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

Universidad
Nacional
de Quilmes

Caimi, Ayelen Tatiana

Nanovesículas arqueolipídicas ultradeformables como adyuvantes tópicos listos para usar

Esta obra está bajo una Licencia Creative Commons Argentina.
Atribución - No Comercial - Sin Obra Derivada 2.5
https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/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:
Caimi, A. T. (2019). Nanovesículas arqueolipídicas ultradeformables como adyuvantes tópicos listos para usar. (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/20.500.11807/3909

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

Universidad Nacional de Quilmes
Roque Sáenz Peña 352 // Bernal
Buenos Aires // Argentina
t.: (+41 11) 4365 7100
f.: (+54 11) 4365 7101
info@unq.edu.ar

Ayelen Tatiana Caimi, Repositorio Institucional Digital de Acceso
Abierto, Mayo de 2019, pp. 226,
http://ridaa.unq.edu.ar,
Universidad Nacional de Quilmes, Secretaría de Posgrado,
Doctorado en Ciencia y Tecnología

Nanovesículas arqueolipídicas ultradeformables como adyuvantes tópicos listos para usar

TESIS DOCTORAL

Ayelen Tatiana Caimi

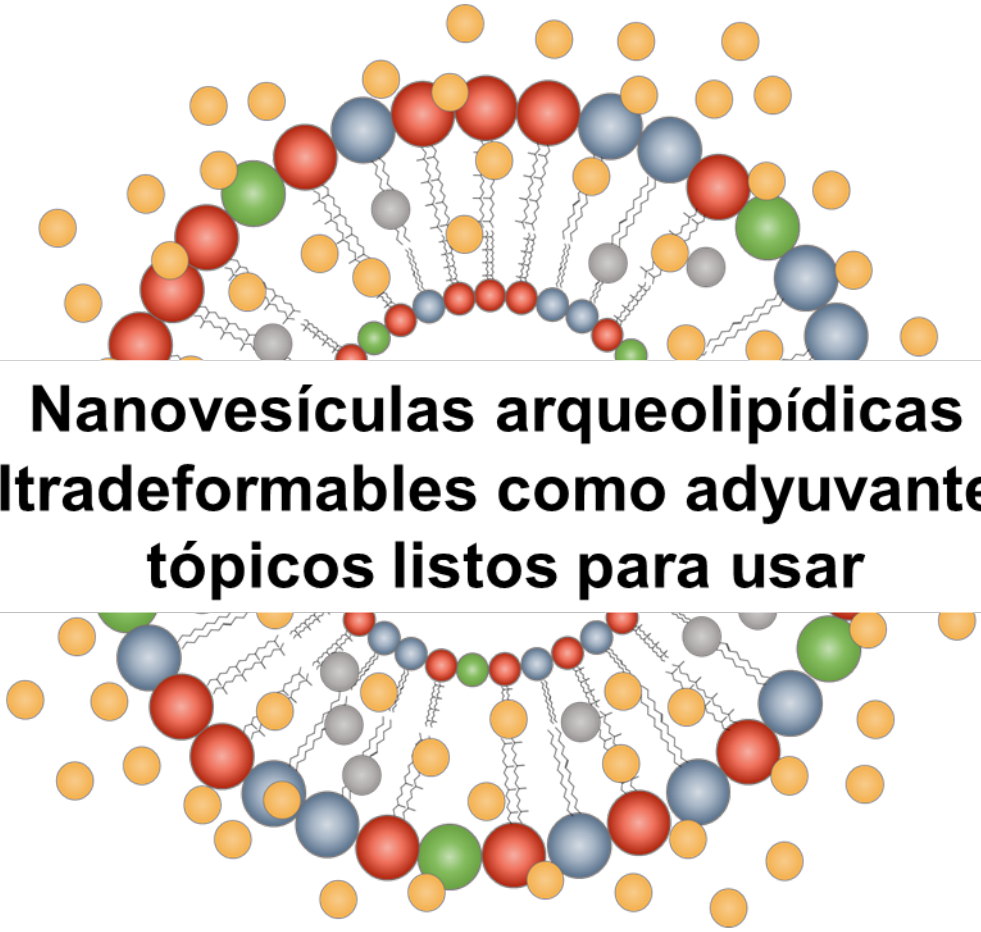
ayelencaimi@gmail.com

Resumen

El objetivo general de esta tesis doctoral fue evaluar la capacidad de nanovesículas ultradeformables conteniendo arqueolípidos (AUD) de funcionar como adyuvantes tópicos. Es decir, por un lado, que puedan desencadenar una respuesta inmune antígeno especifica humoral, celular y de memoria tras su aplicación tópica al combinarlos con diferentes antígenos. Por otro lado, que cumplan con ser seguros, eficaces, estables, que no requieran cadena de frio para su almacenamiento, que se puedan producir por procesos simples y que se puedan mezclar con el antígeno antes de su administración.

Previamente mostramos que AUD preparados a partir de arqueolípidos polares totales (APT) extraídos del arquebacteria hiperhalófila Halorubrum tebenquichense, fosfatidilcolina de soja (SPC) y colato de sodio (ColNa) (3:3:1 p/p) aplicados tópicamente pueden penetrar el estrato corneo (SC) e inducir títulos de IgG séricos antígeno-específicos.

Universidad Nacional de Quilmes



Nanovesículas arqueolipídicas ultradeformables como adyuvantes tópicos listos para usar

Lic. Ayelen Tatiana Caimi

Directora: Dra. María José Morilla
Co-Directora: Dra. Ana Paula Perez

Centro de Investigación y Desarrollo en Nanomedicinas
Universidad Nacional de Quilmes

Tesis doctoral

- 2019-

AGRADECIMIENTOS

Tengo tanto que agradecer, que siento que todo no entra en esta hoja.

En primer lugar, a Eder y María José como directoras del CIDeN, por haberme dado la oportunidad de entrar en mundo de la ciencia, y aprender tanto, todos los días. En particular, agradezco el lugar que me hicieron en el Centro, donde obtuve la mejor formación que podía pedir, con objetivos claros y metas cumplidas. Como personas, a Eder le agradezco toda la energía contagiosa que tiene cada vez que entra al laboratorio, que nos hace sentir que esforzándonos, podemos llegar a donde queramos. A María José, gracias por el apoyo y el acompañamiento durante todo el proceso de tesis. Gracias por enseñarme cómo hacer Ciencia, y por hacerme sentir que, con el paso de los años, encontré una mejor versión de mi misma haciendo esto. A Paula, le agradezco por todo lo que me enseñó estos años, pero por sobre todo por ser el cable a tierra entre mis nervios, mi ansiedad, mis preocupaciones… y la tesis. Gracias María José y Paula por el gran trabajo de dirección que hicieron conmigo, y por todo lo que logramos en estos 5 años, que, desde mi perspectiva, es muchísimo. A Leticia y Priscila, por las enseñanzas y consejos y por todo lo que aportaron en mi formación. Leti, gracias por tu aliento de cada día; Pri, gracias por tus mensajes desde Alemania. A los Doctornados y a nuestra única “chiquita”, por hacer de este trabajo algo divertido. Por hacerme sentir que juntos hacemos mucho más que ciencia, que somos un gran gran equipo. Julia, vos fuiste mi ejemplo cuando entré al laboratorio, gracias por enseñarme que siempre se puede dar un paso más. Fede, gracias por las incansables horas compartidas en el bioterio, por ser mi numero dos durante la primera etapa de mi doctorado. Jair, a vos por tus chistes de cada día (aunque no te agradezco el trap y el reggue en el labo!). A Yami, por ser una persona tan parecida a mí en tantos aspectos, que siempre tiene el abrazo justo. A Noe, por nuestras horas compartidas en el labo (y por ser la primera persona que me enseñó a pesar el medio de cultivo de las arqueas). A Tefy, por los mates que nunca faltan desde que está con nosotros. A Gus y a Lilen, un párrafo aparte…

A mi familia, le debo y le agradezco todo. Mamá y papá, gracias por hacerme quién soy. Por la educación, los principios, los valores y las exigencias… saben que sin todo eso, yo no estaría por convertirme en Doctora.

Ma, gracias por ser mi maestra de la vida. Por ser mi ejemplo, por tus palabras sabias, por tus enseñanzas, por tus charlas, por tu objetividad ante cada aspecto de la vida de la que todavía tengo tanto que aprender. Pa, gracias por tu emocionalidad. Por hacerme saber cada día de mi vida el orgullo que te hago sentir… aunque quiero que sepas que yo estoy más orgullosa de ustedes, que ustedes de mí. Gracias por enseñarme, que, desde abajo, se puede ser una persona enorme. ¡Para mi vos sos gigante! A mis hermanas, mis compañeras incondicionales. Denise, gracias por ser mi amiga, por escucharme siempre y ayudarme siempre a dar un paso más. A Lilen, gracias por hacerme sentír que, como hermana mayor, soy tu ejemplo. Gracias por seguir mi camino en la Ciencia, y enorgullecerme con cada pasito que avanzas. A los cuatro juntos, gracias por celebrar conmigo cada logro en mi carrera, por empujarme cada vez que quedé atascada, por nunca dejarme caer, por secar mis lágrimas tantas veces que lloré. Gracias por entender que elegí una carrera difícil (demasiado difícil para el carácter que tengo), y apoyarme en cada desición. Gracias por escucharme hablar tantas veces de mis proyectos del labo, con tanta emoción, sin entender dos palabras seguidas de lo que estaba diciendo.

A mis amigas, que son las mejores del mundo. Juli, Lei… gracias por seguir ahí después de tantos años juntas. Gracias por hacerme sentir acompañada, aunque estemos siempre lejos. Gracias por entender mis tiempos y celebrar mis logros.

A Carlis, por ser ese amigo incondicional en la distancia. Nuestra conexión existió desde siempre, y celebro nuestra amistad eternamente. Gracias por acompañarme en cada momento, por tus palabras de ánimo, por tu fé, y por tu contención.

A mi ahijada, el pequeño saltamontes de 8 años, que agarra el celular enojada para decirme “madrina, ya no venís a jugar conmigo”. Gracias por entenderme, y quererme con esta carrera tan loca que elegí. A tus papis, y ahora a tu hermano, por acompañarme con tanto amor en cada paso que doy. Ana, gracias por tus palabras de aliento siempre que las necesité.

A Gus, por entrar en mi vida en el momento justo. Por enseñarme que, aunque la vida no se trate de mitades, vos sos la mía. Por acompañarme todos los días, por contenerme, por apoyarme en estos meses locos de redacción.

Gracias por aguantarme llorando, por mirarme y decirme “vas bien” “ya falta poco”, tenías razón… ya casi estoy! Gracias por tu ayuda incondicional estos últimos meses. A tu familia: Claudia, Carlos, Caro, Gabi… por quererme y hacerme sentir que celebran conmigo cada logro y son felices con mi felicidad.

A la Universidad Nacional de Quimes, por haberme formado. Por ser esta casa de la que estoy agradecida de pertenecer. Al Departamento de CyT, en especial a Bruno, por estar cerca nuestro cada vez que necesitamos algo. A Natalia Calienni, infinitas gracias por tu gran ayuda en el final de mi trabajo en mesada.

A todos, gracias por compartir este logro conmigo, y ser tan felices como yo. Gracias por el granito de arena que cada uno de ustedes aportó.

Tía, esta tesis te la dedico a vos. Sé que serias una de las primeras personas en entrar corriendo a ver mi defensa y celebrar conmigo, como lo hiciste siempre, en cada etapa de mi vida desde que tengo memoria. Tantos años me bastaron para saber que tu orgullo hoy, sería inmenso.

INDICE

Lista de abreviaturas, siglas y símbolos…… ……11
Resumen 17

CAPITULO 1:
INTRODUCCIÓN…….....…..25
1.1 Breve historia de la vacunación: tipos de vacunas y rutas de administración 27
1.2 Estructura de la piel..... 31
1.2.1 La barrera principal del estrato córneo..... 34
1.3 Función inmunológica de la piel 35
1.3.1 Inmunidad innata 35
1.3.2 Inmunidad adaptativa 37
1.3.3 Células dendríticas, nexo entre inmunidad innata y adaptativa 39
1.4 Vacunación tópica 40
1.4.1 Nanovesículas para la vacunación tópica 45
1.5 Arquebacterias y adyuvancia 52
1.5.1 Arqueosomas ultradeformables para vacunación tópica 55
Objetivos 59
Objetivos generales..... 59
Objetivos específicos: 59
1.6 Referencias 60

CAPITULO 2: VACUNACIÓN TÓPICA CON NANOVESÍCULAS "SÚPER-ESTABLES"
LISTAS PARA USAR 73
2.1 Introducción..... 77
2.2 Materiales y métodos 80
2.2.1 Materiales..... 80
2.2.2. Crecimiento de arquebacterias, extracción y caracterización de lípidos polares totales . 80
2.2.3 Preparación de nanovesículas 81
2.2.4 Caracterización de nanovesículas 82
2.2.5 Nanovesículas congeladas-descongeladas y liofilizadas-rehidratadas 83
2.2.6 Análisis calorimétrico por calorimetría diferencial de barrido (DSC) 83
2.2.7 Morfología por microscopía electrónica de transmisión criogénica (cryo-TEM)..... 84
2.2.8 Calentamiento y esterilización de las nanovesículas 84
2.2.9 Deformabilidad 85
2.2.10 Estabilidad frente al almacenamiento 85
2.2.11 Inmunización 85
2.2.12 Análisis estadístico..... 87
2.3 Resultados 88
2.3.1 Nanovesículas congeladas-descongeladas y liofilizadas-rehidratadas 88
2.3.2 Calentamiento y esterilización de las nanovesículas 93
2.3.3. Nanovesículas esterilizadas, liofilizadas y reconstituidas (ELR)..... 94

2.3.4 Deformabilidad de nanovesículas esterilizadas, liofilizadas y rehidratadas (ELR) 94
2.4 Discusión 100
2.5 Referencias 106

CAPITULO 3: ARQUEOSOMAS ULTRADEFORMABLES CON IMIQUIMOD PARA VACUNACIÓN TÓPICA..... 111
3.1 Introducción 115
3.2 Materiales y métodos 117
3.2.1 Materiales 117
3.2.2 Crecimiento de arqueobacterias, extracción y caracterización de lípidos polares totales 118
3.2.3 Preparación de nanovesículas ultradeformables 118
3.2.4 Caracterización de nanovesículas ultradeformables 119
3.2.5 Captura en macrófagos y queratinocitos 121
3.2.6 Citotoxicidad en macrófagos y queratinocitos 122
3.2.7 Liberación de citoquinas proinflamatorias 123
3.2.8 Penetración en piel *in vitro* 123
3.2.9 Inmunización 124
3.2.10 Estabilidad tras el almacenamiento 125
3.2.11 Análisis estadístico 126
3.3 Resultados 126
3.3.1 Formulación y caracterización de nanovesículas conteniendo IMQ 126
3.3.2 Captura celular 131
3.3.3 Citotoxicidad sobre queratinocitos y macrófagos 132
3.3.4 Liberación de citoquinas proinflamatorias 135
3.3.5 Penetración *in vitro* en piel 136
3.3.6 Respuesta inmune tras la aplicación tópica 137
3.3.7 Estabilidad de las nanovesículas tras el almacenamiento 138
3.4 Discusión 139

CAPITULO 4: VACUNACIÓN TÓPICA CONTRA INFLUENZA EMPLEANDO ARQUEOSOMAS ULTRADEFOMABLES CON IMIQUIMOD 149
4.1 Introducción 153
4.1.1 Vacunas contra influenza 154
4.1.2. Adyuvantes utilizados en vacunas contra influenza 157
4.1.3 Nueva generación vacunas contra influenza: nuevos adyuvantes y administración tópica 160
4.2 Materiales y Métodos 162
4.2.1 Materiales 162
4.2.2 Crecimiento de arquebacterias, extracción y caracterización de lípidos polares totales 163
4.2.3 Preparación y caracterización de nanovesículas ultradeformables 163
4.2.4 Inmunización 163
4.2.5 Determinación de la repuesta inmunológica 164
4.2.6 Análisis estadístico 165

4.3 Resultados 166
4.3.1 Determinación de IgG total e isotipos 166
4.3.2 Efecto del sitio de administración sobre la respuesta inmune 169
4.3.3 Reacción de hipersensibilidad retardada (DTH) 169
4.4 Discusión 170
4.6 Referencias 173

CAPITULO 5: ACTIVIDAD ANTI-MELANOMA IN VITRO DE ARQUEOSOMAS ULTRADEFORMABLES CON IMIQUIMOD 181
5.1 Introducción 183
5.2 Materiales y Métodos 187
5.2.1 Materiales 187
5.2.2 Preparación y caracterización de nanovesículas ultradeformables 187
5.2.3 Cultivo celular de células de melanoma humano 187
5.2.4 Viabilidad celular 188
5.2.5 Captura Celular 190
5.2.6 Determinación de apoptosis/necrosis 190
5.2.7 Análisis estadísticos 193
5.3 Resultados 193
5.3.1 Viabilidad celular 193
5.4 Discusión 206
5.5 Referencias 211

CAPITULO 6: CONCLUSIONES FINALES 219

Lista de abreviaturas, siglas y símbolos

A

ABTS: 2,2-azino-bis (3-etilbenzotiazolin-6-ácido sulfónico)

Ag: antígeno

AL: ácido linóleo

Alum: alúmina

ANOVA: análisis de varianza de una entrada

AP: arqueolípidos polares

APT: arqueolípidos polares totales

ARC: arqueosomas

AUD: arqueosomas ultradeformables

B

BCC: carcinomas de células basales

BPG: bifosfatidilglicerol

Buffer Tris-HCl: buffer Tris pH 7,4 100 mM con NaCl 0,9 % p/v

C

cAMP: adenosín monofosfato cíclico

CDd: células dendríticas dérmicas

CDs: células dendríticas

CEM: cromatografía de exclusión molecular

Cf: factor de crioprotección

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

CL: células de Langerhans

ColNa: colato de sodio

ConcA: concanavalina A

CPA: células presentadoras de antígenos

CpG: oligodeoxinucleótidos

Cryo-TEM: microscopia electrónica de Cryo-transmisión

D

D: deformabilidad

DAMP: patrones moleculares asociados al daño

DE: desviación estándar

DLS: dispersión dinámica de luz

DMSO: dimetilsulfóxido

DPX: P-xileno-bis-piridinio

DSC: calorimetría diferencial de barrido

DTH: respuestas de hipersensibilidad retardada

E

E: nanovesiculas esterilizadas

EE: eficiencia de encapsulación

ELISA: ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas

ELR: Nanovesiculas esterilizadas, liofilizadas y reconstituidas

EV: epidermis viable

F

F: formulación

FA: anisotropía de fluorescencia

FDA: Administración de Drogas y Medicamentos

FSC: Forward Scatter

G

GP: Polarización generalizada

H

h: hora

HA: hemaglutinina

HPTS: sal trisódica de ácido 8-hidroxipireno-1,3,6-trisulfónico

I

ID: intradérmica

IE: índice de estimulación

IF: intensidad de fluorescencia

IFN-γ: interferón gamma

IgG: inmunoglobulina

IL: interleuquina

IM: intramuscular

IMQ: imiquimod

IP: Ioduro de Propidio

L

L: nanovesiculas liofilizadas

LDH: lactato deshidrogenasa

LPS: lipopolisacáridos de Escherichia coli 0111: B4

LR: liofilización y rehidratación

LUD: liposomas ultradeformables

M

m/m: masa en masa

M1: proteína de matriz

M2: proteína de membrana

MCA: muerte celular accidentada

MCP: muerte celular programada

MCR: muerte celular regulada

MEM: medio de cultivo Modified Eagle's

MHC: Complejo mayor de histocompatibilidad

MMP metaloproteinasas de matriz

MPL: monofosforil lípido A

MTT: 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolio bromuro

N

n.s.: no significativo

NA: neuraminidasa

NMSC: cánceres de piel no melanoma

NP: nucleoproteína

O

OVA: ovalbúmina

P

p/p: peso en peso

PALS: análisis de dispersión de luz de fase

PAMP: patrones moleculares asociados a patógenos

PBS: buffer fosfato salino

PBST: PBS con 0,05% v/v de Tween 20

pdi: índice de polidispersidad

PG: ácido diglicosildifitanilgliceroldieter sulfónico (SDGD-5PA), fosfatidilglicerol

PGP-Me: fosfatidilglicerolfosfato metiléster

PL: fosfolípido

PRR: receptores de reconocimiento de patrones

PS: fosfatidilserina

R

R: nanovesículas reconstituidas

RhPE: LissaminaTM rhodamina B 1,2-dihexadecanoil-sn-glicero-3fosfoetanolamina, sal de trietilamonio

RPMI: medio de cultivo Roswell Park Memorial Institute 1640

S

SALT: tejido linfoide asociado a la piel

SC: estrato córneo

sc: subcutáneo

SCC: carcinomas de células escamosas

SDGD: diglicosildifitanilglicerol sulfato 1-O- [α-D-manosa- (2'-SO3H) -1

'→ 2'] - α-D-glucosa] -2, 3-di-O-fitanil-sn-glicerol CD: congelamiento y

descongelamiento

SFB: suero fetal bovino

SI: índice de estimulación

Sp: sin pico

SPC: fosfatidilcolina de soja

ssARN: ARN monocatenario

TC: transcutánea

T

TEM: microscopia electrónica de transmisión

Th: linfocito T helper

TIMP: inhibidores tisulares de las metaloproteinasas

TLR: receptores tipo Toll

Tm: temperaturas de transición de fase

TNF: factor de necrosis tumoral

U

u.a.: unidades de absorbancia

V

v/v: volumen/volumen

VA: virus atenuado

VIC: virus inactivado completo

VPH: virus del papiloma humano

ΔHCal: cambio de entalpia

∆H: entalpias de fusión

Resumen

El objetivo general de esta tesis doctoral fue evaluar la capacidad de nanovesículas ultradeformables conteniendo arqueolípidos (AUD) de funcionar como adyuvantes tópicos. Es decir, por un lado, que puedan desencadenar una respuesta inmune antígeno especifica humoral, celular y de memoria tras su aplicación tópica al combinarlos con diferentes antígenos. Por otro lado, que cumplan con ser seguros, eficaces, estables, que no requieran cadena de frio para su almacenamiento, que se puedan producir por procesos simples y que se puedan mezclar con el antígeno antes de su administración.

