis vaccine, reformulated in an adjuvant emulsion of liposomes in oil, in a murine model. *Clinical and Vaccine Immunology*, 14(10), 1381–1383. <https://doi.org/10.1128/CVI.00143-07>

Mansour, M., Pohajdak, B., Kast, W. M., Fuentes-Ortega, A., Korets-Smith, E., Weir, G. M., Brown, R. G., & Daftarian, P. (2007). Therapy of established B16-F10 melanoma tumors by a single vaccination of CTL/T helper peptides in VacciMax®. *Journal of Translational Medicine*, 5. <https://doi.org/10.1186/1479-5876-5-20>

Marin-Neto, Jose A., & Rassi Jr., A. (2009). Update on Chagas Heart Disease on the First Centennial of Its Discovery. *Revista Española de Cardiología (English Edition)*, 62(11), 1211–1216. [https://doi.org/10.1016/s1885-5857\(09\)73346-8](https://doi.org/10.1016/s1885-5857(09)73346-8)

Marin-Neto, Jose Antonio, Cunha-Neto, E., Maciel, B. C., & Simões, M. V. (2007).

- Pathogenesis of chronic Chagas heart disease. *Circulation*, 115(9), 1109–1123.
<https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.106.624296>
- Martins, K. A. O., Bavari, S., & Salazar, A. M. (2015). Vaccine adjuvant uses of poly-IC and derivatives. En *Expert Review of Vaccines* (Vol. 14, Número 3, pp. 447–459). Expert Reviews Ltd. <https://doi.org/10.1586/14760584.2015.966085>
- Mathai, J. C., Sprott, G. D., & Zeidel, M. L. (2001). Molecular Mechanisms of Water and Solute Transport across Archaeobacterial Lipid Membranes. *Journal of Biological Chemistry*, 276(29), 27266–27271.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M103265200>
- Mazzeti, A. L., Diniz, L. de F., Gonçalves, K. R., Nascimento, A. F. S., Spósito, P. A. F., Mosqueira, V. C. F., Machado-Coelho, G. L. L., Ribeiro, I., & Bahia, M. T. (2018). Time and dose-dependence evaluation of nitroheterocyclic drugs for improving efficacy following *Trypanosoma cruzi* infection: A pre-clinical study. *Biochemical Pharmacology*, 148, 213–221.
<https://doi.org/10.1016/j.bcp.2018.01.005>
- Mbow, M. L., De Gregorio, E., Valiante, N. M., & Rappuoli, R. (2010). New adjuvants for human vaccines. En *Current Opinion in Immunology* (Vol. 22, Número 3, pp. 411–416). Elsevier Current Trends. <https://doi.org/10.1016/j.coi.2010.04.004>
- McAleer, W. J., Buynak, E. B., Maigetter, R. Z., Wampler, D. E., Miller, W. J., & Hilleman, M. R. (1984). Human hepatitis B vaccine from recombinant yeast. *Nature*, 307(5947), 178–180. <https://doi.org/10.1038/307178a0>
- McVey, S., & Shi, J. (2010). Vaccines in Veterinary Medicine: A Brief Review of History and Technology. En *Veterinary Clinics of North America - Small Animal Practice* (Vol. 40, Número 3, pp. 381–392). <https://doi.org/10.1016/j.cvsm.2010.02.001>
- Medeiros, G. A., Silvério, J. C., Marino, A. P. M. P., Roffê, E., Vieira, V., Kroll-Palhares, K., Carvalho, C. E., Silva, A. A., Teixeira, M. M., & Lannes-Vieira, J. (2009). Treatment of chronically *Trypanosoma cruzi*-infected mice with a CCR1/CCR5 antagonist (Met-RANTES) results in amelioration of cardiac tissue

- damage. *Microbes and Infection*, 11(2), 264–273.
<https://doi.org/10.1016/j.micinf.2008.11.012>
- Medzhitov, R., & Janeway, C. A. (1998). Innate immune recognition and control of adaptive immune responses. *Seminars in Immunology*, 10(5), 351–353.
<https://doi.org/10.1006/smim.1998.0136>
- Medzhitov, R., Preston-Hurlburt, P., & Janeway, C. A. (1997). A human homologue of the *Drosophila* toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature*, 388(6640), 394–397. <https://doi.org/10.1038/41131>
- Meeusen, E. N. T., Walker, J., Peters, A., Pastoret, P. P., & Jungersen, G. (2007). Current status of veterinary vaccines. *Clinical Microbiology Reviews*, 20(3), 489–510. <https://doi.org/10.1128/CMR.00005-07>
- Mellman, I., Coukos, G., & Dranoff, G. (2011). Cancer immunotherapy comes of age. En *Nature* (Vol. 480, Número 7378, pp. 480–489). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/nature10673>
- Meyer, T., Nindl, I., Schmook, T., Ulrich, C., Sterry, W., & Stockfleth, E. (2003). Induction of apoptosis by Toll-like receptor-7 agonist in tissue cultures. *British Journal of Dermatology, Supplement*, 149(66), 9–13.
<https://doi.org/10.1046/j.0366-077x.2003.05632.x>
- Meylan, E., Tschopp, J., & Karin, M. (2006). Intracellular pattern recognition receptors in the host response. En *Nature* (Vol. 442, Número 7098, pp. 39–44). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/nature04946>
- Middleton, J. R., Luby, C. D., & Adams, D. S. (2009). Efficacy of vaccination against staphylococcal mastitis: A review and new data. *Veterinary Microbiology*, 134(1–2), 192–198. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2008.09.053>
- Mifsud, E. J., Tan, A. C. L., & Jackson, D. C. (2014). TLR agonists as modulators of the innate immune response and their potential as agents against infectious disease. En *Frontiers in Immunology* (Vol. 5, Número MAR, p. 79). Frontiers Research Foundation. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2014.00079>

- Milei, J., Guerri-Guttenberg, R. A., Grana, D. R., & Storino, R. (2009). Prognostic impact of Chagas disease in the United States. En *American Heart Journal* (Vol. 157, Número 1, pp. 22–29). Mosby. <https://doi.org/10.1016/j.ahj.2008.08.024>
- Miranda-Verastegui, C., Llanos-Cuentas, A., Arevalo, I., Ward, B. J., & Matlashewski, G. (2005). Randomized, Double-Blind Clinical Trial of Topical Imiquimod 5% with Parenteral Meglumine Antimoniate in the Treatment of Cutaneous Leishmaniasis in Peru. *Clinical Infectious Diseases*, 40(10), 1395–1403. <https://doi.org/10.1086/429238>
- Mirkin, G. A., Celentano, A. M., Malchiodi, E. L., Jones, M., & González Cappa, S. M. (1997). Different *Trypanosoma cruzi* strains promote neuromyopathic damage mediated by distinct T lymphocyte subsets. *Clinical and Experimental Immunology*, 107(2), 328–334. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2249.1997.267-ce1166.x>
- Mitelman, J., Gonzalo, N., Sosa, F., Burgos, F. N., Mordini, O., Beloscar, J., Gimenez, L., Reyes, A., Marconcini, G., Manzur, R., & Juri, J. C. (2006). Chagas y sociedad. La atención de la enfermedad. *Revista de la Federación Argentina de Cardiología*, 35(2), 83–87.
- Mohammed, M. A., Syeda, J. T. M., Wasan, K. M., & Wasan, E. K. (2017). An overview of chitosan nanoparticles and its application in non-parenteral drug delivery. En *Pharmaceutics* (Vol. 9, Número 4). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics9040053>
- Mordini, O. D., Enrique Bavio, J. B., Tognoni, G., Sosa, F. J., Reyes, O., Pairone, E., Lacunza, D., Manzur, R., Redondo, M., Hernández, D., Mujica, H., & Olavegogeoescoscochea, P. (2016). Enfermedad de chagas en argentina. “Registro Nacional de enfermedad de Chagas de la Federación Argentina de Cardiología”. Estudio RENECH. *Rev. Fed. Arg. Cardiol.*, 45(2), 84–92.
- Morilla, María J., & Romero, E. L. (2011). Liposomal pH-Sensitive Nanomedicines in Preclinical Development. En D. E. Reisner (Ed.), *Bionanotechnology II* (pp. 402–433). CRC Press. <https://doi.org/10.1201/b11374>

- Morilla, María José, & Romero, E. L. (2016). Carrier Deformability in Drug Delivery. *Current Pharmaceutical Design*, 22(9), 1118–1136.
- Morillo, C. A., Marin-Neto, J. A., Avezum, A., Sosa-Estani, S., Rassi, A., Rosas, F., Villena, E., Quiroz, R., Bonilla, R., Britto, C., Guhl, F., Velazquez, E., Bonilla, L., Meeks, B., Rao-Melacini, P., Pogue, J., Mattos, A., Lazdins, J., Rassi, A., ... Yusuf, S. (2015). Randomized trial of benznidazole for chronic chagas' cardiomyopathy. *New England Journal of Medicine*, 373(14), 1295–1306. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1507574>
- Mosmann, T. R., & Coffman, R. L. (1989). TH1 and TH2 Cells: Different Patterns of Lymphokine Secretion Lead to Different Functional Properties. *Annual Review of Immunology*, 7(1), 145–173. <https://doi.org/10.1146/annurev.iy.07.040189.001045>
- Mukhopadhyay, S., & Gordon, S. (2004). The role of scavenger receptors in pathogen recognition and innate immunity. *Immunobiology*, 209(1–2), 39–49. <https://doi.org/10.1016/j.imbio.2004.02.004>
- Mukhopadhyay, S., Varin, A., Chen, Y., Liu, B., Tryggvason, K., & Gordon, S. (2011). SR-A/MARCO-mediated ligand delivery enhances intracellular TLR and NLR function, but ligand scavenging from cell surface limits TLR4 response to pathogens. *Blood*, 117(4), 1319–1328. <https://doi.org/10.1182/blood-2010-03-276733>
- Muñoz, C., Solari, A., Apt, W., & Zulantay, I. (2013). Caracterización de las Unidades Discretas de Tipificación de Trypanosoma cruzi según sus marcadores moleculares. *Rev. Ibero-Latinoam. Parasitol.*, 72(1), 5–21.
- Murphy, C. J., & Coffey, J. L. (2002). Quantum Dots: A Primer. *Applied Spectroscopy*, Vol. 56, Issue 1, pp. 16A-27A, 56(1), 16A-27A.
- Murphy, K., & Weavear, C. (2017). *Janeway's Immunobiology* (9th ed.). Garland Science, Taylor & Francis Group.
- Muscia, G. C., Roldán Pacheco, F. J., Asís, S. E., Buldain, G. Y., & Frank, F. M. (2019). Hit-to-lead optimization of novel 2-alkylaminomethylquinoline