Previamente mostramos que AUD preparados a partir de arqueolípidos polares totales (APT) extraídos del arquebacteria hiperhalófila *Halorubrum tebenquichense*, fosfatidilcolina de soja (SPC) y colato de sodio (ColNa) (3:3:1 p/p) aplicados tópicamente pueden penetrar el estrato corneo (SC) e inducir títulos de IgG séricos antígeno-específicos.

En el **Capítulo 2,** en primer lugar, estudiamos la estabilidad coloidal y perdida del contenido interno de AUD sometidos al estrés producido por cambios de temperatura, y la comparamos con la estabilidad de liposomas ultradeformables convencionales carentes de APT (LUD, SPC:ColNa 6:1 p/p). Luego se evaluó la estabilidad de AUD y LUD sometidos a esterilización por autoclave y se puso a punto un proceso de liofilización con el objeto de obtener un producto estéril y seco. La hipótesis fue que los APT les brindarían mayor estabilidad estructural a las bicapas frente a diferentes procesos por sobre vesículas carentes de APT.

Los liposomas sufren cambios estructurales significativos cuando son calentados, por ejemplo, liposomas de SPC y colesterol o liposomas peguilados incrementan sustancialmente su tamaño y pierden su contenido interno cuando son autoclavados. Aquí hallamos que AUD, a diferencia de LUD pueden ser calentados sin perder su estabilidad coloidal: autoclavados o incubados por 6 h a 80 °C, mantienen su tamaño, aunque pierden su contenido acuoso.

La liofilización es el método estándar para remover el agua y así prolongar la vida media de las formulaciones liposomales al almacenamiento. Previamente habíamos reportado que debido al contenido de colato de sodio, los

LUD no pueden ser liofilizados, aún en presencia de altas concentraciones de sacarosa (10 y 20 % p/v). Especulamos que el contenido del disacárido manosa-glucosa (0,072 % p/v provisto por el 8,2 % p/p del SDGD-5 en la mezcla de APT) sumado a la alta carga negativa (provista por el 55 % p/p de PGP-Me en la mezcla de APT) podrían proteger a los AUD frente a la liofilización. Esta asunción resultó parcialmente correcta: los AUD fueron más estables que los LUD al congelamiento, pero no a la deshidratación durante la liofilización. Los resultados sugieren que los APT son en parte crioprotectores, pero no lioprotectores. La crioprotección total se alcanzó agregando bajas cantidades de glucosa (0,07 % p/v) y glicerol (2,5 % v/v). Finalmente, la estabilidad coloidal tanto de las suspensiones como de los liofilizados tras 5 meses de almacenamiento a 4 y 40 °C mostró que AUD permanecieron sin cambios, en contraste LUD se agregaron.

En suma, demostramos que los APT le confieren a los AUD estabilidad frente a esterilización por autoclave y almacenamiento en ausencia de cadena de frio. Los APT, sin embargo, fueron insuficientes para proteger a los AUD de la liofilización, lo que requirió la adición de glicerol y glucosa.

A continuación, evaluamos las estrategias de administración de antígeno y adyuvante (encapsulación en el interior acuoso, adsorción superficial o administración separada) sobre la respuesta inmune generada tras la administración tópica en modelos animales y finalmente evaluamos la conservación de las propiedades adyuvantes de AUD luego de ser esterilizados y liofilizados.

Sorprendentemente, no hallamos diferencias en la magnitud ni duración de la respuesta medida como títulos de IgG séricos totales tras la administración de ovoalbúmina (OVA) incluida en el espacio acuoso interno de los AUD o adicionada externamente. La administración separada en el tiempo de AUD y OVA, en contraste, generó menor respuesta. Estos resultados sugieren que no es necesaria la incorporación del antígeno en los AUD para desencadenar la respuesta inmune sistémica, pero sí es necesaria la mezcla de ambos para su aplicación.

El proceso de liofilización no modificó la respuesta inmune generada tras la aplicación tópica de AUD. Por último, el *screening* de la activación de esplenocitos mostró que no se consiguió una activación celular antígeno

específica, sin embargo, AUD produjo mayor número de esplenocitos y liberación de IFN-γ, tanto estimulados con concanavalina A como con OVA, que LUD. Esto significaría que los AUD, aunque no son inmunogénicos *per se*, causarían un tipo de estímulo general inespecífico de la inmunidad celular una vez asociados a un antígeno.

En definitiva, se logró obtener una formulación estéril, seca y estable, que no requiere del uso de cadena de frío, lista para usar tópicamente que puede ser mezclada con el antígeno de interés en el momento de su administración, para la generación de reacción antígeno específica.

La respuesta inmune producida por AUD, sin embargo, es menor a la alcanzada mediante la administración parenteral de vesículas hechas completamente de APT y los títulos del isotipo IgG2a son menores que los del isotipo IgG1, lo que sugiere una respuesta más del tipo humoral (Th2) que celular (Th1). La mayoría de las enfermedades generadas por virus o bacterias requieren de una inmunidad celular además de humoral y de memoria. Por lo tanto, en el **Capítulo 3** se incorporó el inmunomodulador imiquimod (IMQ) a la estructura de los AUD para incrementar la respuesta de tipo celular. Nuestra hipótesis fue que la combinación de la penetración en la piel y el direccionamiento específico a células presentadoras de antígenos (CPA) de AUD con la actividad inmunomoduladora de IMQ mejoraría la respuesta inmunogénica tras su aplicación tópica, comparada con la generada por AUD sin IMQ e IMQ libre.

En el **Capítulo 3** preparamos y caracterizamos AUD incorporando y asociando IMQ a su estructura y evaluamos su captura, citotoxicidad y capacidad de inducir la liberación de citoquinas proinflamatorias en macrófagos y queratinocitos, su penetración en piel humana y sus propiedades adyuvantes *in vivo* utilizando OVA como antígeno modelo.

El IMQ, es un ligando sintético del receptor intralisosomal TLR7 aprobado por la agencia regulatoria estadounidense (FDA) para el tratamiento tópico de la queratosis actínica, el carcinoma de células basales superficial y neoplasmas de piel inducidos por virus. IMQ induce la producción de ciertas citoquinas como IFN-γ, TNF-α, IL-1β, IL-6, IL-8 y IL-12 en células inmunes como monocitos/macrófagos, células dendríticas, células B, queratinocitos y

granulocitos. IMQ produce la movilización rápida de las células dendríticas plasmacitoides y la activación de sus funciones citotóxicas. Aplicado tópicamente, IMQ induce la maduración de células de Langerhans y estimula la migración de CPA hacia los nódulos linfáticos donde promueven una respuesta celular específica. El IMQ, sin embargo, es prácticamente insoluble en solventes tanto hidrofóbicos como hidrofílicos. Sólo es soluble en soluciones acuosas ácidas (pH 2), en ácido láctico y ácidos grasos como ácido oleico, esteárico y linoleico. Por este motivo, no es posible la incorporación de IMQ en grandes cantidades en las nanovesículas ultradeformables. Considerando ese aspecto, sumado a que las drogas no necesariamente deben estar encapsuladas en el interior de las nanovesículas ultradeformables para penetrar el estrato corneo, preparamos AUD y LUD con IMQ en dos pasos: 1) IMQ disuelto en ácido linoleico se incorporó en la matriz/especio interno de las vesículas (AUD_1 y LUD_1); 2) inmediatamente antes de su uso AUD_1 y LUD_1 se suplementaron con IMQ disuelto en ácido láctico (AUD_2 y LUD_2).

AUD_2 y LUD_2 tuvieron un pH de 5,5 compatible con una formulación de uso tópico y no presentaron precipitado de IMQ. AUD_2 presentó un tamaño de 250 ± 94 nm y potencial Z de -26 ± 4 mV, mientras que LUD_2 presentó un tamaño de 280 ± 160 nm y potencial Z de -14,4 ± 4 mV. Estudios de deformabilidad y análisis del orden y fluidez de las bicapas realizado con la sonda Laurdan mostraron que parte del IMQ se incorporó en el espacio acuoso interno de las vesículas y parte se asoció electrostáticamente con la superficie de carga negativa de los AUD_1 y en menor medida con los LUD_1.

A continuación, estudiamos la captura de AUD_2 y LUD_2 en macrófagos murinos (células J774A.1 como modelo de CPA) y queratinocitos (células HaCaT, principal tipo celular de la epidermis) utilizando vesículas con una doble marca fluorescente (rodamina-PE como marca de la bicapa lipídica y HPTS/DPX como marca del espacio acuoso interno) por citometría de flujo. Encontramos que AUD_2 fueron más internalizados que LUD_2 por los macrófagos, debido que APT son ligandos específicos de receptores *scavenger* de tipo A, expresados en células fagocíticas y CPA. Adicionalmente, hallamos que AUD_2, una vez internalizadas, se libera su contenido acuoso de modo tal de incrementar la disponibilidad de IMQ intracelularmente. El IMQ es entonces reconocido por el

receptor de TLR7 intraendosomal y es capaz de iniciar la secreción de citoquinas proinflamatorias. En queratinocitos, ambas formulaciones fueron internalizadas en menor magnitud que en los macrófagos, merced su interacción con el receptor de adenosina A_{2A} superficial, encontrándose mayor captura tras la incubación con AUD_2.

A continuación, evaluamos la citotoxicidad e inducción de liberación de citoquinas proinflamatorias de IMQ libre, AUD_2 y LUD_2 en células J774 y HaCaT. La viabilidad de los macrófagos descendió en forma dosis- y tiempo-dependiente tras la incubación con IMQ libre, AUD_2 y LUD_2, resultando igualmente toxicas: a ≈ 8,5-13 µg/ml IMQ se redujo 85-90 % la viabilidad tras 48 h de incubación. Por otro lado, la viabilidad de los queratinocitos descendió solo tras la incubación con AUD_2 y LUD_2: 13,3 µg/ml y 4,7 µg/ml IMQ de AUD_2 y LUD_2, respectivamente redujeron 50% la viabilidad de células HaCaT tras 48 h de incubación. En macrófagos, el IMQ libre, así como AUD_2 y LUD_2 (a concentraciones no citotóxicas) indujeron la misma producción de IL-6 que fue menor a la inducida por lipopolisacárido (LPS); sin embargo, AUD_2 indujo significativamente mayor cantidad de TNF-α que el resto de las muestras incluyendo LPS. Por otro lado, en células HaCaT, AUD_2 indujo mayor cantidad de IL-6 que el resto de las formulaciones, aunque ninguna indujo la producción de TNF-α.

Estos resultados sugieren que debido al mayor *delivery* del IMQ intraendosomal en los macrófagos y la mayor interacción con el receptor superficial de adenosina A_{2A} en queratinocitos, AUD_2 indujo mayor cantidad de citoquinas proinflamatorias que IMQ libre y LUD_2.

Tras realizar la caracterización fisicoquímica, y el estudio de citotoxicidad, captura y liberación de citoquinas proinflamatorias, evaluamos la penetración del IMQ en forma libre y como AUD_2 y LUD_2 en explantos de piel humana. La acumulación total del IMQ en la piel fue 3 veces mayor cuando se aplicó como AUD_2 (30 ± 8 $\mu g/cm^2$) que como LUD_2 (10 ± 3 $\mu g/cm^2$) y 1,5 veces mayor que como IMQ libre (20 ± 6 $\mu g/cm^2$).

Finalmente evaluamos la respuesta inmune generada tras la aplicación tópica de IMQ, AUD_2 y LUD_2 utilizando OVA como antígeno modelo. AUD_2 y LUD_2 indujeron mayores títulos de IgG en comparación con IMQ libre. Además,

mientras que IMQ libre no produjo isotipos IgG2a, la relación IgG2a/IgG1 (indicativa de la polarización Th1/Th2 en ratón) de LUD_2 fue ~ 0,5, similar a la obtenida previamente (Capitulo 2) para AUD (sin IMQ), lo que sugiere una respuesta de tipo humoral. AUD_2, por otro lado, indujo una relación de isotipos ~1, sugiriendo una respuesta mixta humoral/celular. Adicionalmente, evaluamos el efecto de la vacunación sobre la inmunidad celular, midiendo la liberación de IFN-γ y el índice de estimulación (IE) de los esplenocitos de los ratones vacunados re-estimulados con el antígeno (OVA). Los títulos de INF-γ normalizados por el IE de los esplenocitos de los ratones inmunizados con AUD_2 fueron significativamente mayores que los correspondientes al resto de los grupos. En contraste los animales inmunizados con IMQ libre indujeron bajos títulos de INF-γ, mientras que los inducidos por LUD_2 se hallaron debajo del límite de detección. En suma, los resultados sugieren que solo AUD_2 indujo una respuesta de tipo celular.

Por último, AUD_1 permaneció estable coloidalmente por hasta 5 meses de almacenamiento a 4°C. La estabilidad de LUD_1, en contraste, se perdió más rápidamente, luego de 1 mes de almacenamiento.

A continuación, en el **Capítulo 4** evaluamos la capacidad de AUD_2 aplicado tópicamente de inducir inmunidad contra antígenos de influenza. Nuestra hipótesis fue que debido a las propiedades adyuvantes AUD_2 podría mezclarse en el momento de su administración con una vacuna comercial y aplicado tópicamente inducir respuestas inmunes que podrían ser similares a la obtenida a la administración parenteral, reduciendo así las desventajas del uso de aguas y jeringas (seguridad, disconformidad, necesidad de personal capacitado y rápida disponibilidad ante la necesidad de vacunaciones masivas en casos de pandemias).

En este Capítulo, se evaluaron dos aspectos diferentes: i) la actividad del inmunomodulador IMQ como adyuvante, para lo que se observó si hay inducción de variaciones en el tipo y/o magnitud de la respuesta obtenida y ii) la *performance* de la administración tópica con respecto a la administración parenteral de la vacuna comercial. Para ello, se midió la respuesta inmune tras la aplicación tópica de IMQ, AUD vacíos, AUD + IMQ, AUD_1 y AUD_2 mezclados

con una vacuna estacional comercial contra influenza sin adyuvante (Nilgrip, HA) y se comparó con la vacuna subcutánea.

En primer lugar, hallamos que si bien la presencia de IMQ no indujo diferencias significativas en cuanto a los títulos de IgG séricos antígeno-específicos respecto de vesículas sin IMQ, su presencia moduló el tipo de respuesta, lo que se puso de manifiesto tras la administración de AUD_2, la formulación que más cantidad del inmunomodulador posee. Encontramos que su administración tópica indujo la generación de una relación de isotipos IgG2a/IgG1~1 y, además, la liberación de cantidades de INF-γ significativamente altas. Estos resultados, sugieren que AUD_2 induce una respuesta de tipo celular que no se manifiesta con la aplicación tópica de AUD sin IMQ.

Por otro lado, hallamos que la vacuna subcutánea comercial y la aplicación tópica de AUD_2 mezclados con la vacuna, aunque no la vacuna tópica mezclada con IMQ, produjeron títulos de IgG séricos totales similares y relación de isotipos IgG2a/IgG1~1. Remarcablemente, los esplenocitos de los animales vacunados tópicamente mostraron mayor IE y liberación de mayor cantidad de INF-γ que los vacunados subcutáneamente.

Adicionalmente, evaluamos si el sitio de administración podría modificar la respuesta tras la administración tópica. Hallamos que tanto la administración en las axilas, donde se encuentra una gran población de ganglios linfáticos, como en el lomo generó la misma magnitud y tipo de respuesta.

Estos resultados sugieren que, al menos en términos de las medidas realizadas, la aplicación tópica de AUD con IMQ podría ser una opción a la vacunación subcutánea.

Finalmente, en el **Capítulo 5** estudiamos la actividad antitumoral de AUD_2 contra melanoma. Nuestra hipótesis fue que la actividad pro-apoptótica TLR-7 independiente antitumoral del IMQ podría incrementarse o modificarse incorporado o asociado a AUD.

En primer lugar, medimos la citotoxicidad utilizando el método de MTT y liberación de lactato deshidrogenasa (LDH) de IMQ libre, AUD_2 y LUD_2 como indicativos de la actividad metabólica y la integridad de la membrana citoplasmática de células de melanoma humano (Sk-Mel-28), respectivamente.

A continuación, estudiamos la captura celular de AUD_2 y LUD_2 por células Sk-Mel-28, y determinamos la existencia de muerte celular por necrosis o apoptosis mediante el estudio de la luz dispersada por citometría de flujo y microscopia de fluorescencia tras la tinción con YO-PRO/ioduro de propidio

Hallamos que IMQ redujo 50 % la viabilidad medida por MTT, produjo un 100 % liberación LDH a 100 µg/ml tras 48 h de incubación y generó apoptosis sobre células Sk-Mel-28. La incorporación de IMQ en LUD y AUD modificó su farmacodinamia de dos modos diferentes. Por un lado, la incorporación de IMQ en LUD incrementó la toxicidad del IMQ (< 50 % de viabilidad y 80 % de liberación LDH tras 24 h a 13 µg/ml IMQ) conservando la capacidad de inducción de apoptosis del IMQ. Por otro lado, la incorporación de IMQ en AUD no incrementó la toxicidad del IMQ, aunque, produjo una toxicidad intrínseca de las matrices lipídicas (mayor a la generada por LUD_2) con un incremento de la proporción de células necróticas. Encontramos que AUD_2 fue significativamente más capturada que LUD_2 por las células Sk-Mel-28. La mayor captura de AUD en comparación con LUD, sumado al contenido de ácido linoleico y arqueolípidos podrían relacionarse con la mayor toxicidad y disrupción de la integridad de la membrana plasmática. Estos resultados sugieren que AUD_2 podrían tener un potencial en la terapia adyuvante de melanoma que sería necesario continuar investigando.