- derivatives as anti-chagas agents. *European Journal of Medicinal Chemistry*.
<https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2019.111877>
- Naito, M., Kodama, T., Matsumoto, A., Doi, T., & Takahashi, K. (1991). Tissue distribution, intracellular localization, and in vitro expression of bovine macrophage scavenger receptors. *The American journal of pathology*, 139(6), 1411–1423. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1750511>
- Naito, M., Suzuki, H., Mori, T., Matsumoto, A., Kodama, T., & Takahashi, K. (1992). Coexpression of type I and type II human macrophage scavenger receptors in macrophages of various organs and foam cells in atherosclerotic lesions. *American Journal of Pathology*, 141(3), 591–599.
- Nandedkar, T. D. (2009). Nanovaccines: Recent developments in vaccination. En *Journal of Biosciences* (Vol. 34, Número 6, pp. 995–1003). Springer.
<https://doi.org/10.1007/s12038-009-0114-3>
- Narayan, R., Nayak, U., Raichur, A., & Garg, S. (2018). Mesoporous Silica Nanoparticles: A Comprehensive Review on Synthesis and Recent Advances. *Pharmaceutics*, 10(3), 118. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics10030118>
- Natarajan, K., Dimasi, N., Wang, J., Mariuzza, R. A., & Margulies, D. H. (2002). Structure and Function of Natural Killer Cell Receptors: Multiple Molecular Solutions to Self, Nonself Discrimination . *Annual Review of Immunology*, 20(1), 853–885. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.20.100301.064812>
- National Cancer Institute. (2019). *Immunotherapy to Treat Cancer*.
<https://www.cancer.gov/about-cancer/treatment/types/immunotherapy>
- National Cancer Institute - National Institutes of Health (NIH) - U.S. Government. (s. f.). *NCI Dictionary of Cancer Terms*. NCI Dictionaries; National Institutes of Health (NIH) - US Government. Recuperado 30 de marzo de 2020, de <https://www.cancer.gov/publications/dictionaries/cancer-terms>
- Navi, D., & Huntley, A. (2004). Imiquimod 5 percent cream and the treatment of cutaneous malignancy. *Dermatology Online Journal*, 10(1).
<https://escholarship.org/uc/item/4vw339w4>

- Ndao, M., Beaulieu, C., Black, W. C., Isabel, E., Vasquez-Camargo, F., Nath-Chowdhury, M., Massé, F., Mellon, C., Methot, N., & Nicoll-Griffith, D. A. (2014). Reversible cysteine protease inhibitors show promise for a chagas disease cure. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 58(2), 1167–1178. <https://doi.org/10.1128/AAC.01855-13>
- Neal-McKinney, J. M., Samuelson, D. R., Eucker, T. P., Nissen, M. S., Crespo, R., & Konkel, M. E. (2014). Reducing campylobacter jejuni colonization of poultry via vaccination. *PLoS ONE*, 9(12). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0114254>
- Nichols, K. L., Bauman, S. K., Schafer, F. B., & Murphy, J. W. (2002). Differences in components at delayed-type hypersensitivity reaction sites in mice immunized with either a protective or a nonprotective immunogen of *Cryptococcus neoformans*. *Infection and Immunity*, 70(2), 591–600. <https://doi.org/10.1128/IAI.70.2.591-600.2002>
- Nickell, J., Dvm, D., Keil, Dvm, T., Settje, Lechtenberg, K., Dvm, V., Singu, V., Woolums, A., Dacvm, Healthcare, B., Health, A., & Ks. (2016). Efficacy and safety of a novel DNA immunostimulant in cattle. *The Bovine Practitioner*, 50, 10–20.
- Nishiya, T., Kajita, E., Miwa, S., & DeFranco, A. L. (2005). TLR3 and TLR7 are targeted to the same intracellular compartments by distinct regulatory elements. *Journal of Biological Chemistry*, 280(44), 37107–37117. <https://doi.org/10.1074/jbc.M504951200>
- Nogueira, E., Gomes, A. C., Preto, A., & Cavaco-Paulo, A. (2015). Design of liposomal formulations for cell targeting. En *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* (Vol. 136, pp. 514–526). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2015.09.034>
- O'Garra, A., McEvoy, L. M., & Zlotnik, A. (1998). T-cell subsets: Chemokine receptors guide the way. *Current Biology*, 8(18), R646–R649. [https://doi.org/10.1016/s0960-9822\(07\)00413-7](https://doi.org/10.1016/s0960-9822(07)00413-7)

- O'Garra, A., & Murphy, K. (1994). Role of cytokines in determining T-lymphocyte function. *Current Opinion in Immunology*, 6(3), 458–466. [https://doi.org/10.1016/0952-7915\(94\)90128-7](https://doi.org/10.1016/0952-7915(94)90128-7)
- O'Hagan, D. T., MacKichan, M. L., & Singh, M. (2001). Recent developments in adjuvants for vaccines against infectious diseases. En *Biomolecular Engineering* (Vol. 18, Número 3, pp. 69–85). Elsevier. [https://doi.org/10.1016/S1389-0344\(01\)00101-0](https://doi.org/10.1016/S1389-0344(01)00101-0)
- Oosting, M., Cheng, S. C., Bolscher, J. M., Vestering-Stenger, R., Plantinga, T. S., Verschueren, I. C., Arts, P., Garritsen, A., Van Eenennaam, H., Sturm, P., Kullberg, B. J., Hoischen, A., Adema, G. J., Van Der Meer, J. W. M., Netea, M. G., & Joosten, L. A. B. (2014). Human TLR10 is an anti-inflammatory pattern-recognition receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 111(42), E4478–E4484. <https://doi.org/10.1073/pnas.1410293111>
- Oren, A. (1994). The ecology of the extremely halophilic archaea. *FEMS Microbiology Reviews*, 13(4), 415–439. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.1994.tb00060.x>
- Organización Mundial de la Salud. (2013). *Plan de Acción Mundial sobre Vacunas 2011* - 2020. https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/85398/9789243504988_spa.pdf;jsessionid=C6CDC77B5AC7ECC980A642A7965AA1F7?sequence=1
- Organización Mundial de la Salud. (2019). *La enfermedad de Chagas (trypanosomiasis americana)*. [https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/chagas-disease-\(american-trypanosomiasis\)](https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/chagas-disease-(american-trypanosomiasis))
- Ostrowsky, N. (1993). Liposome size measurements by photon correlation spectroscopy. *Chemistry and Physics of Lipids*, 64(1–3), 45–56. [https://doi.org/10.1016/0009-3084\(93\)90057-A](https://doi.org/10.1016/0009-3084(93)90057-A)
- Othoro, C., Johnston, D., Lee, R., Soverow, J., Bystry, J. C., & Nardin, E. (2009). Enhanced immunogenicity of plasmodium falciparum peptide vaccines using a

topical adjuvant containing a potent synthetic toll-like receptor 7 agonist, imiquimod. *Infection and Immunity*, 77(2), 739–748. <https://doi.org/10.1128/IAI.00974-08>

Oussoren, C., & Storm, G. (2001). Liposomes to target the lymphatics by subcutaneous administration. En *Advanced Drug Delivery Reviews* (Vol. 50, Números 1–2, pp. 143–156). [https://doi.org/10.1016/S0169-409X\(01\)00154-5](https://doi.org/10.1016/S0169-409X(01)00154-5)

Overly, C. C., Lee, K. D., Berthiaume, E., & Hollenbeck, P. J. (1995). Quantitative measurement of intraorganelle pH in the endosomal-lysosomal pathway in neurons by using ratiometric imaging with pyranine. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 92(8), 3156–3160. <https://doi.org/10.1073/pnas.92.8.3156>

Oxford Vaccine Group. (2019). *Vaccine ingredients*. Vaccine Knowledge Project. <https://vk.ovg.ox.ac.uk/vk/vaccine-ingredients>

Palucka, K., Banchereau, J., & Mellman, I. (2010). Designing vaccines based on biology of human dendritic cell subsets. En *Immunity* (Vol. 33, Número 4, pp. 464–478). Cell Press. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2010.10.007>

Pandey, S., Kawai, T., & Akira, S. (2015). Microbial sensing by toll-like receptors and intracellular nucleic acid sensors. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 7(1), a016246. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a016246>

Panter, G., Kuznik, A., & Jerala, R. (2009). Therapeutic applications of nucleic acids as ligands for Toll-like receptors. *Current Opinion in Molecular Therapeutics*, 11(2), 133–145.

Papadavid, E., Stratigos, A. J., & Falagas, M. E. (2007). Imiquimod: An immune response modifier in the treatment of precancerous skin lesions and skin cancer. *Expert Opinion on Pharmacotherapy*, 8(11), 1743–1755. <https://doi.org/10.1517/14656566.8.11.1743>

Papahadjopoulos, D., & Kimelberg, H. K. (1974). Phospholipid vesicles (liposomes) as models for biological membranes: Their properties and interactions with cholesterol and proteins. En *Progress in Surface Science* (Vol. 4, Número C,

pp. 141–232). Pergamon. [https://doi.org/10.1016/S0079-6816\(74\)80006-7](https://doi.org/10.1016/S0079-6816(74)80006-7)

Pasick, J., Berhane, Y., & Hooper-McGrevy, K. (2009). Avian influenza: The canadian experience. *OIE Revue Scientifique et Technique*, 28(1), 349–358. <https://doi.org/10.20506/rst.28.1.1875>

Pasquale, A., Preiss, S., Silva, F., & Garçon, N. (2015). Vaccine Adjuvants: from 1920 to 2015 and Beyond. *Vaccines*, 3(2), 320–343. <https://doi.org/10.3390/vaccines3020320>

Pasquali, R. C., Chiappetta, D. A., & Bregni, C. (2005). Los Copolímeros en Bloques Anfífilicos y sus Aplicaciones Farmacéuticas. *Acta Farmacéutica Bonaerense*, 24(4), 610–618.

Pasteur, L. (1880). De l'atténuation du virus du choléra des poules. *Comptes rendus de l'Academie des sciences*, 91, 673–680.

Pasteur, L. (1885). Méthode pour prévenir la rage après morsure. *Comptes Rendus de l'Academie des Sciences*, 101, 765–772.

Pasteur, L., Chamberland, C., & Roux, E. (1881). Le vaccin du charbon. *Comptes rendus de l'Academie des sciences*, 92, 666–668.

Pastoret, P. P. (1999). Veterinary vaccinology. *Comptes Rendus de l'Academie des Sciences - Serie III*, 322(11), 967–972. [https://doi.org/10.1016/S0764-4469\(00\)87194-2](https://doi.org/10.1016/S0764-4469(00)87194-2)

Patel, G. B., Agnew, B. J., Deschatelets, L., Fleming, L. P., & Sprott, G. D. (2000). In vitro assessment of archaeosome stability for developing oral delivery systems. *International Journal of Pharmaceutics*, 194(1), 39–49. [https://doi.org/10.1016/S0378-5173\(99\)00331-2](https://doi.org/10.1016/S0378-5173(99)00331-2)

Patel, G. B., Omri, A., Deschatelets, L., & Sprott, G. D. (2002). Safety of archaeosome adjuvants evaluated in a mouse model. *Journal of Liposome Research*, 12(4), 353–372. <https://doi.org/10.1081/LPR-120016712>

Patel, G. B., Zhou, H., Ponce, A., & Chen, W. (2007). Mucosal and systemic immune responses by intranasal immunization using archaeal lipid-adjuvanted vaccines.

Vaccine, 25(51), 8622–8636. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2007.09.042>

Pattni, B. S., Chupin, V. V., & Torchilin, V. P. (2015). New Developments in Liposomal Drug Delivery. En *Chemical Reviews* (Vol. 115, Número 19, pp. 10938–10966). American Chemical Society. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.5b00046>

Peek, L. J., Middaugh, C. R., & Berkland, C. (2008). Nanotechnology in vaccine delivery. En *Advanced Drug Delivery Reviews* (Vol. 60, Número 8, pp. 915–928). Adv Drug Deliv Rev. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2007.05.017>

Penitente, A. R., Leite, A. L. J., Costa, G. D. P., Shrestha, D., Horta, A. L., Natali, A. J., Neves, C. A., & Talvani, A. (2015). Enalapril in combination with benznidazole reduces cardiac inflammation and creatine kinases in mice chronically infected with trypanosoma cruzi. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 93(5), 976–982. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.15-0237>

Petray, P. B., Rottenberg, M. E., Grinstein, S., & Örn, A. (1994). Release of nitric oxide during the experimental infection with Trypanosoma cruzi. *Parasite Immunology*, 16(4), 193–199. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3024.1994.tb00340.x>

Petrovski, K. R., Trajcev, M., & Buneski, G. (2006). A review of the factors affecting the costs of bovine mastitis. En *Journal of the South African Veterinary Association* (Vol. 77, Número 2, pp. 52–60). AOSIS (pty) Ltd. <https://doi.org/10.4102/jsava.v77i2.344>

Petrovsky, N., & Aguilar, J. C. (2004). Vaccine adjuvants: Current state and future trends. *Immunology and Cell Biology*, 82(5), 488–496. <https://doi.org/10.1111/j.0818-9641.2004.01272.x>

Plotkin, S. (2014). History of vaccination. En *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* (Vol. 111, Número 34, pp. 12283–12287). National Academy of Sciences. <https://doi.org/10.1073/pnas.1400472111>

Plotkin, S. A. (2002). Vaccines in the 21st Century. *Hybridoma and Hybridomics*,

21(2), 135–145. <https://doi.org/10.1089/153685902317401744>

- Plotkin, S. A., Orenstein, W., & Offit, P. A. (2012). *Vaccines* (6th ed.). Elsevier Inc.
- Plüddemann, A., Neyen, C., & Gordon, S. (2007). Macrophage scavenger receptors and host-derived ligands. *Methods*, 43(3), 207–217. <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2007.06.004>
- Postma, M., Stärk, K. D. C., Sjölund, M., Backhans, A., Beilage, E. G., Lösken, S., Belloc, C., Collineau, L., Iten, D., Visschers, V., Nielsen, E. O., & Dewulf, J. (2015). Alternatives to the use of antimicrobial agents in pig production: A multi-country expert-ranking of perceived effectiveness, feasibility and return on investment. *Preventive Veterinary Medicine*, 118(4), 457–466. <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2015.01.010>
- PrabhuDas, M., Bowdish, D., Drickamer, K., Febbraio, M., Herz, J., Kobzik, L., Krieger, M., Loike, J., Means, T. K., Moestrup, S. K., Post, S., Sawamura, T., Silverstein, S., Wang, X.-Y., & El Khoury, J. (2014). Standardizing Scavenger Receptor Nomenclature. *The Journal of Immunology*, 192(5), 1997–2006. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1490003>
- Pradere, J. P., Dapito, D. H., & Schwabe, R. F. (2014). The Yin and Yang of Toll-like receptors in cancer. En *Oncogene* (Vol. 33, Número 27, pp. 3485–3495). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/onc.2013.302>
- Prata, A. (2001). Clinical and epidemiological aspects of Chagas disease. En *Lancet Infectious Diseases* (Vol. 1, Número 2, pp. 92–100). Elsevier. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(01\)00065-2](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(01)00065-2)
- Prins, R. M., Craft, N., Bruhn, K. W., Khan-Farooqi, H., Koya, R. C., Stripecke, R., Miller, J. F., & Liao, L. M. (2006). The TLR-7 Agonist, Imiquimod, Enhances Dendritic Cell Survival and Promotes Tumor Antigen-Specific T Cell Priming: Relation to Central Nervous System Antitumor Immunity. *The Journal of Immunology*, 176(1), 157–164. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.176.1.157>
- Raffel, S. (1948). The Components of the Tubercle Bacillus Responsible for the Delayed Type of “Infectious” Allergy. *The Journal of Infectious Diseases*, 82(3),

267–293. <https://doi.org/10.1093/infdis/82.3.267>

- Rajao, M. A., Furtado, C., Alves, C. L., Passos-Silva, D. G., de Moura, M. B., Schamber-Reis, B. L., Kunrath-Lima, M., Zuma, A. A., Vieira-da-Rocha, J. P., Ferreira Garcia, J. B., Franco, G. R., Mendes, C. I., Junho Pena, S. D., Macedo, A. M., Franco, G. R., de Souza-Pinto, N. C., Gennari de Medeiros, M. H., Cruz, A. K., Machado Motta, M. C., ... Machado, C. R. (2014). Unveiling Benznidazole's Mechanism of Action Through Overexpression of DNA Repair Proteins in *Trypanosoma cruzi*. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 55, 309–321. <https://doi.org/10.1002/em.21839>
- Raman, S. K., Machaidze, G., Lustig, A., Aebi, U., & Burkhard, P. (2006). Structure-based design of peptides that self-assemble into regular polyhedral nanoparticles. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*, 2(2), 95–102. <https://doi.org/10.1016/j.nano.2006.04.007>
- Rambe, D. S., Del Giudice, G., Rossi, S., & Sanicas, M. (2015). Safety and Mechanism of Action of Licensed Vaccine Adjuvants. *International Current Pharmaceutical Journal*, 4(8), 420–431. <https://doi.org/10.3329/icpj.v4i8.24024>
- Ramon, G. (1925). Sur l'augmentation anormale de l'antitoxine chez les chevaux producteurs de serum antidiphtherique. *Bull. Soc. Centr. Med. Vet.*, 101, 227–234.
- Ramon, G. (1926). Procedes pour accroître la production des antitoxins. *Ann. Inst. Pasteur*, 40, 1–10.
- Rappuoli, R. (2007). Bridging the knowledge gaps in vaccine design. En *Nature Biotechnology* (Vol. 25, Número 12, pp. 1361–1366). <https://doi.org/10.1038/nbt1207-1361>
- Rassi Jr., A., Rassi, A., & Marcondes de Rezende, J. (2012). American Trypanosomiasis (Chagas Disease). *Infectious Disease Clinics of North America*, 26(2), 275–291. <https://doi.org/10.1016/j.idc.2012.03.002>
- Rassi Jr., A., Rassi, A., & Marin-Neto, J. A. (2009). Chagas heart disease: Pathophysiologic mechanisms, prognostic factors and risk stratification.

- Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, 104(SUPPL. 1), 152–158.
<https://doi.org/10.1590/s0074-02762009000900021>
- Rassi Jr., A., Rassi, A., & Marin-Neto, J. A. (2010). Chagas disease. *The Lancet*, 375(9723), 1388–1402. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(10\)60061-X](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(10)60061-X)
- Rechtsteiner, G., Warger, T., Osterloh, P., Schild, H., & Radsak, M. P. (2005). Cutting Edge: Priming of CTL by Transcutaneous Peptide Immunization with Imiquimod. *The Journal of Immunology*, 174(5), 2476–2480.
<https://doi.org/10.4049/jimmunol.174.5.2476>
- Reed, S. G., Bertholet, S., Coler, R. N., & Friede, M. (2009). New horizons in adjuvants for vaccine development. En *Trends in Immunology* (Vol. 30, Número 1, pp. 23–32). Elsevier Current Trends. <https://doi.org/10.1016/j.it.2008.09.006>
- Regan, D., Guth, A., Coy, J., & Dow, S. (2016). Cancer immunotherapy in veterinary medicine: Current options and new developments. En *Veterinary Journal* (Vol. 207, pp. 20–28). Bailliere Tindall Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2015.10.008>
- Reidel, I. G., Camussone, C., Suarez Archilla, G. A., Calvinho, L. F., & Veaute, C. (2019). Liposomal and CpG-ODN formulation elicits strong humoral immune responses to recombinant *Staphylococcus aureus* antigens in heifer calves. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 212, 1–8.
<https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2019.04.011>
- Renu, S., Markazi, A. D., Dhakal, S., Lakshmanappa, Y. S., Gourapura, S. R., Shanmugasundaram, R., Senapati, S., Narasimhan, B., Selvaraj, R. K., & Renukaradhya, G. J. (2018). Surface engineered polyanhydride-based oral *Salmonella* subunit nanovaccine for poultry. *International Journal of Nanomedicine*, 13, 8195–8215. <https://doi.org/10.2147/IJN.S185588>
- Renu, S., Markazi, A. D., Dhakal, S., Lakshmanappa, Y. S., Shanmugasundaram, R., Selvaraj, R. K., & Renukaradhya, G. J. (2020). Oral Deliverable Mucoadhesive Chitosan-Salmonella Subunit Nanovaccine for Layer Chickens. *International Journal of Nanomedicine*, 15, 761–777.
<https://doi.org/10.2147/IJN.S238445>

- Research And Markets. (2017). *Global Animal Healthcare Market Size, Market Share, Application Analysis, Regional Outlook, Growth Trends, Key Players, Competitive Strategies and Forecasts, 2017 to 2025*. <https://www.researchandmarkets.com/reports/4431942/global-animal-healthcare-market-size-market>
- Rezvantab, S., & Keshavarz Moraveji, M. (2019). Microfluidic assisted synthesis of PLGA drug delivery systems. En *RSC Advances* (Vol. 9, Número 4, pp. 2055–2072). Royal Society of Chemistry. <https://doi.org/10.1039/C8RA08972H>
- Riedel, S. (2005). Edward Jenner and the History of Smallpox and Vaccination. *Baylor University Medical Center Proceedings*, 18(1), 21–25. <https://doi.org/10.1080/08998280.2005.11928028>
- Rigoni, A., Colombo, M. P., & Pucillo, C. (2018). Mast cells, basophils and eosinophils: From allergy to cancer. En *Seminars in Immunology* (Vol. 35, pp. 29–34). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/j.smim.2018.02.001>
- Riitho, V., Walters, A. A., Somavarapu, S., Lamp, B., Rümenapf, T., Krey, T., Rey, F. A., Oviedo-Orta, E., Stewart, G. R., Locker, N., Steinbach, F., & Graham, S. P. (2017). Design and evaluation of the immunogenicity and efficacy of a biomimetic particulate formulation of viral antigens. *Scientific Reports*, 7(1), 13743. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-13915-x>
- Robinson, H. L., & Amara, R. R. (2005). T cell vaccines for microbial infections. *Nature Medicine*, 11(4S), S25. <https://doi.org/10.1038/nm1212>
- Rock, F. L., Hardiman, G., Timans, J. C., Kastelein, R. A., & Bazan, J. F. (1998). A family of human receptors structurally related to Drosophila Toll. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95(2), 588–593. <https://doi.org/10.1073/pnas.95.2.588>
- Róg, T., Vattulainen, I., Bunker, A., & Karttunen, M. (2007). Glycolipid membranes through atomistic simulations: Effect of glucose and galactose head groups on lipid bilayer properties. *Journal of Physical Chemistry B*, 111(34), 10146–10154. <https://doi.org/10.1021/jp0730895>

- Romagnani, S. (1994). Regulation of the development of type 2 T-helper cells in allergy. *Current Opinion in Immunology*, 6(6), 838–846. [https://doi.org/10.1016/0952-7915\(94\)90002-7](https://doi.org/10.1016/0952-7915(94)90002-7)
- Romero, E. L., & Morilla, M. J. (2011). Topical and mucosal liposomes for vaccine delivery. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Nanomedicine and Nanobiotechnology*, 3(4), 356–375. <https://doi.org/10.1002/wnan.131>
- Rosi, N. L., & Mirkin, C. A. (2005). Nanostructures in biodiagnostics. En *Chemical Reviews* (Vol. 105, Número 4, pp. 1547–1562). American Chemical Society . <https://doi.org/10.1021/cr030067f>
- Ross, G., Hübschle, T., Pehl, U., Braun, H. A., Voigt, K., Gerstberger, R., & Roth, J. (2003). Fever induction by localized subcutaneous inflammation in guinea pigs: The role of cytokines and prostaglandins. *Journal of Applied Physiology*, 94(4), 1395–1402. <https://doi.org/10.1152/japplphysiol.00485.2002>
- Ruggiero, M. A., Gordon, D. P., Orrell, T. M., Bailly, N., Bourgoin, T., Brusca, R. C., Cavalier-Smith, T., Guiry, M. D., & Kirk, P. M. (2015). Correction: A higher level classification of all living organisms. En *PLoS ONE* (Vol. 10, Número 6). Public Library of Science. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0130114>
- Rummel, C., Hübschle, T., Gerstberger, R., & Roth, J. (2004). Nuclear translocation of the transcription factor STAT3 in the guinea pig brain during systemic or localized inflammation. *Journal of Physiology*, 557(2), 671–687. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2003.058834>
- Ruozi, B., Belletti, D., Tombesi, A., Tosi, G., Bondioli, L., Forni, F., & Vandelli, M. A. (2011). AFM, ESEM, TEM, and CLSM in liposomal characterization: a comparative study. *International journal of nanomedicine*, 6, 557–563. <https://doi.org/10.2147/ijn.s14615>
- Ruyra, A., Cano-Sarabia, M., García-Valtanan, P., Yero, D., Gibert, I., Mackenzie, S. A., Estepa, A., MasPOCH, D., & Roher, N. (2014). Targeting and stimulation of the zebrafish (*Danio rerio*) innate immune system with LPS/dsRNA-loaded nanoliposomes. *Vaccine*, 32(31), 3955–3962.

<https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2014.05.010>

- Ryu, J., & Yang, F. C. (2009). A Review of Topical Imiquimod in the Management of Basal Cell Carcinoma, Actinic Keratoses, and Other Skin Lesions. *Clinical Medicine. Therapeutics*, 1, CMT.S1969. <https://doi.org/10.4137/cmt.s1969>
- Sabino, E. C., Ribeiro, A. L., Lee, T. H., Oliveira, C. L., Carneiro-Proietti, A. B., Antunes, A. P., Menezes, M. M., Ianni, B. M., Salemi, V. M., Nastari, L., Fernandes, F., Sachdev, V., Carrick, D. M., Deng, X., Wright, D., Gonçalves, T. T., Murphy, E. L., Custer, B., & Busch, M. P. (2015). Detection of *Trypanosoma cruzi* DNA in blood by PCR is associated with Chagas cardiomyopathy and disease severity. *European Journal of Heart Failure*, 17(4), 416–423. <https://doi.org/10.1002/ejhf.220>
- Sahay, G., Alakhova, D. Y., & Kabanov, A. V. (2010). Endocytosis of nanomedicines. En *Journal of Controlled Release* (Vol. 145, Número 3, pp. 182–195). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2010.01.036>
- Sakaguchi, S., Miyara, M., Costantino, C. M., & Hafler, D. A. (2010). FOXP3 + regulatory T cells in the human immune system. En *Nature Reviews Immunology* (Vol. 10, Número 7, pp. 490–500). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/nri2785>
- Saldana, J. I. (2019). *Interferones de tipo I*. Inmunología en un mordisco; Sociedad Británica de Inmunología. <http://inmunologia.eu/receptores-y-moleculas/interferones-de-tipo>
- Salk, J. E., Ulrich Krech, F. A. P. H. A. ;, Youngner, J. S., Major, S. D. ;, Bennett, B. L., Lewis, L. J., & Bazeley, P. L. (1954). Formaldehyde Treatment and Safety Testing of Experimental Poliomyelitis Vaccines. En *Public Health Association, Inc* (Vol. 44).
- Salmon, D. E., & Smith, T. (1886a). On a new method of producing immunity from contagious diseases. *Am Vet Rev*, 10, 63–69.
- Salmon, D. E., & Smith, T. (1886b). The bacterium of swine plague. *Am Month Mic J*, 7, 204.