En suma, los resultados obtenidos en este trabajo de Tesis contribuyen al desarrollo de adyuvantes tópicos estables y listos para usar.

CAPITULO 1

INTRODUCCIÓN

1.1 Breve historia de la vacunación: tipos de vacunas y rutas de administración

Una de las intervenciones médicas más exitosas en la historia fue el desarrollo de las vacunas y su gran impacto en promover la longevidad y la preservación de la salud. La primera aproximación a la vacunación ocurrió en un intento por evitar la propagación de la viruela, que se expandió por el mundo en los años 400 d.C. En esa época, con nulos conocimientos en el campo de la inmunología y con el brote de la enfermedad como única experiencia, se observó que aquellos pacientes que no morían a causa de la infección, se volvían inmunes (Plotkin, 2014). A partir de ese descubrimiento, se comenzó a implementar una técnica denominada “inoculación” o “variolación”, que consistía en la administración subcutánea del virus de la viruela en individuos sanos no inmunes, para conferirles resistencia frente a la enfermedad (Riedel, 2005), procedimiento precursor a lo que hoy en día se conoce como vacunación. Aunque la variolación era eficiente, conllevaba altos riesgos de desarrollar la enfermedad, e incluso de morir (Greenwood, 2014). No obstante, la tasa de mortalidad como consecuencia de la inoculación era 10 veces menor que aquella ocasionada por la viruela natural (Riedel, 2005).

Edward Jenner es considerado el pionero de la inmunología y la vacunología, y el principal responsable de la erradicación definitiva de la viruela (Riedel, 2005). Alrededor del año 1796, Jenner descubrió que el virus de la viruela de la vaca (*cowpox*) causaba solo infecciones leves en los humanos, pero inducía una respuesta inmune efectiva contra el virus humano (*smallpox*) que proporcionaba protección cruzada contra la enfermedad (Plotkin, 2014). Asimismo, 80 años después, Pasteur y sus colegas formularon una hipótesis sobre la atenuación de microorganismos, y demostraron su utilidad. La técnica de atenuación consiste en el uso de virus o bacterias "salvajes" cuya virulencia resulta atenuada antes de su administración y no son capaces de inducir la enfermedad (Clem, 2011). Después de la inmunización, éstos patógenos pueden replicarse en el individuo receptor generando una respuesta inmune celular de gran magnitud y una elevada producción de anticuerpos. La primera prueba se realizó con *Pasteurella multocida*, el agente causal de la diarrea en pollos, que fue atenuada mediante exposición al calor (Pasteur, 1880). Los siguientes

ensayos se hicieron con ántrax en ovejas, y lo que fue más importante, con el virus de la viruela en animales y humanos (Pasteur, 1885). La primera vacuna humana contra rabia fue de patógenos atenuados y se testeó en 1885 (World Health Organization, 2013). En el siglo XX, se realizó la primera inactivación química de virus exitosa, para desarrollar una vacuna contra influenza (Thomas Jr & Magill, 1936). Luego siguieron las vacunas contra poliomelitis (Salk et al., 1954) y contra hepatitis A (Provost et al., 1986), así como contra sarampión, paperas, rubéola, varicela, y, más recientemente, rotavirus (Plotkin, 2014). Las vacunas basadas en organismos atenuados generalmente inducen una respuesta inmune fuerte y sostenida, por lo que es posible lograr una protección a largo plazo con una sola dosis relativamente pequeña. Además, generan inmunidad efectiva en las superficies de mucosas y son relativamente fáciles y baratas de fabricar. Debido a que los componentes de la vacuna están vivos, pueden propagarse a sujetos no vacunados, extendiendo el impacto de la vacunación a la comunidad en general (Greenwood, 2014). Sin embargo, es posible que se produzca una mutación de la cepa revirtiendo la atenuación y que los patógenos puedan inducir el desarrollo de la enfermedad, como sucede con la vacuna oral contra la polio, en la que aproximadamente uno de cada dos millones de receptores manifiesta síntomas de poliomielitis aguda (Greenwood, 2014). Adicionalmente, la administración de estas vacunas puede inducir el desarrollo de la enfermedad en sujetos con el sistema inmune comprometido (Greenwood, 2014), como ha ocurrido tras la administración de la vacuna contra la tuberculosis bacilo Calmette-Guérin (BCG) a pacientes inmunodeficientes, incluyendo aquellos con infección por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) (Nutall, 2011).

Una alternativa que surgió para evitar los efectos adversos de la vacunación con virus atenuados fue el desarrollo de vacunas con patógenos muertos. A principios del siglo XX se desarrollaron y utilizaron varias vacunas basadas en microorganismos muertos completos, incluidos neumococo, meningococo y bacilo tifoideo. Estas vacunas, que requerían dosis múltiples, resultaron poco inmunogénicas y con frecuencia causaron efectos secundarios significativos, por lo que dieron rápidamente paso a las vacunas de subunidades (Greenwood, 2014).

Las vacunas de subunidades son preparadas a partir de uno o más componentes del patógeno, y están compuestas de proteínas recombinantes o polisacáridos que normalmente están presentes en su estructura (Dudek et al., 2010). En términos de seguridad, ofrecen considerables ventajas sobre las mencionadas anteriormente, ya que sus componentes son altamente puros y se encuentran muy bien definidos, por lo que resultan más seguras debido a la imposibilidad de replicación y ausencia de material patogénico que puede iniciar respuestas no deseadas (Robinson & Amara, 2005). Dentro de las vacunas de subunidades se pueden encontrar dos tipos. Por un lado, las vacunas de a base de toxoides (toxinas inactivadas por tratamiento con agentes como formaldehído) que se producen contra las bacterias que liberan toxinas, que son los principales agentes causantes de la enfermedad (Kallerup & Foged, 2015). Ejemplos de éstas son contra difteria, tétanos y tos ferina. El segundo tipo de vacunas de subunidades son aquellas basadas en polisacáridos de cápsulas de bacterias, como de *Streptococcus pneumoniae*, *Neisseria meningitidis* y *Haemophilus influenzae* tipo b (Hib) (Kallerup & Foged, 2015). Alternativamente, las vacunas de subunidades pueden consistir en una o más proteínas virales o bacterianas, o fragmentos peptídicos de éstas. En algunos casos, los antígenos pueden ser suficientemente inmunogénicos por sí mismos, como sucede con la subunidad de vacuna contra influenza que comprende los dos antígenos de superficie purificados hemaglutinina (HA) y neuraminidasa (NA). Estas dos proteínas se aíslan para la vacuna contra la gripe estacional de tres cepas de virus seleccionadas, se combinan en una vacuna trivalente y son capaces de inducir una respuesta inmune efectiva. Sin embargo, en muchos casos las subunidades antigénicas carecen de varias de las características patogénicas intrínsecas, lo que hace que su inmunogenicidad sea baja, por lo que con frecuencia se requiere la administración conjunta de adyuvantes. Los adyuvantes son sustancias que, administrados junto con el antígeno, hacen más efectiva la respuesta inmune (Kallerup & Foged, 2015). Los adyuvantes ayudan a desencadenar la respuesta inmune deseada, ya sea estabilizando los antígenos, mejorando la llegada del antígeno a las CPA, mejorando el procesamiento y la presentación de antígenos por las CPA, estimulando la producción de citoquinas inmunomoduladoras deseables, y/o permitiendo una

disminución en la dosis requerida del antígeno administrado y en el tiempo de respuesta (Jalilian et al., 2013).

La mayoría de las vacunas son aplicadas por vía parenteral (principalmente intramuscular, IM y subcutánea, sc), esto implica atravesar una o más capas de la piel o de las membranas de las mucosas, mediante la utilización de agujas y jeringas, de forma que los antígenos administrados lleguen a los sitios de inducción a través de los tejidos donde se administra (Elsevier, 2017). Irónicamente, la misma acción de inyectar una vacuna lleva consigo una serie de riesgos asociados tales como: i) Seguridad: la utilización de agujas y jeringas implica un alto riesgo de transmisión de enfermedades infecciosas (Levine & Campbell, 2004) entre distintos pacientes, entre el paciente y el personal de salud que administra la vacuna o entre los pacientes y la comunidad exterior (Dicko et al., 2000; Miller & Pisani, 1999; Simonsen et al., 1999). Este riesgo está asociado en gran medida a la reutilización de agujas y jeringas sin una correcta esterilización entre pacientes, al reemplazo de agujas pero no de jeringas, o a la eliminación inadecuada del material utilizado (Ekwueme et al., 2002). ii) Disconformidad: en los países desarrollados existe la problemática del incumplimiento con los calendarios de vacunación. La fobia a las agujas y el dolor físico asociado, son fenómenos que no solo se manifiestan en los chicos, sino también en personas adultas. Aproximadamente el 20% de los niños sufren angustia grave debido a las vacunas (Jacobson et al., 2001), y un 8,2% de los adultos tienen un intenso miedo a las inyecciones (Nir et al., 2003). iii) Necesidad de personal capacitado y velocidad de administración: para administrar vacunas parenterales, es necesario disponer de personal capacitado que sea capaz de manipular correctamente agujas y jeringas. En caso de epidemias o pandemias es necesario llevar a cabo una vacunación masiva y rápida que es poco compatible con los actuales métodos de aplicaciones parenterales. Además, en algunos países en desarrollo, la cantidad de personal médico capacitado para realizar estos procedimientos es escasa (Giudice & Campbell, 2006). Adicionalmente el músculo y el tejido subcutáneo contienen muy pocas células presentadoras de antígenos (CPA), encargadas de iniciar la respuesta inmunológica.

Las desventajas de las vacunas inyectables han impulsado a la búsqueda de rutas de administración alternativas para conseguir vacunas más efectivas y seguras, por ejemplo, inmunización por vía mucosa como nasal (Slutter et al., 2008), oral (Simerska et al., 2009) o pulmonar (Lu & Hickey, 2007) y por vía cutánea o tópica (Bal et al., 2010; Romero & Morilla, 2016)

La administración tópica implica la administración de la vacuna a través de la piel. Una de las grandes ventajas del uso de la piel como vía de vacunación es la gran cantidad de células inmunes innatas residentes que permite obtener una respuesta inmune de igual magnitud que la lograda tras las administraciones clásicas parenterales, aunque potencialmente con una menor cantidad de antígenos (Teunissen et al., 1997). Una menor dosis de antígeno permitiría reducir el costo de salud global y mejorar la cobertura en países de bajos ingresos.

1.2 Estructura de la piel

La piel es el órgano más grande del cuerpo humano con una superficie aproximada de 2 m^2 y funciona como una barrera protectora contra la entrada de material extraño y la posible invasión de patógenos. Su grosor varía considerablemente en las distintas partes de cuerpo, siendo más gruesa en las palmas y plantas, mientras que es más delgada en los parpados. Bajo condiciones fisiológicas normales, la piel contiene numerosas células inmunes centinelas que son capaces de atacar agentes extraños como hongos, bacterias y virus para mantener la integridad de los tejidos cutáneos (Combadiere & Liard, 2011).

Desde un punto de vista estructural, la piel está formada por tres capas. Desde la capa más externa hacia la más interna podemos mencionar a la epidermis, la dermis y la hipodermis (Figura 1.1). La epidermis posee un grosor que varía de 50 a 150 µm y está formada por varias capas estratificadas y escamosas de queratinocitos. Su parte más interna está compuesta por células vivas que componen 3 estratos: el estrato basal o germinativo, el estrato espinoso, y el estrato granuloso. La capa más externa, la más gruesa de la epidermis, es el estrato córneo (*SC*) y está formado por múltiples capas de queratinocitos muertos, llamados corneocitos (entre 4 y 20 capas celulares,

según el sitio del cuerpo) (Barry, 1991). La función principal del *SC* es proteger el organismo de las agresiones externas, asegurando la cohesión de las células epiteliales, unidas entre sí por estructuras intercelulares llamadas desmosomas (que enlazan los microfilamentos y microtúbulos de los citoesqueletos de queratinocitos adyacentes) y produciendo queratina, una proteína fibrosa resistente (Barry, 1991). Los queratinocitos comprenden el 80% de todas las células epidérmicas. Desde el estrato basal, la capa más profunda de la epidermis, hasta la superficie, los queratinocitos son sometidos a diferentes cambios morfológicos y bioquímicos sustanciales, hasta que mueren por un mecanismo apoptótico altamente especializado y se eliminan por descamación. Además, en la epidermis se encuentran melanocitos, células de Merkel y células de Langerhans (CL). Estas últimas componen un 3-5% de todas las células epidérmicas, forman una red alrededor de los queratinocitos debajo del *SC* y juegan un rol fundamental en el funcionamiento inmunológico de la piel (Mulholland et al., 2006; Tang et al., 1993; Valladeau & Saeland, 2005). En general, entre un 2 y 3% de las CL circulan normalmente desde la piel hacia los ganglios linfáticos, incluso en ausencia de señales inflamatorias. Esta circulación permite un monitoreo continuo del ambiente cutáneo y contribuye a hacer de la piel un objetivo potencial para la vacunación (Barry, 1991). Dentro de la epidermis también se encuentran células T efectoras/ de memoria, principalmente células T CD8+ citotóxicas que contribuyen a la rápida respuesta celular antígeno-específica en la piel (Clark, 2010). La epidermis no posee vascularización, es decir, no existen bazos sanguíneos ni linfáticos. La conexión con la dermis se da en un área de adhesión llamada unión dermo-epidérmica, una membrana basal compuesta por colágeno, glicoproteínas estructurales, y proteoglicanos.

La dermis es un tejido denso, fibroso y elástico que sirve como soporte sólido para la piel. Sus principales componentes celulares son: (a) fibroblastos, que sintetizan componentes de la matriz extracelular y secretan citoquinas necesarias para llevar a cabo mecanismos de inmunidad cutánea (IL-6, involucrada en la activación de células dendríticas (CD) y TGF-β, responsable de la maduración de los precursores de CL) y (b) subpoblaciones de CD, macrófagos, mastocitos y células T de memoria (CD4+ y CD8+) (Nakanishi et al., 2009). La dermis se encuentra altamente vascularizada, lo que facilita el

reclutamiento de células inmunes como neutrófilos, monocitos, CD y células T de memoria.

Finalmente, uno de los sitios más utilizados para la distribución de drogas y vacunas es la hipodermis o tejido subcutáneo. Está conectado a la parte inferior de la dermis mediante fibras de colágeno extensas y está compuesta principalmente por fibroblastos y adipocitos. La presencia de estos adipocitos permite que las vacunas administradas se mantengan en el sitio de aplicación por más tiempo debido a un mecanismo de depósito (Lambert & Laurent, 2008). La vascularización presente permite el reclutamiento de células inmunes, aunque, en contraste con la epidermis y la dermis, la hipodermis se encuentra naturalmente desprovista de células inmunes.

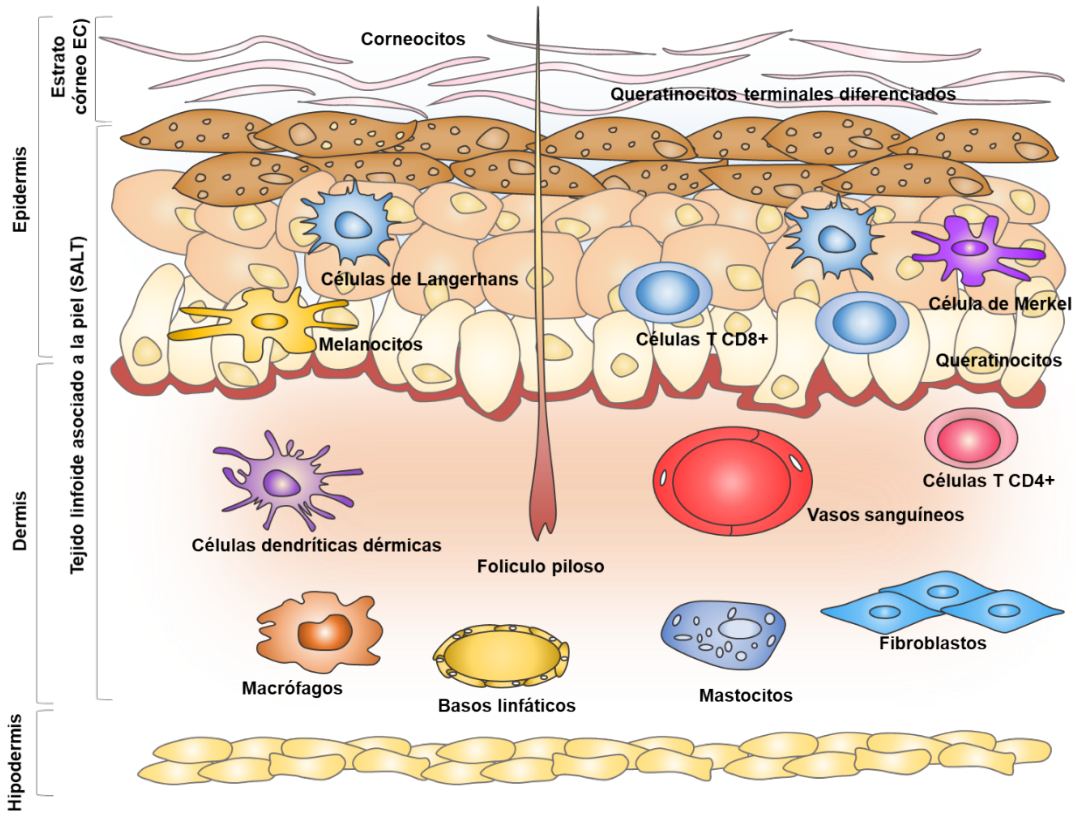


Figura 1.1 Estructura y composición de la piel. Imagen adaptada de Streilein 1983
CPA: CD residentes de la piel, CL, CDd y células T CD8+

1.2.1 La barrera principal del estrato córneo

La principal barrera a la penetración de sustancias es el SC. Análogamente a un modelo que se asemeja a una pared formada por ladrillos y cemento, el *SC* está básicamente formado por células muertas rellenas de queratina fuertemente unidas (quienes serían los ladrillos) embebidos en un mar de lípidos organizados en lamelas (el cemento). En los seres humanos, el *SC* es una capa transparente de 5-20 µm de espesor, que consiste en queratinocitos muertos, los corneocitos. Estos son células planas, casi coplanares, con un grosor de 0,3-0,5 µm que se apilan verticalmente en columnas penta o heptagonales. Cada columna contiene entre 15 y 22 capas celulares (Holbrook et al., 1974). Los corneocitos se agrupan formando estructuras de 100 a 250 µm de diámetro, separados por pliegues microanatómicos de 10 a 25 µm de ancho llamados cañones (Carrer et al., 2008). Estos cañones ocasionalmente se extienden hasta profundidades comparables a las de la unión dermo-epidérmica. Los corneocitos están llenos de filamentos de queratina, agua y el factor de hidratación natural (Harding et al., 2000) y están rodeados por una capa de proteína densamente reticulada, la envoltura celular. Una monocapa de lípidos está ligada químicamente a la envoltura celular (Rawlings, 2003) y sirve como interfaz entre los corneocitos hidrófilos y la matriz lipídica extracelular lipófila. Los corneodesmosomas interconectan los corneocitos y desempeñan un papel importante en la cohesión del *SC*. Los corneocitos están embebidos en una matriz lipídica (ceramidas, ácidos grasos saturados de cadena larga, colesterol, y pequeñas cantidades de colesterolsulfato, glucosilceramidas y esteres de colesterol organizados en fases lamelares de una periodicidad típica (6 y 13 nm), y ordenados en empaquetamientos laterales de tipo fases liquidas, hexagonales o ortorrómbicas). Esta matriz lipídica previene la desecación de los tejidos que están por debajo evitando la perdida de agua y limitando la penetración de sustancias del ambiente exterior.

La pérdida de células del *SC* se compensa con el crecimiento celular en el estrato basal. De esta manera, el grosor de la epidermis permanece relativamente constante (Simpson et al., 2011).

La concentración de agua disminuye desde alrededor del 75% en la epidermis viable hasta un 10-30% en una superficie expuesta al aire (Boncheva

et al., 2009). El pH de la superficie de la piel es predominantemente inferior al neutro y, por lo general, ligeramente superior a 5 en humanos (Matousek et al., 2002).

1.3 Función inmunológica de la piel

Además de la función de barrera, la piel tiene funciones inmunológicas importantes. Las CL, CD dérmicas (CDd), los subsets de linfocitos T y nódulos linfáticos ubicados estratégicamente, constituyen el tejido linfoide asociado a la piel (SALT-skin associated lymphoid tissue) (Streilein, 1983). Streilen fue el primero en mencionar que existen diferentes tipos de células inmunes que se desplazan continuamente desde la piel hasta los ganglios linfáticos y la circulación sanguínea periférica para proporcionar una óptima vigilancia de los tejidos periféricos. Esto hace de la piel un sitio de inducción capaz de generar tanto inmunidad innata como adquirida antígeno-especifica (Bos & Kapsenberg, 1993).

Cuando ocurre la disrupción de la barrera de la piel e ingresa un microorganismo se desencadena una respuesta inmune innata y/o adaptativa. La respuesta inmune innata provee una defensa rápida, pero de corta duración contra infecciones, mientras que la adaptativa puede generar respuestas de memoria y por lo tanto es más efectiva ante un encuentro posterior con el mismo antígeno (Bal et al., 2010).

1.3.1 Inmunidad innata

La inmunidad innata es una respuesta inmune temprana que se manifiesta en contra de infecciones de una forma no específica mediante una serie de elementos tales como fiebre, el sistema de complemento, células fagocíticas y *natural killers* (NK), anticuerpos naturales y péptidos antimicrobianos (Bal et al., 2010) (Figura 1.2).

Los queratinocitos juegan un rol principal en los eventos tempranos de la respuesta inmune de la piel. En caso de una señal de peligro, como la disrupción de la barrera del *SC*, inducen la liberación de una gran cantidad de

citoquinas, quimioquinas y péptidos antimicrobianos para reclutar células inmunes y atacar a un posible patógeno (Matzinger, 2002). Un ejemplo de esto es la migración y maduración de CL que se inicia por la citoquina pro-inflamatoria interleuquina 1β (IL-1β) y el factor de necrosis tumoral alfa (TNF-α) liberados por queratinocitos (Kissenpfennig & Malissen, 2006; Sugita et al., 2006). También se ha reportado que los queratinocitos pueden actuar como CPA no profesionales, a través de la expresión de moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad de tipo II (MHC II) (Nickoloff & Turka, 1994).

Además de los queratinocitos, los neutrófilos, macrófagos, mastocitos y NK secretan citoquinas que influyen en la maduración de CD. Las CD residentes de la piel, CL y CDd junto con los macrófagos reclutados de la circulación sanguínea, ejercen su rol centinela procesando los patógenos potenciales que invaden la piel. Las CD inmaduras pueden ser activadas por agentes derivados de patógenos gracias a la unión especifica de dichos agentes con receptores de reconocimiento de patrones (PRRs) (Banchereau & Steinman, 1998), siendo los receptores tipo toll (TLR) los más importantes. Los TLR permiten identificar componentes bacterianos específicos, conocidos con el nombre de PAMPs (productos bacterianos asociados a patrones). Así, TLR-4 reconoce lipopolisacáridos, TLR-1 peptidoglucano, TLR-5 flagelina, TLR-9 motivos de ADN, TLR-3 ARN de simple cadena, y TLR-7 ARN de doble cadena (Combadiere & Liard, 2011). Cuando se activan, los TLR reclutan moléculas dentro del citoplasma de las células para propagar una señal que conduce a la inducción o supresión de genes que orquestan una respuesta inflamatoria (Bal et al., 2010). Particularmente, el reconocimiento de PAMPs promueve la producción de TNF-α e IL-1β, que emiten las señales necesarias para que CL y CD migren a través de los vasos linfáticos y se acumulen en los nódulos linfáticos para el desarrollo de respuestas inmunes específicas (Cumberbatch et al., 1995, 1996, 1997, 1999). Al igual que los queratinocitos, CL y CDd expresan algunos TLR, que también contribuyen al mantenimiento del ambiente inflamatorio. A través de la producción de grandes cantidades de citoquinas, estos receptores juegan un papel importante en la activación de CDd. Es por esta razón que algunos preparados de vacunas incluyen agonistas de TLR como adyuvantes, para recrear la activación de CD por PAMPs en el sitio de inyección. Las CD activadas,

madurarán aumentando su capacidad de procesamiento y presentación de antígenos.

1.3.2 Inmunidad adaptativa

La inmunidad adaptativa proporciona una protección patógeno-específica de larga duración en el hospedador. Al igual que en otros sitios inmunológicos del cuerpo, las CD son un nexo muy importante entre la inmunidad innata y la adaptativa (Bal et al., 2010) (Figura 1.2). Una vez activadas, las CD maduran y migran hacia los nódulos linfáticos, donde presentan epítopes vía MHC I y II a las células T CD8+ y CD4+, respectivamente (Banchereau & Steinman, 1998). La respuesta inmune adaptativa comienza con la activación y polarización de linfocitos a través de la interacción entre las CD y células T, seguida por la proliferación de linfocitos T y B en los órganos linfoides secundarios. Estas dos células se desarrollan a partir de un progenitor linfoide común en la médula ósea. Las células T luego se diferencian en células T CD4+ (*helper* o células Th) o CD8+ (citotóxica). El reconocimiento de antígenos por parte de linfocitos B y T maduros se diferencia del reconocimiento de antígeno de las células del sistema inmune innato en que, mientras éste último reconoce motivos conservados mediante PRRs, cada receptor de células B o T maduras reconoce específicamente un epítope único (Bal et al., 2010).

La activación de las células T no depende solo del reconocimiento específico del antígeno presentado por las CPA, sino que también son necesarias la interacción de moléculas co-estimulatorias (CD80 y CD86 de CPA, con CD28 de células T), la secreción de citoquinas estimulantes (IL-2) y una señal polarizada (ej, IL-4 e interferon-γ (IFN-γ)) (Kapsenberg, 2003; Ueno et al., 2007). El reconocimiento inicial de TLR por CPA contribuye a este proceso de activación. Como se mencionó anteriormente, hay dos tipos de linfocitos efectores T, las células Th (o CD4+) y las CD8+. Asimismo, las células Th se pueden clasificar en otros subtipos, siendo los más estudiados las células Th1 y Th2. La mayoría de los productos bacterianos y virales, incluidos muchos de los ligandos de TLR, inducen la diferenciación a un subtipo Th1 (Agnello et al., 2003; Janeway Jr & Medzhitov, 2002). Estas células secretan citoquinas IL-2 e INF-γ y

estimulan la producción de anticuerpos IgG2a en ratones (IgG1 en humanos), promoviendo la inmunidad celular contra patógenos intracelulares (Mosmann & Coffman, 1989). En cambio, en presencia de parásitos y alérgenos, las células Th se diferencian en Th2. Las citoquinas producidas por estas células, incluyendo IL-4, IL-5 e IL-13, median la inmunidad humoral (mediada por anticuerpos) y estimulan la producción de IgG1 y subclases IgE en ratones (Chtanova et al., 2004; Langenkamp et al., Sallusto, 2000; Steinman, 2007).

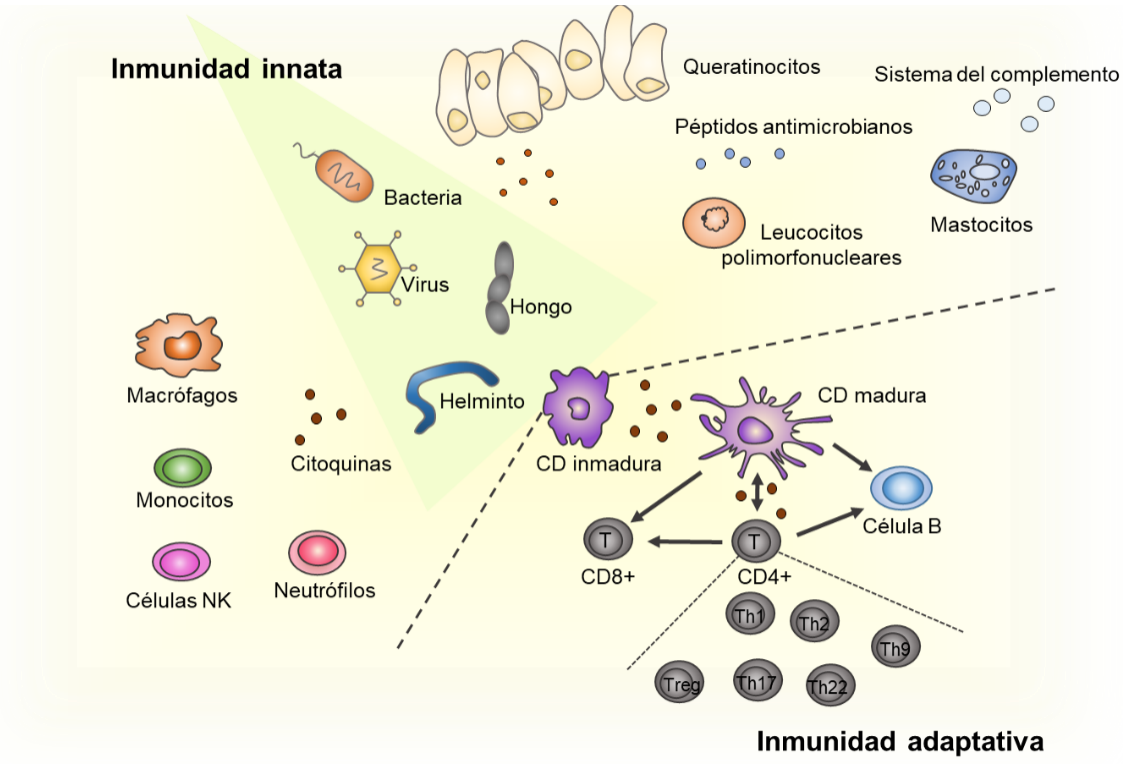


Figura 1.2 Representación esquemática de las células involucradas en la respuesta inmune adaptativa e innata. Frente a una infección con un patógeno, la respuesta de las células de la inmunidad innata conduce a la activación de las CD, las que forman un puente entre la inmunidad innata y adaptativa. Las células de la respuesta inmune adaptativa proveen especificidad hacia el patógeno y protección de larga duración. Figura adaptada de Bal et al., 2010.

La principal función de las células T CD8+ es eliminar células tumorales o células infectadas por virus o bacterias intracelulares. Las células *naive* CD8+ se convierten en células T citotóxicas cuando son activadas por CD presentadoras de antígeno en el contexto del MHC I en los nódulos linfáticos. Una vez activadas, migran de vuelta a los sitios de infección para eliminar células infectadas o tumorales. La activación de una respuesta en células T CD8+ es el principal mecanismo de acción de las vacunas desarrolladas para terapias contra cáncer (Bal et al., 2010).

La respuesta inmune humoral está mediada por linfocitos B, que reconocen antígenos libres solubles en la sangre o la linfa, a través de inmunoglobulinas IgM o IgD que funcionan como receptores. En la mayoría de los casos, la activación de las células B requiere no solo del reconocimiento de antígenos sino además de la presencia de citoquinas producidas por las células Th activadas. Las células B pueden tomar antígenos y presentarlos a células T CD4+ mediante el MHC II. La interacción entre células B y células T CD4+ provoca que ambas células se estimulen mutuamente, mediante un efecto sinérgico logrando la activación de un número mayor de células T y la producción de anticuerpos (Kelsoe, 2000). Estos anticuerpos colaboran en la destrucción de los microorganismos, uniéndose a ellos y marcándolos para que sean fagocitados.

1.3.3 Células dendríticas, nexo entre inmunidad innata y adaptativa

Las CD son el nexo entre las respuestas innata y adaptativa. No solo controlan el entorno, sino que además procesan los antígenos y experimentan procesos de maduración y diferenciación. En la piel, esta diferenciación de CL y CDd, incluye un aumento en la expresión de MHCs y moléculas coestimulatorias, un incremento en la expresión de citoquinas como IL-1β, IL-6 e IL-12, y una mayor migración de estas células desde la piel hasta los nódulos linfáticos de drenaje (Piqueras et al., 2006; Renn et al., 2006) En estos nódulos, las CD derivadas de la piel llevan a cabo la presentación de los antígenos del patógeno procesados, y liberan un estímulo de activación para los linfocitos T *naive* circundantes (Medzhitov, 2000, 2001). Esto ocurre de una forma antígeno-específica y resulta en la expansión de las células T en células inmunes extremadamente potentes, capaces de controlar el desarrollo de la inmunidad adaptativa (Medzhitov & Janeway Jr, 1997).

Existen diferentes tipos de CD en la piel humana. La distinción más evidente es entre CL y CDd, dos tipos de CD mieloides. CL son CD epidérmicas que constituyen solo un 1% del total de células epidémicas, aunque cubren aproximadamente un 20% de la superficie de la piel (Teunissen et al., 1997). Las CL humanas se pueden distinguir de otros tipos de CD por la expresión de

langerina/CD 207, un tipo de lectina que induce la formación de una organela intracitoplasmatica única, el gránulo de Birbeck (Valladeau et al., 2000), además de la alta expresión de Cadherina-E CD1a, que es responsable de la presentación de antígenos a las células T (Sieling et al., 1995). Las CDd están presentes en mayor cantidad que las CL en la piel. Estas células son continuamente producidas desde células pluripotenciales hematopoyéticas y distribuidas en un estado inmaduro como células captoras de antígenos. Se han distinguido hasta ahora dos sub-sets de CDd en la dermis: CD14+ y CD1a+.

Las diferentes clases de CD de la piel humana tienen diferentes funciones en la respuesta adaptativa. Tanto las CD como las CL aisladas de piel humana demostraron ser capaces de activar las células T CD4+, aunque las CL inducen la secreción de citoquinas de tipo Th2, mientras que CDd CD14+ no (Klechevsky et al., 2008). Las CDd CD1a+ provocan la secreción de las mismas citoquinas de Th2, aunque en menor cantidad comparadas con CL. CDd CD14+ promueven la diferenciación de células B *naive* en células plasmáticas secretoras de IgM, a través de la secreción de IL-6 e IL-12 (Caux et al., 1996; Dubois et al., 1998), lo que sugiere que CDd CD14+ son fundamentales en la inducción de la respuesta inmune humoral.

1.4 Vacunación tópica

Las bases de la vacunación se rigen por la existencia de las células de memoria B y T y/o CD8+, que permiten el desarrollo de respuestas fuertes y rápidas frente a antígenos derivados de patógenos con los que ya se encontraron anteriormente (Sallusto & Lanzavecchia, 2009). Tienen una vida media larga y una vez que entran en contacto con el antígeno comienzan a dividirse rápidamente, liberando una gran cantidad de anticuerpos y/o respuestas celulares. Algunos estudios demostraron que las células T residentes en la piel, juegan un rol muy importante en las respuestas de memoria ya que son muy numerosas y son capaces de sobrevivir durante un largo período de tiempo, de modo tal de poder controlar una infección frente a un segundo desafío con un determinado antígeno (Liu et al., 2010; Puissant-Lubrano et al., 2010). Además, se encontró que luego de la presentación de antígenos a células T *naive* por CD en los nódulos linfáticos, las células T efectoras de memoria no solo migran al

sitio de la infección, sino que además se distribuyen por todas las partes de la piel. Más aún, durante una infección primaria, las células T en proliferación no solo se encuentran en los nódulos linfáticos de la piel, sino que se distribuyen por nódulos linfáticos de otros tejidos, pudiéndose encontrar en tejidos periféricos como intestino y pulmón (Gebhardt et al., 2009).

El tipo de respuesta inmune dominante (humoral o citotóxica) tras la vacunación está determinado por varios factores que incluyen la ruta de administración del antígeno, la dosis, la duración de la presentación del antígeno, el número y frecuencia de las inmunizaciones y la coadministración de adyuvantes (Combadiere & Liard, 2011).

En respuesta a la vacunación, el SALT pone en marcha ciertos mecanismos complejos que son capaces de montar una respuesta inmune efectora que hace posible la protección contra enfermedades relacionadas. Estos mecanismos pueden dividirse en varios pasos clave: 1) reconocimiento y captura de los antígenos por CPA residentes en la piel, o mediante células inmunes innatas reclutadas de los ganglios o el timo; 2) activación de CPA de la piel; 3) difusión pasiva o transporte celular de los antígenos a los ganglios linfáticos; 4) procesamiento y presentación de los antígenos a células T inmaduras CD4+ y CD8+ por CPA activadas o células B *naive* foliculares; 5) activación de las células T (CD4+ y CD8+) y B específicas del antígeno; 6) migración de células T y células B (plasmocitos que secretan anticuerpos) hacia la zona de vacunación y eliminación de los antígenos; y 7) generación de células T y B de memoria en los órganos linfoides secundarios (ganglios linfáticos y médula ósea) y en la periferia (piel y mucosa) (Combadiere & Liard, 2011).

El primer paso para desencadenar una respuesta inmune en la piel es el acceso de los antígenos a las CPA (CD residentes de la piel, CL, CDd y células T CD8+) para, en segundo lugar, ser capturados por estas CPA e inducir su maduración y migración. El *SC,* sin embargo, es el principal impedimento para la penetración transcutánea de moléculas de peso molecular mayor a 500 Da y con coeficientes de partición fuera del estrecho rango de 1-3 (es decir tanto hidrofílicas como hidrofóbicas) (Barry, 1983; Bouwstra & Ponec, 2006), como la mayor parte de los antígenos, dificultando su acceso a las CPA.

Los métodos tópicos de inmunización tienen como destino diferentes compartimentos de la piel. Las vacunas pueden ser aplicadas de forma intradérmica (ID), en la que los antígenos son administrados directamente en la dermis, o tópica, donde los antígenos se depositan en la epidermis.

Actualmente, los métodos empleados de vacunación tópica sin agujas incluyen inyección de chorro de líquido, métodos balísticos y métodos de aplicación tópica.