- Santos, A. C., Roberts, J. A., Cook, A. J. C., Simons, R., Sheehan, R., Lane, C., Adak, G. K., Clifton-Hadley, F. A., & Rodrigues, L. C. (2011). Salmonella Typhimurium and Salmonella Enteritidis in England: Costs to patients, their families, and primary and community health services of the NHS. *Epidemiology and Infection*, 139(5), 742–753. <https://doi.org/10.1017/S0950268810001615>
- Santos Vidal, S. (2017). *Tinción Hematoxilina-Eosina* [Universidad Nacional de Educación a Distancia (España)]. <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0>
- Saravanan, P., Sreenivasa, B. P., Selvan, R. P. T., Basagoudanavar, S. H., Hosamani, M., Reddy, N. D., Nathanielsz, J., Derozier, C., & Venkataramanan, R. (2015). Protective immune response to liposome adjuvanted high potency foot-and-mouth disease vaccine in Indian cattle. *Vaccine*, 33(5), 670–677. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2014.12.008>
- Saridomichelakis, M. N., & Olivry, T. (2016). An update on the treatment of canine atopic dermatitis. En *Veterinary Journal* (Vol. 207, pp. 29–37). Bailliere Tindall Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2015.09.016>
- Schaefer, L. (2014). Complexity of danger: The diverse nature of damage-associated molecular patterns. En *Journal of Biological Chemistry* (Vol. 289, Número 51, pp. 35237–35245). American Society for Biochemistry and Molecular Biology Inc. <https://doi.org/10.1074/jbc.R114.619304>
- Schenten, D., & Medzhitov, R. (2011). The Control of Adaptive Immune Responses by the Innate Immune System. En *Advances in Immunology* (Vol. 109, pp. 87–124). Academic Press Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-387664-5.00003-0>
- Schijns, V. E. J. C., & Lavelle, E. C. (2011). Trends in vaccine adjuvants. En *Expert Review of Vaccines* (Vol. 10, Número 4, pp. 539–550). Taylor & Francis. <https://doi.org/10.1586/erv.11.21>
- Schmidt, C. S., Morrow, W. J. W., & Sheikh, N. A. (2007). Smart adjuvants. En *Expert Review of Vaccines* (Vol. 6, Número 3, pp. 391–400). Expert Rev Vaccines.

<https://doi.org/10.1586/14760584.6.3.391>

- Schön, M., Bong, A. B., Drewniok, C., Herz, J., Geilen, C. C., Reifenberger, J., Benninghoff, B., Slade, H. B., Gollnick, H., & Schön, M. P. (2003). Tumor-Selective Induction of Apoptosis and the Small-Molecule Immune Response Modifier Imiquimod. *JNCI: Journal of the National Cancer Institute*, 95(15), 1138–1149. <https://doi.org/10.1093/jnci/djg016>
- Schön, M.P., & Schön, M. (2007). Imiquimod: mode of action. *British Journal of Dermatology*, 157(SUPPL. 2), 8–13. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2133.2007.08265.x>
- Schön, Michael P., Schön, M., & Klotz, K. N. (2006). The small antitumoral immune response modifier imiquimod interacts with adenosine receptor signaling in a TLR7- and TLR8-independent fashion. *Journal of Investigative Dermatology*, 126(6), 1338–1347. <https://doi.org/10.1038/sj.jid.5700286>
- Schön, Michael P., Wienrich, B. G., Drewniok, C., Bong, A. B., Eberle, J., Geilen, C. C., Gollnick, H., & Schön, M. (2004). Death receptor-independent apoptosis in malignant melanoma induced by the small-molecule immune response modifier imiquimod. *Journal of Investigative Dermatology*, 122(5), 1266–1276. <https://doi.org/10.1111/j.0022-202X.2004.22528.x>
- Schukken, Y. H., Bronzo, V., Locatelli, C., Pollera, C., Rota, N., Casula, A., Testa, F., Scaccabarozzi, L., March, R., Zalduendo, D., Guix, R., & Moroni, P. (2014). Efficacy of vaccination on *Staphylococcus aureus* and coagulase-negative staphylococci intramammary infection dynamics in 2 dairy herds. *Journal of Dairy Science*, 97(8), 5250–5264. <https://doi.org/10.3168/jds.2014-8008>
- Schwendener, R. A. (2014). Liposomes as vaccine delivery systems: a review of the recent advances. *Therapeutic advances in vaccines*, 2(6), 159–182. <https://doi.org/10.1177/2051013614541440>
- Scita, G., & Di Fiore, P. P. (2010). The endocytic matrix. En *Nature* (Vol. 463, Número 7280, pp. 464–473). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/nature08910>

SEPPIC. (2017). *MONTANIDE™ ISA 763 A VG*.

Sercombe, L., Veerati, T., Moheimani, F., Wu, S. Y., Sood, A. K., & Hua, S. (2015). Advances and challenges of liposome assisted drug delivery. En *Frontiers in Pharmacology* (Vol. 6, Número DEC, p. 286). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fphar.2015.00286>

Sessa, G., & Weissmann, G. (1968). Phospholipid spherules (liposomes) as a model for biological membranes. *Journal of Lipid Research*, 9(3), 310–318.

Seya, T., Matsumoto, M., Ebihara, T., & Oshiumi, H. (2009). Functional evolution of the TICAM-1 pathway for extrinsic RNA sensing. En *Immunological Reviews* (Vol. 227, Número 1, pp. 44–53). Immunol Rev. <https://doi.org/10.1111/j.1600-065X.2008.00723.x>

Seya, T., Takeda, Y., & Matsumoto, M. (2019). A Toll-like receptor 3 (TLR3) agonist ARNAX for therapeutic immunotherapy. En *Advanced Drug Delivery Reviews* (Vol. 147, pp. 37–43). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2019.07.008>

Sgambatti De Andrade, A. L. S., Zicker, F., De Oliveira, R. M., Almeida E Silva, S., Luquetti, A., Travassos, L. R., Almeida, I. C., De Andrade, S. S., Guimarães De Andrade, J., & Martelli, C. M. T. (1996). Randomised trial of efficacy of benznidazole in treatment of early *Trypanosoma cruzi* infection. *Lancet*, 348(9039), 1407–1413. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(96\)04128-1](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(96)04128-1)

Shackleton, M., Davis, I. D., Hopkins, W., Jackson, H., Dimopoulos, N., Tai, T., Chen, Q., Parente, P., Jefford, M., Masterman, K.-A., Caron, D., Chen, W., Maraskovsky, E., & Cebon, J. (2004). The impact of imiquimod, a Toll-like receptor-7 ligand (TLR7L), on the immunogenicity of melanoma peptide vaccination with adjuvant Flt3 ligand. *Cancer Immunity*, 4, 9.

Shamsi Meymandi, S., Javadi, A., Dabiri, S., Shamsi Meymandi, M., & Nadji, M. (2011). Comparative histological and immunohistochemical changes of dry type cutaneous leishmaniasis after administration of meglumine antimoniate, imiquimod or combination therapy. *Archives of Iranian Medicine*, 14(4), 238–243. <https://doi.org/0011144/AIM.003>

- Sher, A., & Coffman, R. L. (1992). Regulation of Immunity to Parasites by T Cells and T Cell-Derived Cytokines. *Annual Review of Immunology*, 10(1), 385–409. <https://doi.org/10.1146/annurev.iy.10.040192.002125>
- Sidbury, R., Neuschler, N., Neuschler, E., Sun, P., Wang, X. Q., Miller, R., Tomai, M., Puscasiu, E., Gugneja, S., & Paller, A. S. (2003). Topically Applied Imiquimod Inhibits Vascular Tumor Growth In Vivo. *Journal of Investigative Dermatology*, 121(5), 1205–1209. <https://doi.org/10.1046/j.1523-1747.2003.12521.x>
- Sims, K. R., MacEren, J. P., Strand, A. I., He, B., Overby, C., & Benoit, D. S. W. (2020). Rigor and reproducibility in polymer nanoparticle synthesis and characterization. *RSC Advances*, 10(5), 2513–2518. <https://doi.org/10.1039/c9ra10091a>
- Singh, M., & O'Hagan, D. T. (2002). Recent advances in vaccine adjuvants. En *Pharmaceutical Research* (Vol. 19, Número 6, pp. 715–728). Kluwer Academic/Plenum Publishers. <https://doi.org/10.1023/A:1016104910582>
- Singh, M., & O'Hagan, D. T. (2003). Recent advances in veterinary vaccine adjuvants. En *International Journal for Parasitology* (Vol. 33, Números 5–6, pp. 469–478). Elsevier Ltd. [https://doi.org/10.1016/S0020-7519\(03\)00053-5](https://doi.org/10.1016/S0020-7519(03)00053-5)
- Singh, S. M., Alkie, T. N., Abdelaziz, K. T., Hodgins, D. C., Novy, A., Nagy, É., & Sharif, S. (2016). Characterization of Immune Responses to an Inactivated Avian Influenza Virus Vaccine Adjuvanted with Nanoparticles Containing CpG ODN. *Viral Immunology*, 29(5), 269–275. <https://doi.org/10.1089/vim.2015.0144>
- Singh, S. M., Alkie, T. N., Nagy, É., Kulkarni, R. R., Hodgins, D. C., & Sharif, S. (2016). Delivery of an inactivated avian influenza virus vaccine adjuvanted with poly(D,L-lactic-co-glycolic acid) encapsulated CpG ODN induces protective immune responses in chickens. *Vaccine*, 34(40), 4807–4813. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2016.08.009>
- Singh Sekhon, B. (2014). Nanotechnology in agri-food production: An overview. En

Nanotechnology, Science and Applications (Vol. 7, Número 2, pp. 31–53). Dove Medical Press Ltd. <https://doi.org/10.2147/NSA.S39406>

Skinner, L. A., Schulte, P. M., LaPatra, S. E., Balfry, S. K., & McKinley, R. S. (2008). Growth and performance of Atlantic salmon, *Salmo salar* L., following administration of a rhabdovirus DNA vaccine alone or concurrently with an oil-adjuvanted, polyvalent vaccine. *Journal of Fish Diseases*, 31(9), 687–697. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2761.2008.00945.x>