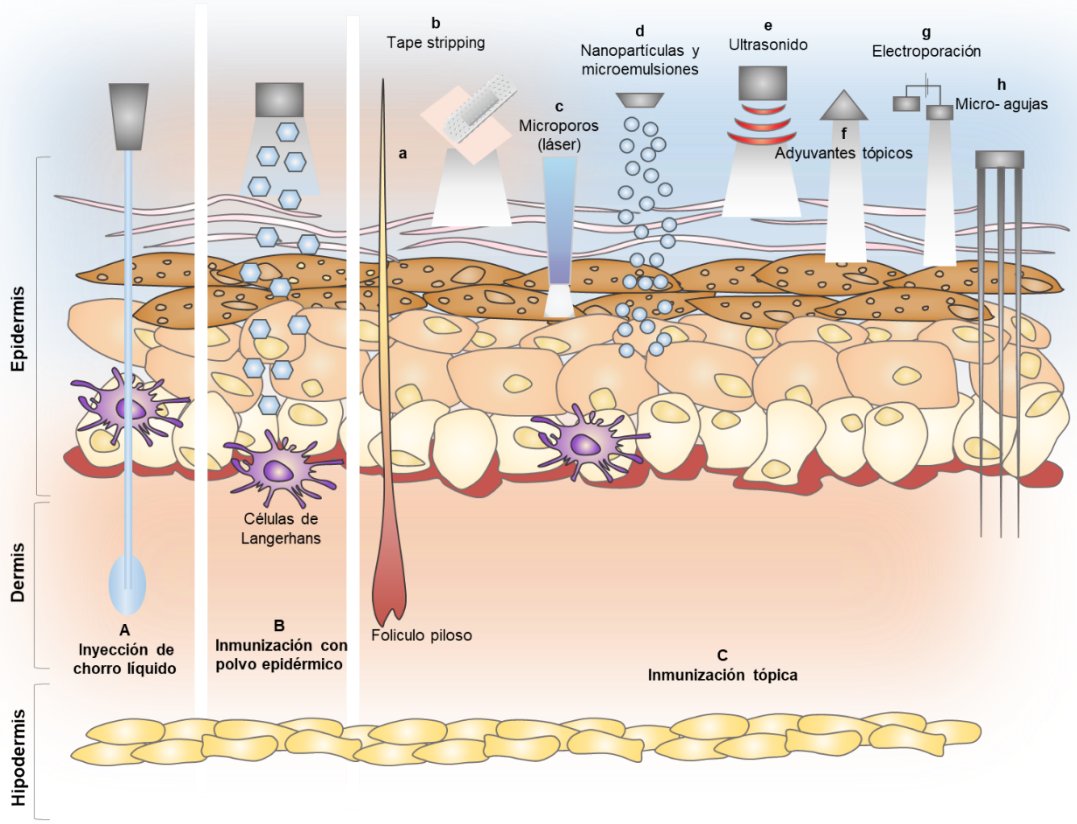


Figura 1.3 Métodos de vacunación tópica sin agujas. (A) Inmunización transcutánea utilizando inyección de chorro líquido que puede administrar las vacunas en las regiones muscular, subcutánea o dérmica, según los parámetros de la inyección. (B) Métodos balísticos, que consisten en la aceleración de los antígenos para depositarlos en la epidermis, ej. vacunación con polvo epidérmico. (C) Métodos de inmunización tópica, que incrementan la penetración de los antígenos y adyuvantes a través del *SC*, ya sea por su disrupción física (b, c, e, g), química (f), el uso de microagujas (h) o el uso de nanopartículas (d). Adaptado de Mitragotri 2005 (Mitragotri, 2005)

Los inyectores de chorro de líquido son un método donde se utiliza un chorro de alta velocidad (típicamente de 100 a 200 m/s) para suministrar antígenos a través de la piel hacia la dermis (Figura 1.3.A). El proceso de

formación de orificios y deposición de chorro de líquido se produce en microsegundos y el líquido depositado puede dispersarse dentro de los tejidos para provocar una respuesta inmune (Mitragotri et al. 2005). Sin embargo, dentro sus efectos adversos se incluyen dolor y moretones en el sitio de administración (Namjoshi et al., 20011). Algunos estudios informaron niveles más altos de dolor asociado con los inyectores de chorro en comparación con las inyecciones convencionales, mientras que otros no encontraron diferencias entre los dos métodos (Jackson et al., 2001, Sarno et al., 2000).

Los métodos balísticos aceleran las vacunas en forma de polvo de modo que penetran el *SC* y se depositan en la epidermis o las capas superficiales de la dermis (Mitragotri et al. 2005) (Figura 1.3.B). El uso de polvos simplifica la manipulación y el almacenamiento en comparación con las formulaciones líquidas. Sin embargo, en algunos casos, se observaron sangrados luego de la administración (Mitragotri et al. 2005), además de que muchos antígenos no pueden formularse como sólidos.

La inmunización tópica, por otro lado, se lleva a cabo mediante el uso de microagujas (suficientemente largas para atravesar el *SC,* pero suficientemente cortas para depositar los antígenos en la piel sin generación de dolor) o la disrupción del *SC* ya sea por métodos físicos (pelado (*stripping)*, ultrasonido, electroporación) o químicos (incrementadores o *enhancers* de permeación, que son mayormente pequeñas moléculas como dimetilsulfoxido que disrumpen la estructura de los lípidos intercelulares del *SC*) (Carstens, 2009; Combadière & Mahé, 2008) de modo de incrementar la penetración de los antígenos y hacerlos disponibles a las CPA (Figura 1.3.C). Adicionalmente, esta disrupción pone en marcha el sistema inmune, induciendo la secreción de citoquinas pro-inflamatorias por parte de los queratinocitos, lo que resulta en la activación de las CD (Cumberbatch et al., 1997; Wood et al., 1992). Sin embrago la disrupción del *SC* puede llevar a efectos colaterales no deseables, tales como irritación o mayor susceptibilidad a infecciones, sobre todo en aquellos casos en los que la superficie de la piel que se debe exponer es grande.

Por otro lado, la coadministración de adyuvantes o de inmunomoduladores ayuda a estimular las CPA, potenciando y/o redireccionado la respuesta inmune.

El adyuvante más comúnmente utilizado, aprobado para uso humano en los Estados Unidos y Europa es la sal de aluminio (hidroxifosfato de aluminio, alumbre) (Lambert & Laurent, 2008) y está incluido en las vacunas contra la hepatitis A, hepatitis B, difteria, tétanos y tos ferina, *Haemophilus influenzae* tipo b; VPH y neumococo, todas administradas intramuscularmente (IM) (Skountzou, et al., 2017). AS03 es un adyuvante compuesto por α-tocoferol (vitamina E), escualeno y polisorbato 80, que está aprobado en los Estados Unidos y Europa (Partridge et al., 2010), incluido en la vacuna monovalente contra el virus de la influenza A (H5N1) y Pandemrix, la vacuna contra el virus de la influenza A de origen porcino que causó la pandemia 2009H1N1 (Skountzou et al., 2017). El adyuvante MF59, que cuenta con aprobación para uso en humanos, es una emulsión de aceite en agua de escualeno y se utiliza en un vacuna contra la influenza trivalente para personas mayores de 65 años (Skountzou et al., 2017). A pesar de que estos adyuvantes mejoran las respuestas inmunes cuando son administrados IM y son considerados seguros (Theeten et al., 2005; Tomljenovic & Shaw, 2011), no hay suficientes estudios que reporten su aplicabilidad para administraciones tópicas. No todos los adyuvantes mejoran la inmunidad a todos los antígenos, ni son recomendables para cualquier sitio de administración (Skountzou et al., 2017). Por ejemplo, alúmina administrada IM, sc o ID junto con antígenos de influenza no logró inducir una respuesta protectora (Bungener et al., 2008; Skountzou et al., 2017). Adicionalmente, alumbre aplicado tópicamente desencadena el desarrollo de pápulas y dermatitis de larga duración (Brindle et al., 1994; Carlsson et al., 1996) e induce la formación de granulomas intradérmicos (Vogelbruch et al., 2000).

Los inmunomoduladores (diversas clases de moléculas, como lípidos, ácidos nucleicos, proteínas y péptidos que son ligandos de PRR) son muy utilizados en estrategias de vacunación (Harandi et al., 2009). Las exotoxinas bacterianas son muy empleadas para inmunizaciones tópicas ya que poseen una gran actividad inmunomoduladora. Entre ellas, la toxina colérica y la enterotoxina termolábil de *Escherichia coli* son las más estudiadas (Williams et al., 2000). Sus efectos incluyen la presentación mejorada del antígeno por una variedad de tipos de células, promoción de la diferenciación de isotipos en células B que conduce a una mayor formación de IgA, y efectos estimuladores complejos e inhibitorios sobre la proliferación de células T (Holmgren et al., 1993). Aplicadas tópicamente

sobre la piel hidratada son capaces de inducir fuertes respuestas inmunes sistémicas (Glenn et al., 1998). Estos no están aprobados para uso en humano y generan riesgo de reacciones inflamatorias adversas en la piel (Walter et al., 2013) o incremento en la aparición de enfermedades autoinmunes (Riminton et al., 2004)

Por otro lado, los ligandos de TLR son moléculas que desencadenan señales que orquestan respuestas inflamatorias, por lo que, ya sean de origen natural, purificados o sintéticos, pueden ser utilizados como adyuvantes en una vacunación. Un ejemplo de esto es el imiquimod (IMQ), ligando de TLR 7 que induce la producción de ciertas citoquinas como IFN-γ, TNF-α, IL-1β, IL-6, IL-8 y IL-12 en células inmunes como monocitos/macrófagos, CD (CDd y CD plasmacitoides), células B, granulocitos y CL (Schön & Schön, 2007; Stanley, 2002). IMQ induce memoria celular a través de la activación de células T efectoras, CL, linfocitos y macrófagos, que circulan linfáticamente y activan una respuesta inmune adaptativa (Rechtsteiner et al., 2005).

En este contexto, la materia blanda que tiene propiedades elastomecánicas destinadas a penetrar en el *SC* intacto podría allanar el camino hacia una vacunación tópica más segura y eficiente

1.4.1 Nanovesículas para la vacunación tópica

1.4.1.1 Liposomas como adyuvantes de vacunación

Los liposomas son vesículas selladas formadas por fosfolípidos que se autoensamblan en agua formando una o más bicapas lipídicas y encerrando un interior acuoso (Ashtikar et al., 2016). Los liposomas son sistemas versátiles de administración de antígenos, y se pueden personalizar cuidadosamente para adaptarlos a los perfiles inmunes deseados combinándolos con inmunoestimuladores y optimizando su composición, propiedades fisicoquímicas y modo de carga de antígenos (Romero & Morilla, 2016)

Los liposomas tienen la capacidad de incrementar la captura de los antígenos por CPA, modular la liberación intralisosomal (para ser presentados por MHC II e inducir una respuesta humoral), o intracitoplasmática (para ser presentados por MHC I e inducir respuestas de tipo celular o humoral), co-

encapsular varios antígenos, co-encapsular antígenos e inmunomoduladores, inducir la presentación de moléculas co-estimulatorias y proteger el antígeno en ambientes hostiles.

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 (Epaxal e Inflexal) alcanzaron el mercado. Inflexal, una vacuna contra influenza, consiste en la reconstitución de los antígenos hemaglutinina (HA) y neuraminidasa (NA) expuestos en la superficie de liposomas de fosfatidilcolina: fosfatidiletanolamina (PC: PE) (también conocidas como virosomas). Esta es la base, también de Epaxal, una vacuna contra la hepatitis A.

La elección del lípido utilizado y el método de fabricación resultan fundamentales en el diseño de la formulación, ya que influyen en las propiedades físico-químicas 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).

Existe 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, 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., 2004; Brewer et al., 1998; Carstens et al., 2011; Mann et al., 2009), y c) la ubicación del antígeno y la carga liposomal que influyen en su actividad adyuvante. (Gall, 1966; Henriksen-Lacey et al., 2010); (Hussain et al., 2014). Sin embargo, independientemente de su composición más o menos fluida, los liposomas son propensos a acercarse y fusionarse cuando se someten a ambientes secos, como la superficie de la piel (Schaller et al., 1996). Por esta razón, las bicapas fusionadas de liposomas ampliamente utilizados en cosmética no son *carriers* de drogas, pero sí son depósitos de lípidos que no penetran sino son retenidos en las primeras capas del *SC.*

1.4.1.2 Vesículas diseñadas para atravesar el estrato corneo

En la década de los 90 ', surgieron casi simultáneamente dos tipos de vesículas, que mostraron ser eficientes para atravesar el *SC* en lugar de depositarse en la superficie: las vesículas altamente fluidas y las altamente deformables. Las dos, sin embargo, penetran la piel empleando diferentes mecanismos (Figura 1.5)

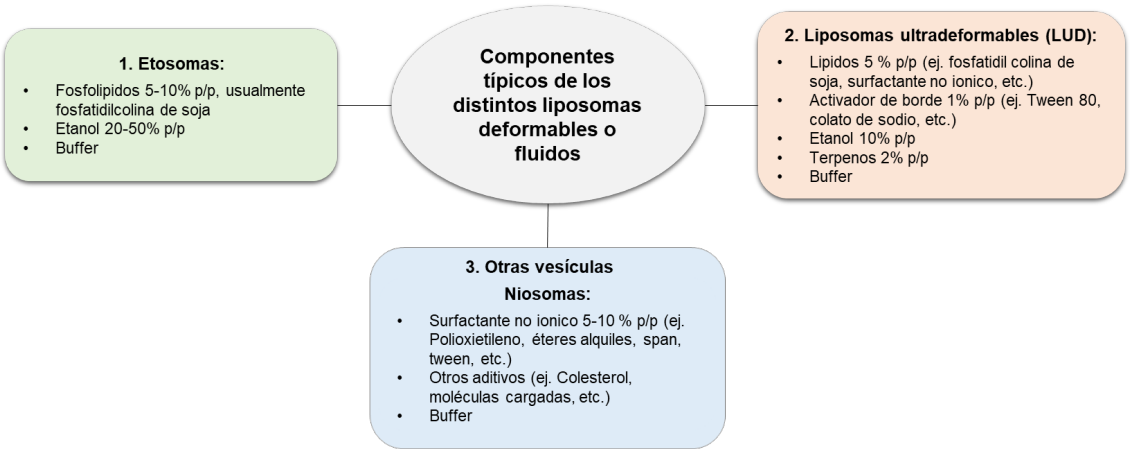


Figura 1.5 Composición típica de liposomas deformables y fluidos utilizados para *delivery* de drogas tópicas

1.4.1.2 a. Etosomas

Los etosomas son vesículas fluidas preparadas con SPC, altas cantidades del incrementador (*enhancer)* de permeación etanol (hasta un 50%) y agua (Touitou, 1996). El etanol, incluso a bajas concentraciones, se une a las cabezas polares lipídicas y aumenta la fluidez del estado cristalino líquido (Chin, 1981; Harris et al.,1987) En comparación con las bicapas liposomales, los fosfolípidos en los etosomas se empaquetan de manera menos compacta y la membrana presenta una mayor permeabilidad para los solutos hidrófilos o iónicos.

Los etosomas tienen un alto contenido de *enhancers* de permeación, lo que los hace responsables de mediar la disrupción de la barrera lipídica por la que las pequeñas moléculas hidrófobicas permean. Luego de la aplicación tópica, el aumento en la permeación de los etosomas es mucho mayor de lo que se esperaría del etanol solo, lo que sugiere un mecanismo sinérgico entre el etanol, las vesículas y los lípidos de la piel. Los etosomas incrementan la

permeación más efectivamente que las soluciones de etanol, etanol en agua o fosfolípidos en etanol. El etanol aumenta la solubilidad de las drogas en las vesículas, altera la organización de los lípidos del *SC* y aumenta su fluidez.

Los etosomas demostraron un buen potencial para aumentar la penetración transdérmica de una variedad de drogas (Dubey 2007, Dubey 2007b, Dubey 2010, Rao 2008). Respecto de su uso en vacunación tópica, etosomas conteniendo proteína pequeña de superficie de hepatitis B (HBsAg) mostraron generar niveles de IgG séricos Ag-específicos y niveles de IgA mucosos y sistémicos similares a los obtenidos con LUD (Mishra et al., 2006, 2008). LUD y etosomas conteniendo HBsAg mostraron ser internalizados por células dendríticas murinas (Mishra et al., 2007) y humanas (Mishra et al., 2010) y estimular la proliferación de linfocitos T y la inducción de IL-2 e IFN-γ (respuesta de tipo Th1). Sin embargo los etosomas produjeron mayor toxicidad sobre células dendríticas que LUD (Mishra et al., 2010).

1.4.1.2.b. Liposomas ultradeformables (LUD)

En el año 1992 se reportó un nuevo tipo de vesículas lipídicas altamente deformables que poseen la habilidad de penetrar la piel *in vivo* tras su aplicación no-oclusiva (Cevc & Blume, 1992). Estas vesículas se asemejan a los liposomas en morfología pero no en función (Planas et al., 1992). Los autores sugirieron que estas vesículas pueden responder a un estrés mecánico externo cambiando rápidamente de forma para lo que requieren un mínimo de energía. Esta alta deformabilidad que les permite transportar y liberar drogas a través de la piel, les confirieron su nombre de liposomas ultradeformables (LUD) (Cevc, 1995). Los LUD son liposomas que contienen aproximadamente 27% en moles de activadores de borde, pequeñas moléculas hidrófilas de alta movilidad, como colato de sodio, Tween 80, Span 80 y deoxicolato de sodio (Cevc, 1995), (El Maghraby et al., 2000) (Figura 1.6), (Cevc & Blume, 1992). Los activadores de borde son moléculas con alta movilidad en la membrana y tendencia a ubicarse en las zonas altamente curvadas que, agregados en una proporción cercana a la requerida para la solubilización de las vesículas, disminuyen el módulo elástico de la misma al valor de la energía térmica ambiente (kT, k constante de Boltzmann, T temperatura absoluta) (~20 veces menor que el módulo de elástico

de liposomas convencionales) (Cevc & Blume, 2004; Cevc & Vierl, 2010). Una vez sobre la superficie del *SC*, la particular estructura hidrofílica y elástica de los LUD impide que los mismos se fusionen (como lo hacen los liposomas convencionales) y experimentan una locomoción espontánea mediada por el gradiente de hidratación transepitelial (una fuerza calculada en el orden de los 10^{12} N/mol para vesículas de 60 nm) (Rand et al., 1990), que los empuja hacia zonas de mayor hidratación ubicadas en la profundidad del *SC* (Cevc & Blume, 1992). Debido a su capacidad de deformarse, los LUD pueden penetrar por poros de diámetro hasta tres veces menor a su tamaño sin romperse. Aplicados no oclusivamente sobre la superficie de la piel los LUD penetran rápidamente el *SC* (en alrededor de 1 h) y se los halla como mínimo a la altura de la unión *SC*-epidermis viable (Honeywell-Nguyen et al., 2004), atravesando nano-canales inter-corneocitos (Carrer et al., 2008; Honeywell-Nguyen et al., 2002).

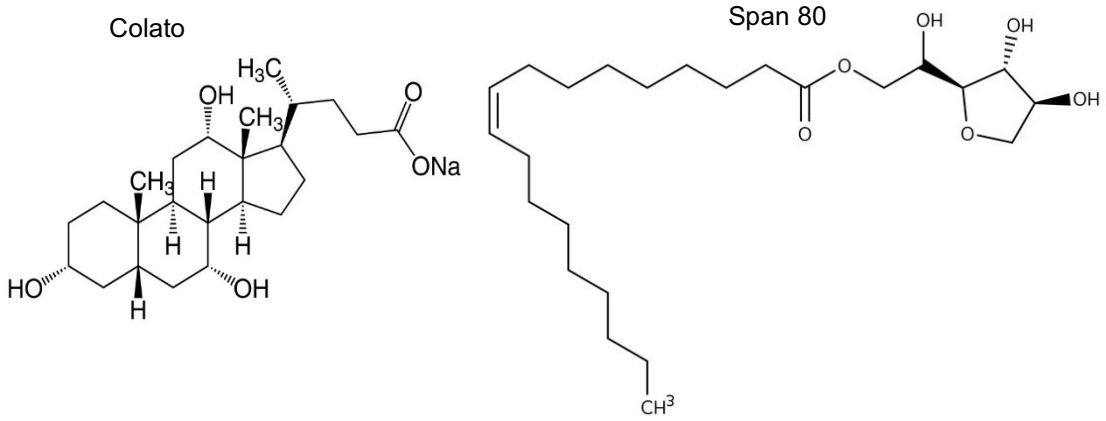


Figura 1.6 Activadores de borde: Colato de sodio y Span 80

Actualmente se proponen dos mecanismos potenciales para la penetración de las drogas a través de LUD: i) un mecanismo mediado donde los LUD funcionan como *carriers,* en el que las vesículas transportan moléculas de medicamento a la piel y ii) un mecanismo donde las vesículas actúan como *enhancer* de la penetración; allí, las vesículas entran en el *SC* y posteriormente modifican las láminas lipídicas intercelulares facilitando la penetración de moléculas de fármaco libres en y a través del *SC*.