Slade, H. B., Owens, M. L., Tomai, M. A., & Miller, R. L. (1998). Imiquimod 5% cream (Aldara(TM)). En *Expert Opinion on Investigational Drugs* (Vol. 7, Número 3, pp. 437–449). Informa Healthcare. <https://doi.org/10.1517/13543784.7.3.437>

Smith, D. M., Simon, J. K., & Baker, J. R. (2013). Applications of nanotechnology for immunology. En *Nature Reviews Immunology* (Vol. 13, Número 8, pp. 592–605). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/nri3488>

Smith, P. K., Krohn, R. I., Hermanson, G. T., Mallia, A. K., Gartner, F. H., Provenzano, M. D., Fujimoto, E. K., Goeke, N. M., Olson, B. J., & Klenk, D. C. (1985). Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Analytical Biochemistry*, 150(1), 76–85. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(85\)90442-7](https://doi.org/10.1016/0003-2697(85)90442-7)

Solomon, S. D., Bahadory, M., Jeyarajasingam, A. V., Rutkowsky, S. A., Boritz, C., & Mulfinger, L. (2007). Synthesis and study of silver nanoparticles. *Journal of Chemical Education*, 84(2), 322–325. <https://doi.org/10.1021/ed084p322>

Song, W., Das, M., Xu, Y., Si, X., Zhang, Y., Tang, Z., & Chen, X. (2019). Leveraging biomaterials for cancer immunotherapy: targeting pattern recognition receptors. En *Materials Today Nano* (Vol. 5, p. 100029). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.mtnano.2019.100029>

Sprott, G. D., Dicaire, C. J., Fleming, L. P., & Patel, G. B. (1996). Stability of Liposomes Prepared from Archaeobacterial Lipids and Phosphatidylcholine Mixtures. *Cells and Materials*, 6(1). <https://digitalcommons.usu.edu/cellsandmaterials/vol6/iss1/16>

Sprott, G. D., Dicaire, C. J., Gurnani, K., Deschatelets, L. A., & Krishnan, L. (2004).

- Liposome adjuvants prepared from the total polar lipids of *Haloferax volcanii*, *Planococcus* spp. and *Bacillus firmus* differ in ability to elicit and sustain immune responses. *Vaccine*, 22(17–18), 2154–2162. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2003.11.054>
- Sprott, G. D., Sad, S., Fleming, L. P., DiCaire, C. J., Patel, G. B., & Krishnan, L. (2003). Archaeosomes varying in lipid composition differ in receptor-mediated endocytosis and differentially adjuvant immune responses to entrapped antigen. *Archaea*, 1, 14. <https://doi.org/10.1155/2003/569283>
- Sprott, G. Dennis. (1992). Structures of archaebacterial membrane lipids. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*, 24(6), 555–566. <https://doi.org/10.1007/BF00762348>
- Sprott, G.Dennis, Tolson, D. L., & Patel, G. B. (1997). Archaeosomes as novel antigen delivery systems. *FEMS Microbiology Letters*, 154(1), 17–22. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1997.tb12618.x>
- Stanberry, L. R. (1995). Herpes simplex virus vaccines as immunotherapeutic agents. *Trends in Microbiology*, 3(6), 244–247. [https://doi.org/10.1016/S0966-842X\(00\)88933-7](https://doi.org/10.1016/S0966-842X(00)88933-7)
- Stanley, M. A. (2002). Imiquimod and the imidazoquinolones: mechanism of action and therapeutic potential. *Clinical and Experimental Dermatology*, 27(7), 571–577. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2230.2002.01151.x>
- Stein, P., Gogoll, K., Tenzer, S., Schild, H., Stevanovic, S., Langguth, P., & Radsak, M. P. (2014). Efficacy of imiquimod-based transcutaneous immunization using a nano-dispersed emulsion gel formulation. *PLoS ONE*, 9(7). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0102664>
- Steiner, A. A., Chakravarty, S., Robbins, J. R., Dragic, A. S., Pan, J., Herkenham, M., & Romanovsky, A. A. (2005). Thermoregulatory responses of rats to conventional preparations of lipopolysaccharide are caused by lipopolysaccharide per se - not by lipoprotein contaminants. *American Journal of Physiology - Regulatory Integrative and Comparative Physiology*, 289(2 58-

2). <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00223.2005>

Steiner, A. A., Chakravarty, S., Rudaya, A. Y., Herkenham, M., & Romanovsky, A. A. (2006). Bacterial lipopolysaccharide fever is initiated via Toll-like receptor 4 on hematopoietic cells. *Blood*, 107(10), 4000–4002. <https://doi.org/10.1182/blood-2005-11-4743>

Steiner, A. A., Molchanova, A. Y., Dogan, M. D., Patel, S., Pétervári, E., Balaskó, M., Wanner, S. P., Eales, J., Oliveira, D. L., Gavva, N. R., Almeida, M. C., Székely, M., & Romanovsky, A. A. (2011). The hypothermic response to bacterial lipopolysaccharide critically depends on brain CB1, but not CB2 or TRPV1, receptors. *Journal of Physiology*, 589(9), 2415–2431. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2010.202465>

Steinhagen, F., Kinjo, T., Bode, C., & Klinman, D. M. (2011). TLR-based immune adjuvants. *Vaccine*, 29(17), 3341–3355. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2010.08.002>

Stils Jr., H. F. (2005). Adjuvants and Antibody Production: Dispelling the Myths Associated with Freund's Complete and Other Adjuvants. *ILAR Journal*, 46(3), 280–293. <https://doi.org/10.1093/ilar.46.3.280>

Stockinger, B., & Veldhoen, M. (2007). Differentiation and function of Th17 T cells. En *Current Opinion in Immunology* (Vol. 19, Número 3, pp. 281–286). Elsevier Current Trends. <https://doi.org/10.1016/j.coi.2007.04.005>

Strugnell, R., Zepp, F., Cunningham, A., & Tantawichien, T. (2011). Vaccine antigens. *Perspectives in Vaccinology*, 1(1), 61–88. <https://doi.org/10.1016/j.pervac.2011.05.003>

Stuart-Harris, C. H. (1969). Adjuvant influenza vaccines. *Bulletin of the World Health Organization*, 41(3), 617–621. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5309486>

Sullivan, T. P., Dearaujo, T., Vincek, V., & Berman, B. (2003). Evaluation of Superficial Basal Cell Carcinomas after Treatment with Imiquimod 5% Cream or Vehicle for Apoptosis and Lymphocyte Phenotyping. *Dermatologic Surgery*, 29(12), 1181–1186. <https://doi.org/10.1111/j.1524-4725.2003.29399.x>

- Summers, S. C., Ruch-Gallie, R., Hawley, J. R., & Lappin, M. R. (2017). Effect of modified live or inactivated feline herpesvirus-1 parenteral vaccines on clinical and laboratory findings following viral challenge. *Journal of Feline Medicine and Surgery*, 19(8), 824–830. <https://doi.org/10.1177/1098612X16659333>
- Swain, P. S., Rajendran, D., Rao, S. B. N., & Dominic, G. (2015). Preparation and effects of nano mineral particle feeding in livestock: A review. *Veterinary World*, 8(7), 888–891. <https://doi.org/10.14202/vetworld.2015.888-891>
- Swanson, J. A. (2008). Shaping cups into phagosomes and macropinosomes. En *Nature Reviews Molecular Cell Biology* (Vol. 9, Número 8, pp. 639–649). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/nrm2447>
- Swayne, D. E., & Kapczynski, D. (2008). Strategies and challenges for eliciting immunity against avian influenza virus in birds. En *Immunological Reviews* (Vol. 225, Número 1, pp. 314–331). Immunol Rev. <https://doi.org/10.1111/j.1600-065X.2008.00668.x>
- Taha-Abdelaziz, K., Yitbarek, A., Alkie, T. N., Hodgins, D. C., Read, L. R., Weese, J. S., & Sharif, S. (2018). PLGA-encapsulated CpG ODN and Campylobacter jejuni lysate modulate cecal microbiota composition in broiler chickens experimentally challenged with C. jejuni. *Scientific Reports*, 8(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-018-30510-w>
- Takeda, K., & Akira, S. (2005). Toll-like receptors in innate immunity. *International Immunology*, 17(1), 1–14. <https://doi.org/10.1093/intimm/dxh186>
- Takeda, K., Kaisho, T., & Akira, S. (2003). Toll-Like Receptors. *Annual Review of Immunology*, 21(1), 335–376. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.21.120601.141126>
- Takeuchi, O., & Akira, S. (2010). Pattern Recognition Receptors and Inflammation. En *Cell* (Vol. 140, Número 6, pp. 805–820). <https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.01.022>
- Tatli Seven, P., Seven, I., Gul Baykalir, B., Iflazoglu Mutlu, S., & Salem, A. Z. M. (2018). Nanotechnology and nano-propolis in animal production and health: an