La penetración de las vesículas intactas está altamente comprometida por la barrera cutánea, y la integridad estructural de las vesículas se pierde en a

lo largo del *SC*. Evidencia experimental actual sugiere que los dos mecanismos pueden desempeñar un papel en la administración tópica mediada por LUD. Según las propiedades fisicoquímicas de la droga, uno de los dos mecanismos podría predominar. Las drogas hidrofílicas, por ejemplo, penetrarían impulsados por el segundo mecanismo, mientras que las drogas hidrofóbicas emplearían el primero (Romero & Morilla 2016).

Luego de su aplicación transcutánea sobre explantos de piel humana, la matriz lipídica de los LUD penetra entre 7 y 10 veces más profundo en el *SC* que liposomas convencionales. Adicionalmente, el contenido acuoso de los LUD es transportado hasta profundidades de 50 µm dentro de la epidermis viable (Montanari et al., 2010). Los LUD han mostrado ser una potente herramienta para incrementar la penetración transcutánea de diferentes moléculas incorporadas a su estructura (Cevc & Vierl, 2010; Li et al., 2011; Mura et al., 2009; Qiu et al., 2008). En su rol de adyuvantes tópicos, el primer reporte del año 1998 mostró que LUD conteniendo una proteína de unión entre células (*Gap junction protein*) produjeron niveles de IgG antígeno específicos séricos similares a los obtenidos tras la administración IM con el plus de una liberación adicional de IgA (Paul et al., 1998). Más tarde, se demostró que LUD conteniendo un plásmido que codifica la proteína pequeña de la superficie de la hepatitis B (HBsAg) produjo títulos séricos de IgG más altos que los producidos por liposomas convencionales e iguales a los producidos por la administración IM utilizando alumina (adyuvante universal) (Vyas et al., 2005; Wang et al., 2007; Gupta et al; 2005)

Más recientemente, se demostró que tras la aplicación tópica en ratones de LUD que conteniendo ovoalbúmina (OVA, PM 42.7 KDa) provocó una fuerte respuesta inmune similar a la de la solución de OVA administrada por inyección subcutánea con alumina (Li et al., 2011). La administración conjunta de imiquimod logró niveles significativamente más altos de IgG anti-OVA. Recientemente, se demostró que los ratones inmunizados tópicamente con 80 µg de toxoide tetánico (PM 150 kDa) con monofosforil lípido A incorporados en LUD fueron protegidos contra una dosis de toxina letal durante al menos 6 meses (Chopra et al., 2014). En contraste, los ratones inmunizados con una formulación similar pero carente de lípido A se paralizaron 96 h después del desafío, pero se

recuperaron 5 días después. La respuesta inmune a la administración tópica consistió principalmente en isotipos circulantes de anticuerpos IgG1 e IgG2b, indicativos de un sesgo de respuesta celular Th2 específico. Las inmunizaciones por inyecciones subcutáneas producen principalmente IgG1 e IgG2b, así como los isotipos de anticuerpos IgG2a, indicativos de una respuesta mixta Th1/Th2. La mayor cantidad de IgG2a medida en los animales inyectados se explica por el IFN- γ producidos por los esplenocitos de los animales. La secreción de IL-10 por esplenocitos también pudo afectar a la protección contra la exposición a la toxina tetánica normalmente letal a través de la inmunosupresión

1.4.1.2.c Otras vesículas altamente deformables: niosomas

Los niosomas son vesículas formadas por el autoensamblaje de uno o más agentes tensioactivos no iónicos con lípidos (Ashtikar et al., 2016). Los surfactantes no iónicos utilizados para la preparación de niosomas incluyen principalmente ésteres de sorbitán (spans) y polioxietilen alquil éter (Brij®). Además de los surfactantes, el colesterol y sus derivados (en una relación molar 1: 1) y moléculas como los alcoholes grasos o el fosfato de dicetilo también se han descrito para la preparación de niosomas (Khar, 2006; van Hal et al., 1996). Los niosomas no son tóxicos, no son inmunogénicos y han mostrado un buen potencial para aumentar la penetración transdérmica de una variedad de drogas (Schreier & Bouwstra, 1994). Este aumento en la penetración transdérmica se ha atribuido al efecto que los surfactantes no iónicos tienen sobre los lípidos intercelulares del *SC*. Niosomas conteniendo albúmina cubiertos de O-palmitoil manan (ligando de un receptor sobre CL) mostraron generar altos niveles de IgG sistémico Ag-especifico (Jain & Vyas, 2005). Estudios comparativos mostraron que LUD conteniendo un plásmido codificante de la proteína pequeña de superficie de hepatitis B (HBsAg) generaron títulos de IgG mayores que los obtenidos con niosomas y liposomas convencionales y similares a los obtenidos tras la administración intramuscular de HBsAg con alúmina (Vyas et al., 2005; Wang et al., 2007). Adicionalmente generaron niveles de IL-4 e IFN-γ séricos similares a los obtenidos intramuscularmente.

1.5 Arquebacterias y adyuvancia

Antiguamente, las arquebacterias eran consideradas bacterias y clasificadas dentro del antiguo reino monera. Actualmente se sabe que las arquebacterias tienen una historia evolutiva independiente y muestran muchas diferencias en su bioquímica con las otras formas de vida, por lo que fueron clasificadas en un dominio independiente como parte de uno de los tres dominios existentes: Archaea, Bacteria y Eukarya (Figura 1.7)

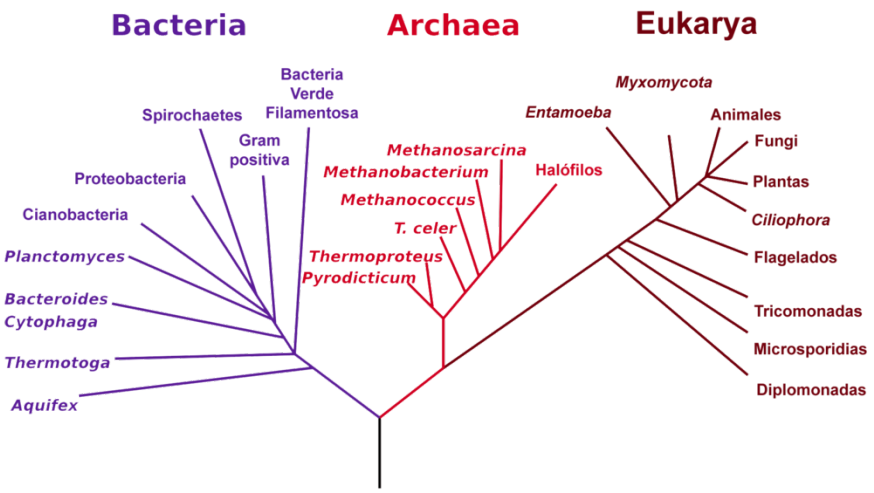


Figura 1.7 Situación de las arqueas en el árbol filogenético de Carl Woese *et al.* 1990 basado en datos de secuencias genéticas de ARNr 16S.

La mayoría de las arquebacterias son microorganismos extremófilos. De acuerdo con el hábitat en el que viven pueden clasificarse en **hiperhalófilas**, aquellas que viven en salinas, **metanógenas** que habitan ambientes carentes de oxígeno y elevadas temperaturas, y **termófilas** aquellas encontradas a muy altas temperaturas. Las arquebacterias hiperhalófilas del género *Halorubrum* se encuentran distribuidas mundialmente (Franzmann et al., 1988).

Los arqueolípidos polares de arquebacterias hiperhalófilas poseen esqueletos hidrocarbonados y grupos de cabezas polares radicalmente diferentes a los lípidos polares de organismos de los otros dos dominios, Eukarya y Bacteria. Los esqueletos hidrocarbonados de los lípidos de arqueas son éteres de cadenas isoprenoides, mayormente fitanilos (20 C) y bifitanilos (40 C), llamados arqueoles o lípido dieter (2,3-di-*O*-difitanil-*sn*-glicerol) y caldarqueoles o lípido tetraeter (2,2´-3,3´- tetra-*O*-dibifitanil-*sn*-diglicerol), respectivamente,

unidos en una configuración *sn*-2,3 al glicerol (Sprott, 1992) (Figura 1.8). 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, 1993). 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 (Sprott et al., 1997).

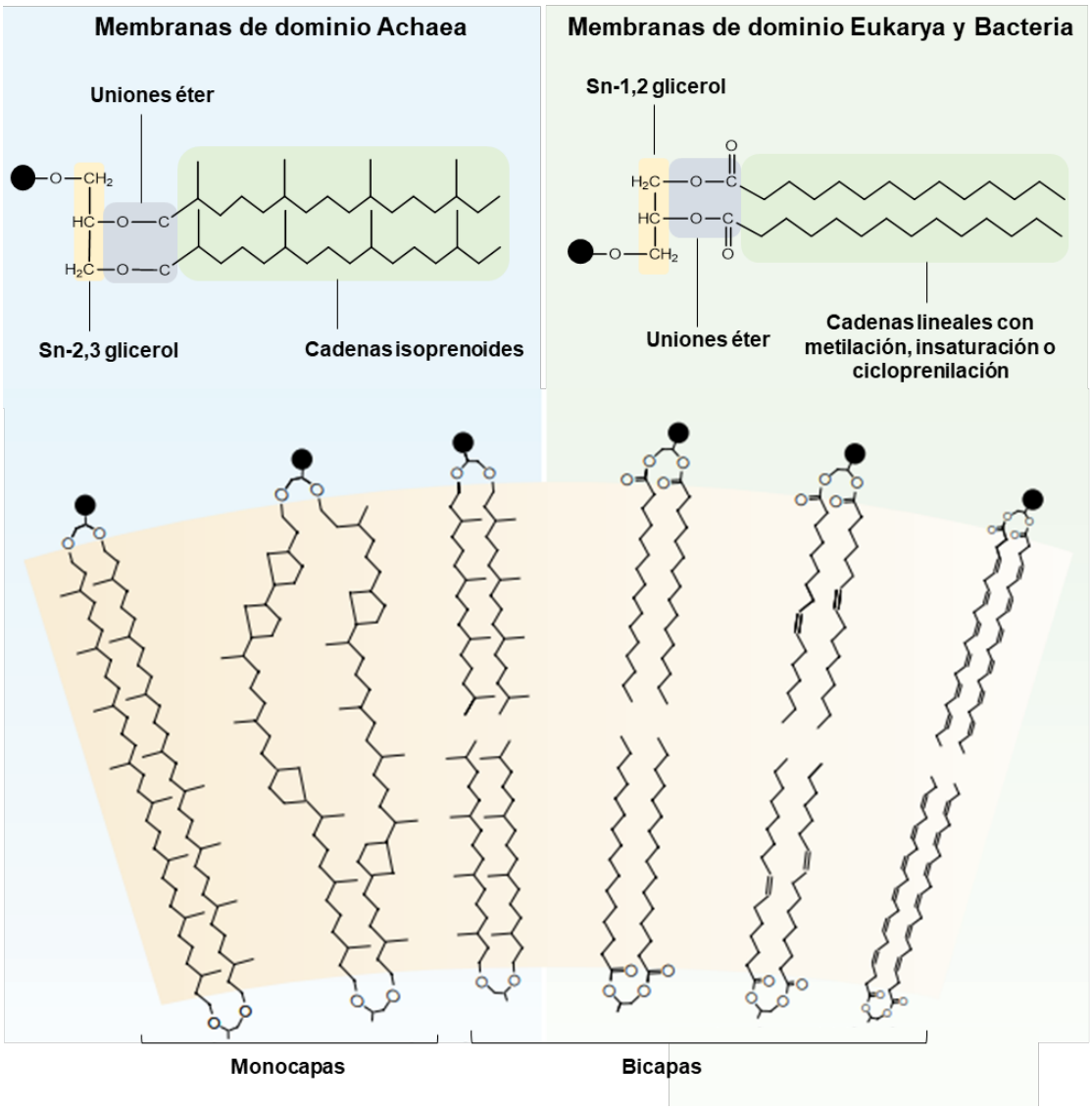


Figura 1.8 Estructura química y diferencias entre arqueolípidos y lípidos de bacterias y eucariotas y tipos de membrana que pueden formar. Imagen modificada a partir de (Valentine, 2007).

Los arqueosomas (ARQ) son vesículas con actividad adyuvante preparadas con lípidos polares totales (APT) extraídos de arquebacterias. Al igual que para los liposomas, la fase lamelar de ARQ se genera por auto-asociación de los arqueolípidos en medios acuosos que, tras un pequeño *input* de energía se sellan en vesículas. Sin embargo, la relación de sección transversal cadena hidrocarbonada/grupo cabeza polar de los arqueolípidos 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; 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 macrociclicos o caldarqueoles en ARQ minimiza su permeabilidad al agua y pequeños solutos (Mathai, Sprott, & Zeidel, 2001; van de Vossenberg, Driessen, Grant, & Konings, 1999).

Utilizados como adyuvantes de vacunación, ciertos ARQ aumentan el reclutamiento y activación de CPA como CD y macrófagos (Lakshmi et al., 2001; Tolson et al., 1996), inducen la expresión de moléculas coestimulatorias (Lakshmi et al., 2001) y generan respuestas de linfocitos CD8+ citotóxicos aún en ausencia de linfocitos CD4+ (Lakshmi et al., 2001), tres estímulos importantes que otros sistemas vesiculares como liposomas, niosomas e ISCOMS (complejos estimuladores del sistema inmune, estructuras esféricas tipo caja abierta de alrededor de 40 nm que se forman por la combinación de colesterol, fosfolípidos y saponinas de Quillaja en determinadas proporciones) no son capaces de inducir. Luego de su administración subcutánea inducen respuestas Th1, Th2 y T CD8+ en forma antígeno-dependiente en superior magnitud a la inducida por liposomas convencionales (Lakshmi et al., 2001; Sprott et al., 2004).

Adicionalmente, a pesar que la inflamación en la respuesta innata permite la generación de la respuesta adaptativa (Dudani et al., 2002), los ARQ generan memoria inmunológica en ausencia de inflamación visible. Por ejemplo, ARQ preparados con APT de *Haloferax volcanii* y *Methanobrevibacter smithii* activan CD en ausencia de producción de IL-12, relacionada con la respuesta inflamatoria inicial (Sprott et al., 2004). Las propiedades adyuvantes de ARQ son independientes de la presencia de lipopolisacaridos, ya que los mismos están

ausentes en las arqueas (Eckburg et al., 2003); esto remarca otra diferencia entre ARQ y liposomas, ya que no deben ser agregados inmunomoduladores a los ARQ para ejercer su acción adyuvante, lo que si debe hacerse para generar repuesta utilizando liposomas.

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 et al., 2001). Estos ARQ inducen la expresión de moléculas co-estimulatorias en CPA, lo que conduce a la up-regulación de citoquinas y otros reguladores inmunológicos (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).

.

1.5.1 Arqueosomas ultradeformables para vacunación tópica

En el año 2003, a partir de muestras de tomadas en las Salinas Chicas en la Península de Valdez, Chubut (Patagonia argentina) nuestro grupo aisló microorganismos hiperhalofilos, que luego fueron tipificados como arquebacterias *Halorubrum tebenquichense.*

Los arqueolípidos polares se extrajeron mediante el método de Blight & Dyer y se caracterizaron mediante cromatografía en capa delgada (TLC) mono- y bi-dimensional (utilizando tinciones especificas) y espectrometria de masa por ionización electrospray (ESI-MS). Estos análisis mostraron la presencia de los siguientes lípidos polares totales (APT), cuyas estructuras se muestra en la Figura 1.9.

- El sulfoglicolípido, 1-*O*-[α-D-manosa-(2'-SO3H)-1'→2')-α-D-glucosa]-2,3-di-*O*-fitanil-*sn*-glicerol, S-DGD-5
- La cardiolipina glicosilada, S-DGD-5-PA
- El fosfolípido arqueal 2,3-di-*O*-fitanil-*sn*-fosfatidilglicerofosfato metilester, PGP-Me

- El fosfolípido arqueal 2,3-di-*O*-fitanil-*sn*-fosfatidilglicerol, PG.
- La cardiolipina sn-2,3-di-O-fitanil-1-fosfoglicerol-3-fosfo-sn-di-Ofitanilglicerol, BPG

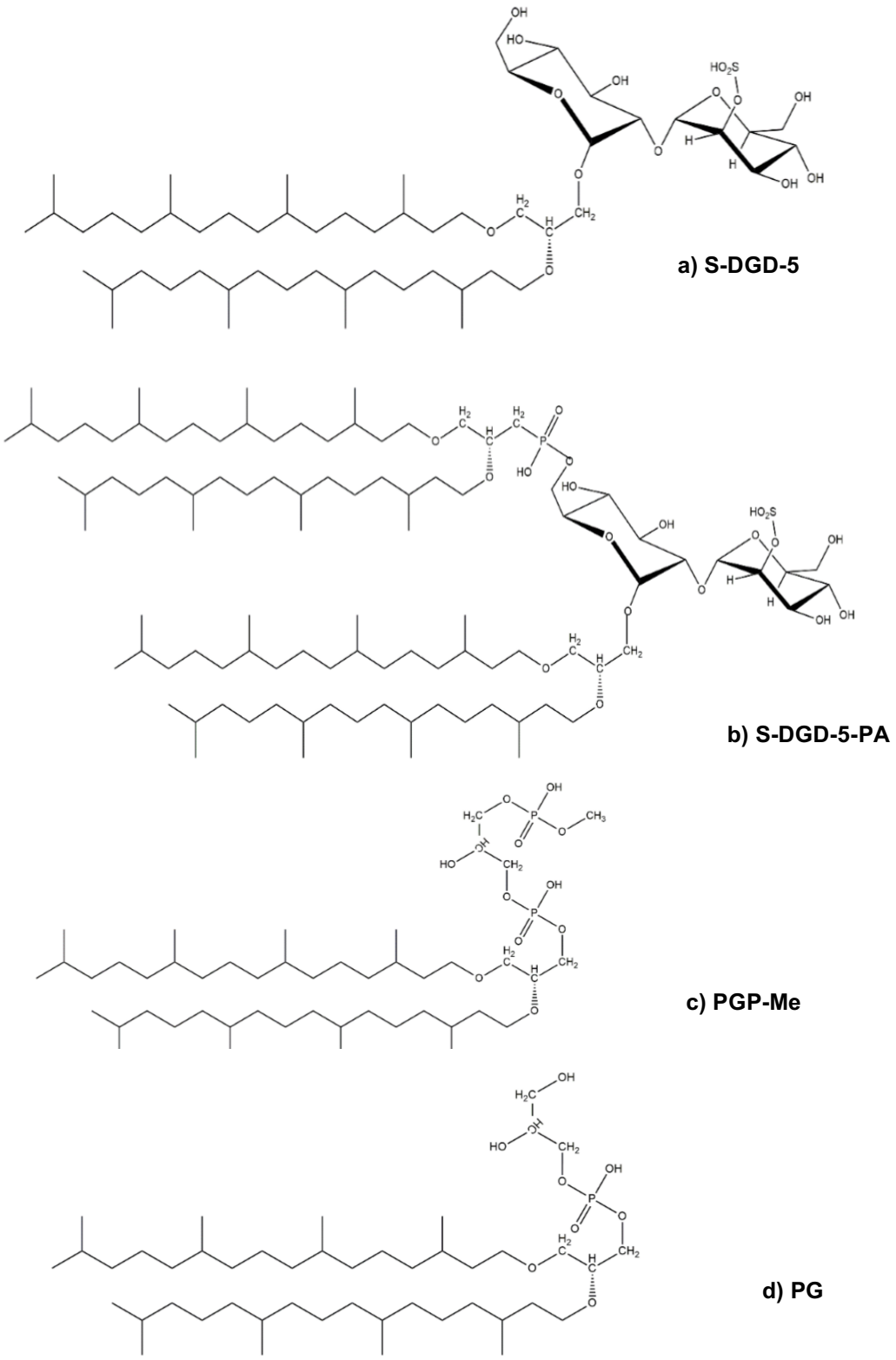
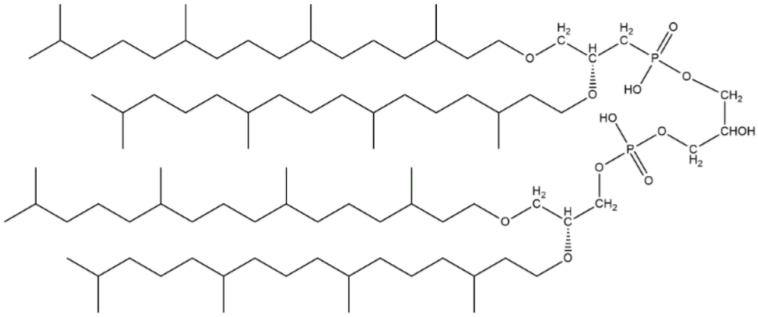


Figura 1.9 Estructura de los APT extraidos de *H. tebenquichense*



e) BPG

Figura 1.9 (cont.) Estructura de los APT extraidos de *H. tebenquichense*

Utilizando los APT preparamos vesículas de 200-300 nm diámetro y carga superficial negativa, de nombre genérico arqueosomas (ARQ). En un primer trabajo, ARQ fueron testeados preclínicamente respecto de su inocuidad tanto *in vitro* como *in vivo*, así como en su capacidad para actuar como agentes adyuvantes en la vacunación parenteral de ratones usando albúmina sérica como antígeno modelo (Gonzalez et al., 2009). Hallamos que los ARQ son seguros y tienen actividad adyuvante tras su administración subcutánea, generando títulos de anticuerpos similares a los obtenidos con el adyuvante universal alumbre, sin generar inflamación ni irritación. Luego, demostramos que los arqueosomas funcionan como una vacuna profiláctica contra el Mal de Chagas, ya que protegieron a animales modelos de un desafío letal con *Trypanosoma cruzi* (Higa et al., 2013). La capacidad adyuvante de estos ARQ se debe a su elevada captura por células presentadoras de antígenos (macrófagos y células dendríticas) (Perez, et al., 2014; Higa et al., 2016a). Hallamos que la tasa de captura de estos ARQ es varias veces mayor que la de liposomas preparados con fosfolípidos convencionales, tanto sintéticos como derivados de soja. Hallamos que su captura esta mediada por el receptor *scavenger* de clase A (SRA) en macrófagos, debido a la presencia del arqueolipido con doble carga negativa PGP-Me, componente mayoritario de los lípidos polares (Altube et al., 2016). Debido a su alta tasa de captura, el receptor *scavenger* de hemoglobina CD163 y los receptores *scavenger* tipo I y II de clase A (SRA) han atraído considerable interés como receptores para el *targeting* activo a macrófagos (Jain et al., 2013; Graversen et al., 2012). Particularmente,

el SRA es un receptor endocitico especializado en la eliminación de células, moléculas y partículas, involucrado en la defensa, expresado fundamentalmente en macrófagos y células dendríticas. El SRA es una proteína unida a membrana que actúa como receptor de patrones de reconocimiento para la eliminación de endotoxinas bacterianas de la sangre y la ingestión de bacterias gram-negativas y -positivas a través del reconocimiento de lipopolisacarido y ácido lipoteico. El SRA también se une formas modificadas de lipoproteínas de baja densidad, como la acetilada y oxidada y a otros ligandos polianiónicos (Plüddemann et al., 2007; Mukhopadhyay y Gordon 2004).

En suma, sabemos que toda nanoestructura que contenga arqueolipidos de *H. tebenquichense*, en particular PGP-Me, serán eficientes agentes para el *delivery* del material encapsulado, a células que expresen SRA y cuando ese material es proteico puede desencadenar una respuesta inmune.

Con este conocimiento en mano, reingenierizamos la estructura de los arqueosomas, con objeto de adaptarlos a diferentes vías de administración. Modificamos la elastomecanicidad de su bicapa, para posibilitar su penetración a través del *SC* intacto de la epidermis viable, sin el agregado de *enhancers* de permeación. Los así denominados arqueosomas ultradeformables (AUD) se emplearon en nanovacunación tópica (sin agujas) y en el *delivery* de agentes anti-leishmania. Los AUD preparados a partir de fosfatidilcolina de soja (SPC): colato de sodio (ColNa) y APT en relación 3: 1: 3 p: p, pueden transportar la proteína ovoalbúmina a las capas profundas de la piel humana, hasta unos 50 μm de profundidad, sin romper la barrera del *SC* (Carrer et al., 2014). Aplicados en condiciones no oclusivas sobre animales modelo, los AUD actuaron como adyuvantes, siendo responsables de la respuesta sistémica antígeno-especifica de tipo humoral (Th2), e interleuquinas pro-inflamatorias en la inmunización contra la leishmaniasis (Higa et al., 2016a). Finalmente, AUD conteniendo agentes fotodinámicos y aplicados tópicamente sobre lesiones en modelos murinos de leishmaniasis muco-cutanea, redujeron significativamente el tamaño de las mismas (Perez et al., 2014 y resultados no publicados).

Objetivos

Objetivos generales

El objetivo general de este trabajo de tesis fue evaluar la capacidad de nanovesículas ultradeformables conteniendo arqueolípidos (AUD) para desencadenar una respuesta inmune antígeno especifica humoral, celular y de memoria tras su aplicación tópica al combinarlos con diferentes antígenos y con el inmunomodulador imiquimod y evaluar que AUD cumplan con ser estables, que no requieran cadena de frio para su almacenamiento, que se puedan producir por procesos simples y que se puedan mezclar con el antígeno antes de su administración.

Objetivos específicos:

Los objetivos específicos fueron los siguientes:

- Evaluar la estabilidad de AUD frente a procesos de esterilización, liofilización y almacenamiento en de cadena de frio.
- Comprobar la capacidad de AUD esterilizados y liofilizados de actuar como adyuvantes y evaluar la posibilidad de reemplazar la clásica incorporación del antígeno en el interior de las vesículas, por su mezcla física.
- Evaluar la capacidad adyuvante de AUD combinado con inmunomodulador imiquimod tras su administración tópica utilizando el antígeno modelo ovoalbúmina (OVA).
- Evaluar la capacidad adyuvante de AUD combinado con imiquimod aplicado tópicamente combinado con una vacuna comercial contra influenza.
- Evaluar la actividad antitumoral de AUD combinado con imiquimod sobre células de melanoma.

1.6 Referencias

Agnello, D., Lankford, C. S., Bream, J. et al., (2003). Cytokines and transcription factors that regulate T helper cell differentiation: new players and new insights. Journal of clinical immunology, 23(3), 147-161.

Altube, M. J., Cutro, A., Bakas, L. et al., (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.

Altube, M. J., Selzer, S. M., de Farias, M. A. et al., (2016). Surviving nebulization-induced stress: dexamethasone in pH-sensitive archaeosomes. Nanomedicine, 11(16), 2103-2117.

Ashtikar, M., Nagarsekar, K., & Fahr, A. (2016). Transdermal delivery from liposomal formulations–Evolution of the technology over the last three decades. Journal of Controlled Release, 242, 126-140.

Bal, S. M., Ding, Z., van Riet, E. et al (2010). Advances in transcutaneous vaccine delivery: do all ways lead to Rome? Journal of Controlled Release, 148(3), 266-282.

Banchereau, J., & Steinman, R. M. (1998). Dendritic cells and the control of immunity. Nature, 392(6673), 245.

Barry, B. (1983). Properties that influence percutaneous absorption. Dermatological formulations. Percutaneous absorption, 127-233.

Barry, B. W. (1991). Lipid-protein-partitioning theory of skin penetration enhancement. Journal of Controlled Release, 15(3), 237-248.

Benson, H. A. (2009). Elastic liposomes for topical and transdermal drug delivery. Current drug delivery, 6(3), 217-226.

Boncheva, M., De Sterke, J., Caspers, P. J. et al., (2009). Depth profiling of Stratum corneum hydration in vivo: a comparison between conductance and confocal Raman spectroscopic measurements. Experimental dermatology, 18(10), 870-876.

Bouwstra, J. A., & Ponec, M. (2006). The skin barrier in healthy and diseased state. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes, 1758(12), 2080-2095.

Brewer, J. M., Pollock, K. G., Tetley, L. et al., (2004). Vesicle size influences the trafficking, processing, and presentation of antigens in lipid vesicles. The Journal of Immunology, 173(10), 6143-6150.

Brewer, J. M., Tetley, L., Richmond, J. et al., (1998). Lipid vesicle size determines the Th1 or Th2 response to entrapped antigen. The Journal of Immunology, 161(8), 4000-4007.

Brindle, R. J., Morris, C. A., Berger, R. et al., (1994). Inadequate response to intradermal hepatitis A vaccine. Vaccine, 12(6), 483-484.

Bungener, L., Geeraedts, F., Ter Veer, W. et al., (2008). Alum boosts TH2-type antibody responses to whole-inactivated virus influenza vaccine in mice but does not confer superior protection. Vaccine, 26(19), 2350-2359.

Carlsson, U., Brudin, L., Eliasson, I. et al., (1996). Hepatitis A vaccination by intracutaneous low dose administration: a less expensive alternative. Scandinavian journal of infectious diseases, 28(5), 435-438.

Carrer, D. C., Vermehren, C., & Bagatolli, L. A. (2008). Pig skin structure and transdermal delivery of liposomes: a two photon microscopy study. Journal of Controlled Release, 132(1), 12-20.

Carstens, M. G. (2009). Opportunities and challenges in vaccine delivery. European journal of pharmaceutical sciences, 36(4-5), 605-608.

Carstens, M. G., Camps, M. G., Henriksen-Lacey, M. et al., (2011). Effect of vesicle size on tissue localization and immunogenicity of liposomal DNA vaccines. Vaccine, 29(29-30), 4761-4770.

Caux, C., Vanbervliet, B., Massacrier, C. et al., (1996). CD34+ hematopoietic progenitors from human cord blood differentiate along two independent dendritic cell pathways in response to GM-CSF+ TNF alpha. Journal of Experimental Medicine, 184(2), 695-706.

Cevc, G. (1995). Material transport across permeability barriers by means of lipid vesicles. Handbook of biological physics, 1, 465-490.

Cevc, G., & Blume, G. (1992). Lipid vesicles penetrate into intact skin owing to the transdermal osmotic gradients and hydration force. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes, 1104(1), 226-232.

Cevc, G., & Blume, G. (2004). Hydrocortisone and dexamethasone in very deformable drug carriers have increased biological potency, prolonged effect, and reduced therapeutic dosage. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes, 1663(1), 61-73.

Cevc, G., & Gebauer, D. (2003). Hydration-driven transport of deformable lipid vesicles through fine pores and the skin barrier. Biophysical journal, 84(2), 1010-1024.

Cevc, G., & Vierl, U. (2010). Nanotechnology and the transdermal route: a state of the art review and critical appraisal. Journal of Controlled Release, 141(3), 277-299.

children. Tuberc. Res. Treat., 712736.

Chin, J. H., & Goldstein, D. B. (1981). Membrane-disordering action of ethanol: variation with membrane cholesterol content and depth of the spin label probe. Molecular Pharmacology, 19(3), 425-431.

Chopra, A., & Cevc, G. (2014). Non-invasive, epicutaneous immunisation with toxoid in deformable vesicles protects mice against tetanus, chiefly owing to a Th2 response. European Journal of Pharmaceutical Sciences, 56, 55-64.

Chtanova, T., Tangye, S. G., Newton, R. et al., (2004). T follicular helper cells express a distinctive transcriptional profile, reflecting their role as non-Th1/Th2 effector cells that provide help for B cells. The Journal of Immunology, 173(1), 68-78.

Clark, R. A. (2010). Skin-resident T cells: the ups and downs of on site immunity. Journal of investigative dermatology, 130(2), 362-370.

Clem, A. S. (2011). Fundamentals of vaccine immunology. Journal of global infectious diseases, 3(1), 73.

Combadiere, B., & Liard, C. (2011). Transcutaneous and intradermal vaccination. Human vaccines, 7(8), 811-827.

Combadière, B., & Mahé, B. (2008). Particle-based vaccines for transcutaneous vaccination. Comparative immunology, microbiology and infectious diseases, 31(2-3), 293-315.

Corcelli, A., & Lobasso, S. (2006). 25 characterization of lipids of halophilic archaea Methods in microbiology (Vol. 35, pp. 585-613): Elsevier.

Cumberbatch, M., Dearman, R., & Kimber, I. (1996). Constitutive and inducible expression of interleukin-6 by Langerhans cells and lymph node dendritic cells. Immunology, 87(4), 513-518.

Cumberbatch, M., Dearman, R., & Kimber, I. (1997). Langerhans cells require signals from both tumour necrosis factor-α and interleukin-1β for migration. Immunology, 92(3), 388-395.

Cumberbatch, M., Dearman, R., & Kimber, I. (1999). Langerhans cell migration in mice requires intact type I interleukin 1 receptor (IL-1RI) function. Archives of dermatological research, 291(6), 357-361.

Cumberbatch, M., Fielding, I., & Kimber, I. (1995). Epidermal Langerhans cell migration: signals and mechanisms Dendritic Cells in Fundamental and Clinical Immunology (pp. 173-175): Springer.

De Temmerman, M.-L., Rejman, J., Demeester, J. et al.,. (2011). Particulate vaccines: on the quest for optimal delivery and immune response. Drug discovery today, 16(13-14), 569-582.

Dicko, M., Oni, A.-Q., Ganivet, S. et al., (2000). Safety of immunization injections in Africa: not simply a problem of logistics. Bulletin of the World Health Organization, 78, 163-169.

Dragicevic-Curic, N., & Fahr, A. (2012). Liposomes in topical photodynamic therapy. Expert opinion on drug delivery, 9(8), 1015-1032.

Dubois, B., Massacrier, C., Vanbervliet, B., Fayette, J. et al., (1998). Critical role of IL-12 in dendritic cell-induced differentiation of naive B lymphocytes. The Journal of Immunology, 161(5), 2223-2231.

Dudani, R., Chapdelaine, Y., van Faassen, H. et al., (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.

Eckburg, P. B., Lepp, P. W., & Relman, D. A. (2003). Archaea and their potential role in human disease. Infection and immunity, 71(2), 591-596.

Ekwueme, D. U., Weniger, B. G., & Chen, R. T. (2002). Model-based estimates of risks of disease transmission and economic costs of seven injection devices in sub-Saharan Africa. Bulletin of the World Health Organization, 80, 859-870.

El Maghraby, G. M., Barry, B. W., & Williams, A. C. (2008). Liposomes and skin: from drug delivery to model membranes. European journal of pharmaceutical sciences, 34(4-5), 203-222.

El Maghraby, G. M., Williams, A. C., & Barry, B. W. (2000). Oestradiol skin delivery from ultradeformable liposomes: refinement of surfactant concentration. International journal of pharmaceutics, 196(1), 63-74.

Elsevier, G. (2017). Vía parenteral: 4 formas de administración de inyectables.

Fahr, A., & Muller, R. (2003). Invasomes for therapy of disorders, their preparation and use: Google Patents.

Franzmann, P., Stackebrandt, E., Sanderson, K. et al., (1988). Halobacterium lacusprofundi sp. nov., a halophilic bacterium isolated from Deep Lake, Antarctica. Systematic and Applied Microbiology, 11(1), 20-27.

Gall, D. (1966). The adjuvant activity of aliphatic nitrogenous bases. Immunology, 11(4), 369.

Gebhardt, T., Wakim, L. M., Eidsmo, L. et al., (2009). Memory T cells in nonlymphoid tissue that provide enhanced local immunity during infection with herpes simplex virus. Nature immunology, 10(5), 524.

Giudice, E. L., & Campbell, J. D. (2006). Needle-free vaccine delivery. Advanced drug delivery reviews, 58(1), 68-89.

Glenn, G. M., Rao, M., Matyas, G. R. et al., (1998). Skin immunization made possible by cholera toxin. Nature, 391(6670), 851.

Gonzalez, R. O., Higa, L. H., Cutrullis, R. A. et al., (2009). Archaeosomes made of Halorubrum tebenquichense total polar lipids: a new source of adjuvancy. BMC biotechnology, 9(1), 71.

Greenwood, B. (2014). The contribution of vaccination to global health: past, present and future. Phil. Trans. R. Soc. B, 369(1645), 20130433.

Gupta, P. N., Mishra, V., Rawat, A. et al., (2005). Non-invasive vaccine delivery in transfersomes, niosomes and liposomes: a comparative study. International journal of pharmaceutics, 293(1-2), 73-82.

Harandi, A. M., Davies, G., & Olesen, O. F. (2009). Vaccine adjuvants: scientific challenges and strategic initiatives. Expert review of vaccines, 8(3), 293-298.

Harding, C., Watkinson, A., Rawlings, A. et al.,(2000). Dry skin, moisturization and corneodesmolysis. International journal of cosmetic science, 22(1), 21-52.

Harris, R. A., Burnett, R., McQuilkin, S. et al., (1987). Effects of Ethanol on Membrane Order: Fluorescence Studies a. Annals of the New York Academy of Sciences, 492(1), 125-135.

Henriksen-Lacey, M., Christensen, D., Bramwell, V. W. et al., (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.

Henriksen-Lacey, M., Devitt, A., & Perrie, Y. (2011). The vesicle size of DDA: TDB liposomal adjuvants plays a role in the cell-mediated immune

response but has no significant effect on antibody production. Journal of Controlled Release, 154(2), 131-137.

Higa, L. H., Arnal, L., Vermeulen, M. et al., (2016). Ultradeformable archaeosomes for needle free nanovaccination with Leishmania braziliensis antigens. PloS one, 11(3), e0150185.

Hofland, H. E., van der Geest, R., Bodde, H. E. et al., (1994). Estradiol permeation from nonionic surfactant vesicles through human stratum corneum in vitro. Pharmaceutical research, 11(5), 659-664.

Holbrook, K. A., & Odland, G. F. (1974). Regional differences in the thickness (cell layers) of the human stratum corneum: an ultrastructural analysis. Journal of investigative dermatology, 62(4), 415-422.

Holmgren, J., Lycke, N., & Czerkinsky, C. (1993). Cholera toxin and cholera B subunit as oral—mucosal adjuvant and antigen vector systems. Vaccine, 11(12), 1179-1184

Honeywell-Nguyen, P. L., de Graaff, A. M., Groenink, H. W. et al., (2002). The in vivo and in vitro interactions of elastic and rigid vesicles with human skin. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects, 1573(2), 130-140.

Honeywell-Nguyen, P. L., Gooris, G. S., & Bouwstra, J. A. (2004). Quantitative assessment of the transport of elastic and rigid vesicle components and a model drug from these vesicle formulations into human skin in vivo. Journal of Investigative Dermatology, 123(5), 902-910.

Hussain, M. J., Wilkinson, A., Bramwell, V. W. et al., (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.