- overview. *Italian Journal of Animal Science*, 17(4), 921–930.
<https://doi.org/10.1080/1828051X.2018.1448726>
- Teixeira, A. R. L., Hecht, M. M., Guimaro, M. C., Sousa, A. O., & Nitz, N. (2011). Pathogenesis of chagas' disease: Parasite persistence and autoimmunity. *Clinical Microbiology Reviews*, 24(3), 592–630.
<https://doi.org/10.1128/CMR.00063-10>
- Teixeira, A. R. L., Nascimento, R. J., & Sturm, N. R. (2006). Evolution and pathology in Chagas disease - A Review. En *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz* (Vol. 101, Número 5, pp. 463–491). Fundacao Oswaldo Cruz.
<https://doi.org/10.1590/S0074-02762006000500001>
- Testerman, T. L., Gerster, J. F., Imbertson, L. M., Reiter, M. J., Miller, R. L., Gibson, S. J., Wagner, T. L., & Tomai, M. A. (1995). Cytokine induction by the immunomodulators imiquimod and S-27609. *Journal of Leukocyte Biology*, 58(3), 365–372. <https://doi.org/10.1002/jlb.58.3.365>
- Thakur, A., Andrea, A., Mikkelsen, H., Woodworth, J. S., Andersen, P., Jungersen, G., & Aagaard, C. (2018). Targeting the Mincle and TLR3 receptor using the dual agonist cationic adjuvant formulation 9 (CAF09) induces humoral and polyfunctional memory T cell responses in calves. *PLOS ONE*, 13(7), e0201253. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0201253>
- The Business Research Company. (2018). *Veterinary Industry Outlook: Top Global Trends and Statistics*. <https://blog.marketresearch.com/veterinary-industry-outlook-top-global-trends-and-statistics>
- Thomsen, L. L., Topley, P., Daly, M. G., Brett, S. J., & Tite, J. P. (2004). Imiquimod and resiquimod in a mouse model: Adjuvants for DNA vaccination by particle-mediated immunotherapeutic delivery. *Vaccine*, 22(13–14), 1799–1809.
<https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2003.09.052>
- Tizard, I., & Payne, S. L. (2011). *Vaccines and Immunotherapy*. MSD Veterinary Manual. <https://www.msdsvetmanual.com/special-pet-topics/drugs-and-vaccines/vaccines-and-immunotherapy>

- Toche, P. (2012). Visión panorámica del sistema inmune. *Revista Médica Clínica Las Condes*, 23(4), 446–457. [https://doi.org/10.1016/s0716-8640\(12\)70335-8](https://doi.org/10.1016/s0716-8640(12)70335-8)
- Todt, J. C., Hu, B., & Curtis, J. L. (2008). The scavenger receptor SR-A I/II (CD204) signals via the receptor tyrosine kinase MerTK during apoptotic cell uptake by murine macrophages. *Journal of Leukocyte Biology*, 84(2), 510–518. <https://doi.org/10.1189/jlb.0307135>
- Tolson, D. L., Latta, R. K., Patel, G. B., & Sprott, G. D. (1996). Uptake of archaeobacterial liposomes and conventional liposomes by phagocytic cells. *Journal of Liposome Research*, 6(4), 755–776. <https://doi.org/10.3109/08982109609039925>
- Tomai, M. A., Imbertson, L. M., Stanczak, T. L., Tygrett, L. T., & Waldschmidt, T. J. (2000). The immune response modifiers imiquimod and R-848 are potent activators of B lymphocytes. *Cellular Immunology*, 203(1), 55–65. <https://doi.org/10.1006/cimm.2000.1673>
- Tomprowski, J., Heer, J. M., Allan, B., Gomis, S., & Aich, P. (2019). Carbon nanotubes significantly enhance the biological activity of CpG ODN in chickens. *International Journal of Pharmaceutics*, 561, 135–147. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2019.02.040>
- Torchilin, V. (2011). Tumor delivery of macromolecular drugs based on the EPR effect. En *Advanced Drug Delivery Reviews* (Vol. 63, Número 3, pp. 131–135). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2010.03.011>
- Torchilin, V., & Weissig, V. (2003). *Liposomes: a practical approach* (2nd ed.). Oxford University Press (OUP).
- Trouiller, P., Oliaro, P., Torreele, E., Orbinski, J., Laing, R., & Ford, N. (2002). Drug development for neglected diseases: A deficient market and a public-health policy failure. *Lancet*, 359(9324), 2188–2194. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(02\)09096-7](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(02)09096-7)
- U.S. National Nanotechnology Initiative. (s. f.). *What It Is and How It Works*. Nano 101. Recuperado 22 de noviembre de 2019, de <https://www.nano.gov/>

- United States National Nanotechnology Initiative. (s. f.). *Benefits and Applications of Nanotechnology*. Nano 101. <https://www.nano.gov/you/nanotechnology-benefits>
- Universidad Complutense de Madrid. (s. f.). *Los virus y los eritrocitos: una mezcla interesante*. Recuperado 14 de mayo de 2020, de https://www.ucm.es/data/cont/docs/1462-2017-10-18-5.2_Haemaggl_es.pdf
- Urošević, M., Maier, T., Benninghoff, B., Slade, H., Burg, G., & Dummer, R. (2003). Mechanisms underlying imiquimod-induced regression of basal cell carcinoma in vivo. *Archives of Dermatology*, 139(10), 1325–1332. <https://doi.org/10.1001/archderm.139.10.1325>
- V T Nair, D., Venkitanarayanan, K., & Kollanoor Johny, A. (2018). Antibiotic-Resistant Salmonella in the Food Supply and the Potential Role of Antibiotic Alternatives for Control. *Foods (Basel, Switzerland)*, 7(10). <https://doi.org/10.3390/foods7100167>
- Valenzuela, P., Medina, A., Rutter, W. J., Ammerer, G., & Hall, B. D. (1982). Synthesis and assembly of hepatitis B virus surface antigen particles in yeast. *Nature*, 298(5872), 347–350. <https://doi.org/10.1038/298347a0>
- Van De Vossenberg, J. L. C. M., Driessen, A. J. M., Grant, W. D., & Konings, G. W. N. (1999). Lipid membranes from halophilic and alkali-halophilic Archaea have a low H⁺ and Na⁺ permeability at high salt concentration. *Extremophiles*, 3(4), 253–257. <https://doi.org/10.1007/s007920050124>
- van der Meel, R., Vehmeijer, L. J. C., Kok, R. J., Storm, G., & van Gaal, E. V. B. (2016). *Ligand-targeted Particulate Nanomedicines Undergoing Clinical Evaluation: Current Status* (pp. 163–200). Springer, Cham. https://doi.org/10.1007/978-3-319-43525-1_7
- van Meerloo, J., Kaspers, G. J. L., & Cloos, J. (2011). Cell Sensitivity Assays: The MTT Assay. En I. Cree (Ed.), *Methods in Molecular Biology (Methods and Protocols)* (pp. 237–245). Humana Press. https://doi.org/https://doi.org/10.1007/978-1-61779-080-5_20

- Van Reeth, K., & Ma, W. (2012). Swine Influenza Virus Vaccines: To Change or Not to Change—That's the Question. En *Current topics in microbiology and immunology* (Vol. 370, pp. 173–200). Curr Top Microbiol Immunol. https://doi.org/10.1007/82_2012_266
- Vaure, C., & Liu, Y. (2014). A comparative review of toll-like receptor 4 expression and functionality in different animal species. En *Frontiers in Immunology* (Vol. 5, Número JUL). Frontiers Research Foundation. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2014.00316>
- Vauthier, C., & Bouchemal, K. (2009). Methods for the Preparation and Manufacture of Polymeric Nanoparticles. En *Pharmaceutical Research* (Vol. 26, Número 5, pp. 1025–1058). Springer New York. <https://doi.org/10.1007/s11095-008-9800-3>
- Veldhoen, M., Hocking, R. J., Atkins, C. J., Locksley, R. M., & Stockinger, B. (2006). TGF β in the context of an inflammatory cytokine milieu supports de novo differentiation of IL-17-producing T cells. *Immunity*, 24(2), 179–189. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2006.01.001>
- Ventola, C. L. (2015). The antibiotic resistance crisis: part 1: causes and threats. *P&T: A Peer-Reviewed Journal for Formulary Management*, 40(4), 277–283.
- Vidal, D., Matias-Guiu, X., & Alomar, A. (2004). Efficacy of imiquimod for the expression of Bcl-2, Ki67, p53 and basal cell carcinoma apoptosis. *British Journal of Dermatology*, 151(3), 656–662. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2133.2004.06094.x>
- Vidovic, N., & Vidovic, S. (2020). Antimicrobial resistance and food animals: Influence of livestock environment on the emergence and dissemination of antimicrobial resistance. En *Antibiotics* (Vol. 9, Número 2). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/antibiotics9020052>
- Vincent, A. L., Lager, K. M., Janke, B. H., Gramer, M. R., & Richt, J. A. (2008). Failure of protection and enhanced pneumonia with a US H1N2 swine influenza virus in pigs vaccinated with an inactivated classical swine H1N1 vaccine. *Veterinary*

- Microbiology*, 126(4), 310–323. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2007.07.011>
- Vincent, A. L., Perez, D. R., Rajao, D., Anderson, T. K., Abente, E. J., Walia, R. R., & Lewis, N. S. (2017). Influenza A virus vaccines for swine. *Veterinary Microbiology*, 206, 35–44. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2016.11.026>
- Vivier, E., Tomasello, E., Baratin, M., Walzer, T., & Ugolini, S. (2008). Functions of natural killer cells. En *Nature Immunology* (Vol. 9, Número 5, pp. 503–510). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/ni1582>
- Vogel, F. R. (1998). Adjuvants in perspective. *Developments in Biological Standardization*, 92, 241–248.
- Vogel, F. R., Caillet, C., Kusters, I. C., & Haensler, J. (2009). Emulsion-based adjuvants for influenza vaccines. En *Expert Review of Vaccines* (Vol. 8, Número 4, pp. 483–492). Taylor & Francis. <https://doi.org/10.1586/erv.09.5>
- Voss, T., Rummel, C., Gerstberger, R., Hübschle, T., & Roth, J. (2006). Fever and circulating cytokines induced by double-stranded RNA in guinea pigs: Dependence on the route of administration and effects of repeated injections. *Acta Physiologica*, 187(3), 379–389. <https://doi.org/10.1111/j.1748-1716.2006.01587.x>
- Wack, A., Terczyńska-Dyla, E., & Hartmann, R. (2015). Guarding the frontiers: The biology of type III interferons. En *Nature Immunology* (Vol. 16, Número 8, pp. 802–809). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/ni.3212>
- Wagner, I., Geh, K. J., Hubert, M., Winter, G., Weber, K., Classen, J., Klinger, C., & Mueller, R. S. (2017). Preliminary evaluation of cytosine-phosphate-guanine oligodeoxynucleotides bound to gelatine nanoparticles as immunotherapy for canine atopic dermatitis. *Veterinary Record*, 181(5), 118. <https://doi.org/10.1136/vr.104230>
- Wagner, V., Dullaart, A., Bock, A. K., & Zweck, A. (2006). The emerging nanomedicine landscape. En *Nature Biotechnology* (Vol. 24, Número 10, pp. 1211–1217). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/nbt1006-1211>

- Walter, A., Schäfer, M., Cecconi, V., Matter, C., Urosevic-Maiwald, M., Belloni, B., Schönewolf, N., Dummer, R., Bloch, W., Werner, S., Beer, H. D., Knuth, A., & Van Den Broek, M. (2013). Aldara activates TLR7-independent immune defence. *Nature Communications*, 4(1), 1–13. <https://doi.org/10.1038/ncomms2566>
- Warger, T., Rechtsteiner, G., Schmid, B., Osterloh, P., Schild, H., & Radsak, M. P. (2007). Transcutaneous immunization with imiquimod is amplified by CD40 ligation and results in sustained cytotoxic T-lymphocyte activation and tumor protection. *Clinical Reviews in Allergy and Immunology*, 32(1), 57–65. <https://doi.org/10.1007/BF02686082>
- Watson, D. S., Endsley, A. N., & Huang, L. (2012). Design considerations for liposomal vaccines: Influence of formulation parameters on antibody and cell-mediated immune responses to liposome associated antigens. *En Vaccine* (Vol. 30, Número 13, pp. 2256–2272). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2012.01.070>
- Wheat, W., Chow, L., Coy, J., Contreras, E., Lappin, M., & Dow, S. (2019). Activation of upper respiratory tract mucosal innate immune responses in cats by liposomal toll-like receptor ligand complexes delivered topically. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 33(2), 838–845. <https://doi.org/10.1111/jvim.15426>
- Wheat, W., Chow, L., Kuzmik, A., Soontararak, S., Kurihara, J., Lappin, M., & Dow, S. (2019). Local immune and microbiological responses to mucosal administration of a Liposome-TLR agonist immunotherapeutic in dogs. *BMC veterinary research*, 15(1), 330. <https://doi.org/10.1186/s12917-019-2073-8>
- Williams, T. A., Szöllosi, G. J., Spang, A., Foster, P. G., Heaps, S. E., Boussau, B., Ettema, T. J. G., & Martin Embley, T. (2017). Integrative modeling of gene and genome evolution roots the archaeal tree of life. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 114(23), E4602–E4611. <https://doi.org/10.1073/pnas.1618463114>

- Wilson, K. D., de Jong, S. D., & Tam, Y. K. (2009). Lipid-based delivery of CpG oligonucleotides enhances immunotherapeutic efficacy. En *Advanced Drug Delivery Reviews* (Vol. 61, Número 3, pp. 233–242). <https://doi.org/10.1016/j.addr.2008.12.014>
- Woese, C. R., & Fox, G. E. (1977). Phylogenetic structure of the prokaryotic domain: The primary kingdoms. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 74(11), 5088–5090. <https://doi.org/10.1073/pnas.74.11.5088>
- Woese, C. R., Kandler, O., & Wheelis, M. L. (1990). Towards a natural system of organisms: Proposal for the domains Archaea, Bacteria, and Eucarya. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 87(12), 4576–4579. <https://doi.org/10.1073/pnas.87.12.4576>
- Wolfram, J., & Ferrari, M. (2019). Clinical cancer nanomedicine. En *Nano Today* (Vol. 25, pp. 85–98). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.nantod.2019.02.005>
- Won, Y. W., & Kim, Y. H. (2009). Preparation and cytotoxicity comparison of type a gelatin nanoparticles with recombinant human gelatin nanoparticles. *Macromolecular Research*, 17(7), 464–468. <https://doi.org/10.1007/BF03218893>
- Woodbury, D. J., Richardson, E. S., Grigg, A. W., Welling, R. D., & Knudson, B. H. (2006). Reducing liposome size with ultrasound: Bimodal size distributions. *Journal of Liposome Research*, 16(1), 57–80. <https://doi.org/10.1080/08982100500528842>
- Worsham, R. D., Thomas, V., & Farid, S. S. (2019). Potential of Continuous Manufacturing for Liposomal Drug Products. En *Biotechnology Journal* (Vol. 14, Número 2). Wiley-VCH Verlag. <https://doi.org/10.1002/biot.201700740>
- Yamauchi, K., Onoue, Y., Tsujimoto, T., & Kinoshita, M. (1997). Archaeobacterial lipids: High surface activity of polyisoprenoid surfactants in water. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 10(1), 35–39. [https://doi.org/10.1016/S0927-7765\(97\)00040-4](https://doi.org/10.1016/S0927-7765(97)00040-4)

- Yamauchi, Kiyoshi, Akiyama, F., & Kitano, T. (2000). Highly hydrophobic surface material: poly(phytanyl methacrylate). *Macromolecules*, 33(11), 4285–4287. <https://doi.org/10.1021/ma991939b>
- Yamauchi, Kiyoshi, Doi, K., Yoshida, Y., & Kinoshita, M. (1993). Archaeobacterial lipids: highly proton-impermeable membranes from 1,2-diphytanyl-sn-glycero-3-phosphocoline. *BBA - Biomembranes*, 1146(2), 178–182. [https://doi.org/10.1016/0005-2736\(93\)90353-2](https://doi.org/10.1016/0005-2736(93)90353-2)
- Yameen, B., Choi, W. II, Vilos, C., Swami, A., Shi, J., & Farokhzad, O. C. (2014). Insight into nanoparticle cellular uptake and intracellular targeting. En *Journal of Controlled Release* (Vol. 190, pp. 485–499). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2014.06.038>
- Yang, P., Singh, J., Wettig, S., Foldvari, M., Verrall, R. E., & Badea, I. (2010). Enhanced gene expression in epithelial cells transfected with amino acid-substituted gemini nanoparticles. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 75(3), 311–320. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2010.04.007>
- Zakeri, A., & Russo, M. (2018). Dual role of toll-like receptors in human and experimental asthma models. En *Frontiers in Immunology* (Vol. 9, Número MAY, p. 1027). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.01027>
- Zaks, K., Jordan, M., Guth, A., Sellins, K., Kedl, R., Izzo, A., Bosio, C., & Dow, S. (2006). Efficient immunization and cross-priming by vaccine adjuvants containing TLR3 or TLR9 agonists complexed to cationic liposomes. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 176(12), 7335–7345. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.176.12.7335>
- Zani, I., Stephen, S., Mughal, N., Russell, D., Homer-Vanniasinkam, S., Wheatcroft, S., & Ponnambalam, S. (2015). Scavenger Receptor Structure and Function in Health and Disease. *Cells*, 4(2), 178–201. <https://doi.org/10.3390/cells4020178>
- Zaru, R. (2019). *Receptores que reconocen patrones (PRRs)*. In *Inmunología en un mordisco; Sociedad Británica de Inmunología*. <http://inmunologia.eu/receptores-y-moleculas/receptores-que-reconocen->

- Zhang, S., Gao, H., & Bao, G. (2015). Physical Principles of Nanoparticle Cellular Endocytosis. En *ACS Nano* (Vol. 9, Número 9, pp. 8655–8671). American Chemical Society. <https://doi.org/10.1021/acsnano.5b03184>
- Zhang, W. W., & Matlashewski, G. (2008). Immunization with a Toll-like receptor 7 and/or 8 agonist vaccine adjuvant increases protective immunity against *Leishmania major* in BALB/c mice. *Infection and Immunity*, 76(8), 3777–3783. <https://doi.org/10.1128/IAI.01527-07>
- Zhou, H. F., Ma, Q. H., Xia, Q., Lu, Y. Y., Gu, N., Miao, X., & Luo, D. (2007). Preparation and Cytotoxicity of Imiquimod-Loaded Solid Lipid Nanoparticles. *Solid State Phenomena*, 121–12, 271–274. <https://doi.org/https://doi.org/10.4028/www.scientific.net/SSP.121-123.271>
- Zhu, M., Wang, R., & Nie, G. (2014). Applications of nanomaterials as vaccine adjuvants. *Human Vaccines and Immunotherapeutics*, 10(9), 2761–2774. <https://doi.org/10.4161/hv.29589>
- Zingales, B., Miles, M. A., Campbell, D. A., Tibayrenc, M., Macedo, A. M., Teixeira, M. M. G., Schijman, A. G., Llewellyn, M. S., Lages-Silva, E., Machado, C. R., Andrade, S. G., & Sturm, N. R. (2012). The revised *Trypanosoma cruzi* subspecific nomenclature: Rationale, epidemiological relevance and research applications. En *Infection, Genetics and Evolution* (Vol. 12, Número 2, pp. 240–253). <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2011.12.009>
- Zuber, A. K., Bråve, A., Engström, G., Zuber, B., Ljungberg, K., Fredriksson, M., Benthin, R., Isaguliant, M. G., Sandström, E., Hinkula, J., & Wahren, B. (2004). Topical delivery of imiquimod to a mouse model as a novel adjuvant for human immunodeficiency virus (HIV) DNA. *Vaccine*, 22(13–14), 1791–1798. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2003.10.051>