Jackson, L. A., Austin, G., Chen, R. T. et al., (2001). Safety and immunogenicity of varying dosages of trivalent inactivated influenza vaccine administered by needle-free jet injectors. Vaccine, 19(32), 4703-4709.

Jacobson, R. M., Swan, A., Adegbenro, A. et al., (2001). Making vaccines more acceptable—methods to prevent and minimize pain and other common adverse events associated with vaccines. Vaccine, 19(17-19), 2418-2427.

Jain, S., & Vyas, S. (2005). Mannosylated niosomes as carrier adjuvant system for topical immunization. Journal of pharmacy and pharmacology, 57(9), 1177-1184.

Jalilian, B., Christiansen, S. H., Einarsson, H. B. et al., (2013). Properties and prospects of adjuvants in influenza vaccination-messy precipitates or blessed opportunities? Molecular and cellular therapies, 1(1), 2.

Jalilian, B., Christiansen, S. H., Einarsson, H. B. et al., (2013). Properties and prospects of adjuvants in influenza vaccination-messy precipitates or blessed opportunities? Molecular and cellular therapies, 1(1), 2.

Janeway Jr, C. A., & Medzhitov, R. (2002). Innate immune recognition. Annual review of immunology, 20(1), 197-216.

Kallerup, R. S., & Foged, C. (2015). Classification of vaccines Subunit vaccine delivery (pp. 15-29): Springer.

Kapsenberg, M. L. (2003). Dendritic-cell control of pathogen-driven T-cell polarization. Nature Reviews Immunology, 3(12), 984.

KATES, M. (1993). Membrane lipids of extreme halophiles: biosynthesis, function and evolutionary significance: Biology of halophilic bacteria. II. Experientia, 49(12), 1027-1036.

Kelsoe, G. (2000). Studies of the humoral immune response. Immunologic research, 22(2-3), 199-210.

Khar, v. (2006). Targeted & Controlled Drug Delivery: Novel Carrier Systems (HB). CBS Publishers &

Kissenpfennig, A., & Malissen, B. (2006). Langerhans cells–revisiting the paradigm using genetically engineered mice. Trends in immunology, 27(3), 132-139.

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.

Klechevsky, E., Morita, R., Liu, M. . et al., (2008). Functional specializations of human epidermal Langerhans cells and CD14+ dermal dendritic cells. Immunity, 29(3), 497-510.

Knepp, V. M., Szoka Jr, F. C., & Guy, R. H. (1990). Controlled drug release from a novel liposomal delivery system. II. Transdermal delivery characteristics. Journal of Controlled Release, 12(1), 25-30.

Krishnan, L., & Sprott, G. D. (2008). Archaeosome adjuvants: Immunological capabilities and mechanism(s) of action. Vaccine, 26, 2043-2055.

Krishnan, L., Sad, S., Patel, G. B. et al., (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.

L Dudek, N., Perlmutter, P., Aguilar, I. et al., (2010). Epitope discovery and their use in peptide based vaccines. Current pharmaceutical design, 16(28), 3149-3157.

Lambert, P. H., & Laurent, P. E. (2008). Intradermal vaccine delivery: will new delivery systems transform vaccine administration? Vaccine, 26(26), 3197-3208.

Langenkamp, A., Messi, M., Lanzavecchia, A. et al., (2000). Kinetics of dendritic cell activation: impact on priming of T H 1, T H 2 and nonpolarized T cells. Nature immunology, 1(4), 311.

Levine, M. M., & Campbell, J. D. (2004). Mucosal immunization and needle-free injection devices. New Generation Vaccines. Marcel Dekker Inc.: New York, 393-399.

Li, N., Peng, L. H., Chen, X. et al., (2011). Effective transcutaneous immunization by antigen-loaded flexible liposome in vivo. International journal of nanomedicine, 6, 3241.

Li, N., Peng, L.-H., Chen, X. et al., (2011). Transcutaneous vaccines: novel advances in technology and delivery for overcoming the barriers. Vaccine, 29(37), 6179-6190.

Liu, L., Zhong, Q., Tian, T. et al., (2010). Epidermal injury and infection during poxvirus immunization is crucial for the generation of highly protective T cell–mediated immunity. Nature medicine, 16(2), 224.

Lu, D., & Hickey, A. J. (2007). Pulmonary vaccine delivery. Expert review of vaccines, 6(2), 213-226.

Mann, J. F., Shakir, E., Carter, K. C. et al., (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.

Mathai, J. C., Sprott, G. D., & Zeidel, M. L. (2001). Molecular mechanisms of water and solute transport across archaebacterial lipid membranes. Journal of Biological Chemistry, 276(29), 27266-27271.

Matousek, J. L., & Campbell, K. L. (2002). A comparative review of cutaneous pH. Veterinary dermatology, 13(6), 293-300.

Matzinger, P. (2002). The danger model: a renewed sense of self. Science, 296(5566), 301-305.

McCluskie, M. J., Deschatelets, L., & Krishnan, L. (2017). Sulfated archaeal glycolipid archaeosomes as a safe and effective vaccine adjuvant for induction of cell-mediated immunity. Human vaccines & immunotherapeutics, 13(12), 2772-2779.

Medzhitov, R. (2000). Advances in immunology: innate immunity. N. Engl. J. Med., 343, 338.

Medzhitov, R. (2001). Toll-like receptors and innate immunity. Nature Reviews Immunology, 1(2), 135.

Medzhitov, R., & Janeway Jr, C. A. (1997). Innate immunity: impact on the adaptive immune response. Current opinion in immunology, 9(1), 4-9.

Mezei, M., & Gulasekharam, V. (1980). Liposomes-a selective drug delivery system for the topical route of administration I. Lotion dosage form. Life Sciences, 26(18), 1473-1477.

Miller, M., & Pisani, E. (1999). The cost of unsafe injections. Bulletin of the World Health Organization, 77(10), 808.

Mishra, D., Dubey, V., Asthana, A. et al., (2006). Elastic liposomes mediated transcutaneous immunization against Hepatitis B. Vaccine, 24(22), 4847-4855.

Mishra, D., Mishra, P. K., Dabadghao, S. et al., (2010). Comparative evaluation of hepatitis B surface antigen–loaded elastic liposomes and ethosomes for human dendritic cell uptake and immune response. Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine, 6(1), 110-118.

Mishra, D., Mishra, P. K., Dubey, V. et al., (2007). Evaluation of uptake and generation of immune response by murine dendritic cells pulsed with

hepatitis B surface antigen-loaded elastic liposomes. Vaccine, 25(39-40), 6939-6944.

Mishra, D., Mishra, P. K., Dubey, V. et al., (2008). Systemic and mucosal immune response induced by transcutaneous immunization using Hepatitis B surface antigen-loaded modified liposomes. European Journal of Pharmaceutical Sciences, 33(4-5), 424-433.

Mitragotri, S. (2005). Immunization without needles. Nature Reviews Immunology, 5(12), 905.

Montanari, J., Maidana, C., Esteva, M. I. et al., (2010). Sunlight triggered photodynamic ultradeformable liposomes against Leishmania braziliensis are also leishmanicidal in the dark. Journal of Controlled Release, 147(3), 368-376.

Morilla, M., & Romero, E. (2012). Liposomal pH-sensitive nanomedicines in preclinical development (pp. 383-413): CRC Press, Boca Raton, FL.

Morilla, M.J., & Lilia Romero, E. (2016). Carrier deformability in drug delivery. Current pharmaceutical design, 22(9), 1118-1134.

Morilla, M.J., & Lilia Romero, E. (2016). Carrier deformability in drug delivery. Current pharmaceutical design, 22(9), 1118-1134.

Mosmann, T. R., & Coffman, R. (1989). TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. Annual review of immunology, 7(1), 145-173.

Mulholland, W. J., Arbuthnott, E. A., Bellhouse, B. J. et al.,(2006). Multiphoton high-resolution 3D imaging of Langerhans cells and keratinocytes in the mouse skin model adopted for epidermal powdered immunization. Journal of investigative dermatology, 126(7), 1541-1548.

Mura, S., Manconi, M., Sinico, C. et al., (2009). Penetration enhancer-containing vesicles (PEVs) as carriers for cutaneous delivery of minoxidil. International journal of pharmaceutics, 380(1-2), 72-79.

Nakanishi, Y., Lu, B., Gerard, C. et al., (2009). CD8+ T lymphocyte mobilization to virus-infected tissue requires CD4+ T-cell help. Nature, 462(7272), 510.

Namjoshi, S., & Benson, H. (2011). Transdermal delivery of vaccines. In Novel Approaches to Vaccine Research (pp. 1-17). Research Signpost.

Nickoloff, B. J., & Turka, L. A. (1994). Immunological functions of non-professional antigen-presenting cells: new insights from studies of T-cell interactions with keratinocytes.

Nir, Y., Paz, A., Sabo, E., & Potasman, I. (2003). Fear of injections in young adults: prevalence and associations. The American journal of tropical medicine and hygiene, 68(3), 341-344.

Nutall, J. (2011). BCG vaccination in HIVinfected

Partridge, J., Kieny, M. P., & Force, W. H. O. H. N. i. v. T. (2010). Global production of seasonal and pandemic (H1N1) influenza vaccines in 2009–2010 and comparison with previous estimates and global action plan targets. Vaccine, 28(30), 4709-4712.

Pasteur, L. (1880). De l'attenuation du virus du cholera des poules. CR Acad. Sci. Paris, 91, 673-680.

Pasteur, L. (1885). Methode pour prevenir la rage apres morsure.

Patel, G. B., Zhou, H., Ponce, A. et al., (2007). Mucosal and systemic immune responses by intranasal immunization using archaeal lipid-adjuvanted vaccines. Vaccine, 25(51), 8622-8636.

Patzelt, A., & Lademann, J. (2013). Drug delivery to hair follicles. Expert opinion on drug delivery, 10(6), 787-797.

Paul, A., Cevc, G., & Bachhawat, B. (1998). Transdermal immunisation with an integral membrane component, gap junction protein, by means of ultradeformable drug carriers, transfersomes. Vaccine, 16(2-3), 188-195.

Perez, A. P., Casasco, A., Schilrreff, P. et al., (2014). Enhanced photodynamic leishmanicidal activity of hydrophobic zinc phthalocyanine within archaeolipids containing liposomes. International journal of nanomedicine, 9, 3335.

Perrie, Y., Crofts, F., Devitt, A. et al., (2016). Designing liposomal adjuvants for the next generation of vaccines. Advanced drug delivery reviews, 99, 85-96.

Piqueras, B., Connolly, J., Freitas, H. et al., (2006). Upon viral exposure, myeloid and plasmacytoid dendritic cells produce 3 waves of distinct chemokines to recruit immune effectors. Blood, 107(7), 2613-2618.

Planas, M., Gonzalez, P., Rodriguez, L. et al., (1992). Noninvasive percutaneous induction of topical analgesia by a new type of drug carrier, and prolongation of local pain insensitivity by anesthetic liposomes. Anesthesia and analgesia, 75(4), 615-621.

Plotkin, S. (2014). History of vaccination. Proceedings of the National Academy of Sciences, 111(34), 12283-12287.

Provost, P., Hughes, J., Miller, W. et al., (1986). An inactivated hepatitis A viral vaccine of cell culture origin. Journal of medical virology, 19(1), 23-31.

Puissant-Lubrano, B., Bossi, P., Gay, F. et al., (2010). Control of vaccinia virus skin lesions by long-term-maintained IFN-γ+ TNF-α+ effector/memory CD4+ lymphocytes in humans. The Journal of clinical investigation, 120(5), 1636-1644.

Qiu, Y., Gao, Y., Hu, K. et al., (2008). Enhancement of skin permeation of docetaxel: a novel approach combining microneedle and elastic liposomes. Journal of Controlled Release, 129(2), 144-150.

Ramirez, J. E. V., Sharpe, L. A., & Peppas, N. A. (2017). Current state and challenges in developing oral vaccines. Advanced drug delivery reviews, 114, 116-131.

Rand, R., Fuller, N., Gruner, S. et al., (1990). Membrane curvature, lipid segregation, and structural transitions for phospholipids under dual-solvent stress. Biochemistry, 29(1), 76-87.

Rawlings, A. (2003). Trends in stratum corneum research and the management of dry skin conditions. International journal of cosmetic science, 25(1-2), 63-95.

Rechtsteiner, G., Warger, T., Osterloh, P. et al., (2005). Cutting edge: priming of CTL by transcutaneous peptide immunization with imiquimod. The Journal of Immunology, 174(5), 2476-2480.

Renn, C. N., Sanchez, D. J., Ochoa, M. T. et al., (2006). TLR activation of Langerhans cell-like dendritic cells triggers an antiviral immune response. The Journal of Immunology, 177(1), 298-305.

Riedel, S. (2005). Edward Jenner and the history of smallpox and vaccination. Paper presented at the Baylor University Medical Center Proceedings.

Robinson, H. L., & Amara, R. R. (2005). T cell vaccines for microbial infections. Nature medicine, 11(4s), S25.

Romero, E. L., & Morilla, M. J. (2011). Topical and mucosal liposomes for vaccine delivery. Wiley Interdisciplinary Reviews: Nanomedicine and Nanobiotechnology, 3(4), 356-375.

Romero, E.L., & Morilla, M. J. (2011). Topical and mucosal liposomes for vaccine delivery. Wiley Interdisciplinary Reviews: Nanomedicine and Nanobiotechnology, 3(4), 356-375.

Salk, J. E., Krech, U., Youngner, J. et al., (1954). Formaldehyde treatment and safety testing of experimental poliomyelitis vaccines. American Journal of Public Health and the Nations Health, 44(5), 563-570.

Sallusto, F., & Lanzavecchia, A. (2009). Heterogeneity of CD4+ memory T cells: functional modules for tailored immunity. European journal of immunology, 39(8), 2076-2082.

Sarno, M. J., Blase, E., Galindo, N. et al., (2000). Clinical immunogenicity of measles, mumps and rubella vaccine delivered by the Injex jet injector: comparison with standard syringe injection. The Pediatric infectious disease journal, 19(9), 839-842.

Schaller, M., & Korting, H. C. (1996). Interaction of liposomes with human skin: the role of the stratum corneum. Advanced drug delivery reviews, 18(3), 303-309.

Schön, M., & Schön, M. (2007). Imiquimod: mode of action. British Journal of Dermatology, 157(s2), 8-13.

Schreier, H., & Bouwstra, J. (1994). Liposomes and niosomes as topical drug carriers: dermal and transdermal drug delivery. Journal of Controlled Release, 30(1), 1-15.

Sieling, P., Chatterjee, D., Porcelli, S. et al., (1995). CD1-restricted T cell recognition of microbial lipoglycan antigens. Science, 269(5221), 227-230.

Simerska, P., Moyle, P. M., Olive, C. et al., (2009). Oral vaccine delivery-new strategies and technologies. Current drug delivery, 6(4), 347-358.

Simonsen, L., Kane, A., Lloyd, J. et al., (1999). In focus-unsafe injections in the developing world and transmission of bloodborne pathogens: a review. Bulletin of the World Health Organization, 77(10), 789-800.

Simpson, C. L., Patel, D. M., & Green, K. J. (2011). Deconstructing the skin: cytoarchitectural determinants of epidermal morphogenesis. Nature reviews Molecular cell biology, 12(9), 565Boncheva M, de Sterke J, Caspers PJ,

Skountzou, I., Brock, N., Lelutiu, N. et al., (2017). Adjuvants for Skin Vaccination Immunopotentiators in Modern Vaccines (Second Edition) (pp. 399-419): Elsevier.

Slütter, B., Hagenaars, N., & Jiskoot, W. (2008). Rational design of nasal vaccines. Journal of drug targeting, 16(1), 1-17.

Sprott, G. D. (1992). Structures of archaebacterial membrane lipids. Journal of bioenergetics and biomembranes, 24(6), 555-566.

Sprott, G. D., Dicaire, C. J., Gurnani, K. et al., (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.

Sprott, G. D., Tolson, D. L., & Patel, G. B. (1997). Archaeosomes as novel antigen delivery systems. FEMS Microbiology Letters, 154(1), 17-22.

Sprott, G., Dicaire, C., Gurnani, K. et al., (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.

Stanley, M. (2002). Imiquimod and the imidazoquinolones: mechanism of action and therapeutic potential. Clinical and experimental dermatology, 27(7), 571-577.

Steinman, L. (2007). A brief history of T H 17, the first major revision in the T H 1/T H 2 hypothesis of T cell–mediated tissue damage. Nature medicine, 13(2), 139.

Sugita, K., Kabashima, K., Koga, C. et al., (2006). Eosinophilic pustular folliculitis successfully treated with sequential therapy of interferon-γ and ciclosporin. Clinical and Experimental Dermatology: Viewpoints in dermatology, 31(5), 709-710.

Swartzendruber, D. C., Wertz, P. W., Madison, K. C. et al., (1987). Evidence that the corneocyte has a chemically bound lipid envelope. Journal of investigative dermatology, 88(6), 709-713.

Tang, A., Amagai, M., Granger, L. G. et al., (1993). Adhesion of epidermal Langerhans cells to keratinocytes mediated by E-cadherin. Nature, 361(6407), 82.

Teunissen, M., Kapsenberg, M., & Bos, J. (1997). Langerhans cells and related skin dendritic cells. Skin immune system, 2.

Theeten, H., Van Damme, P., Hoppenbrouwers, K. et al., (2005). Effects of lowering the aluminium content of a dTpa vaccine on its immunogenicity and reactogenicity when given as a booster to adolescents. Vaccine, 23(12), 1515-1521.

Thomas Jr, F., & Magill, T. (1936). Vaccination of human subjects with virus of human influenza. Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine, 33(4), 604-606.

Tolson, D. L., Latta, R. K., Patel, G. B. et al., (1996). Uptake of archaeobacterial liposomes and conventional liposomes by phagocytic cells. Journal of Liposome Research, 6(4), 755-776.

Tomljenovic, L., & A Shaw, C. (2011). Aluminum vaccine adjuvants: are they safe? Current medicinal chemistry, 18(17), 2630-2637.

Torchilin, V. P. (2014). Multifunctional, stimuli-sensitive nanoparticulate systems for drug delivery. Nature reviews Drug discovery, 13(11), 813.

Touitou, E. (1996). Compositions for applying active substances to or through the skin: Google Patents.

Ueno, H., Klechevsky, E., Morita, R. et al., (2007). Dendritic cell subsets in health and disease. Immunological reviews, 219(1), 118-142.

Valentine, D. L. (2007). Opinion: Adaptations to energy stress dictate the ecology and evolution of the archaea. Nature Reviews Microbiology, 5(4), 316.

Valladeau, J., & Saeland, S. (2005). Cutaneous dendritic cells. Paper presented at the Seminars in immunology.

Valladeau, J., Ravel, O., Dezutter-Dambuyant, C. et al., (2000). Langerin, a novel C-type lectin specific to Langerhans cells, is an endocytic receptor that induces the formation of Birbeck granules. Immunity, 12(1), 71-81.

van de Vossenberg, J. L., Driessen, A. J., Grant, D. et al., (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.

van Hal, D. A., Bouwstra, J. A., van Rensen, A. et al., (1996). Preparation and characterization of nonionic surfactant vesicles. Journal of colloid and interface science, 178(1), 263-273.

Verma, D. D. (2002). Invasomes-Novel Vesicular Carriers for Enhanced Topical Delivery: Characterization and Skin Penetration Properties.

Verma, D., Verma, S., Blume, G. et al., (2003). Liposomes increase skin penetration of entrapped and non-entrapped hydrophilic substances into human skin: a skin penetration and confocal laser scanning microscopy study. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, 55(3), 271-277.

Verma, D., Verma, S., McElwee, K. et al., (2004). Treatment of alopecia areata in the DEBR model using Cyclosporin A lipid vesicles. European Journal of Dermatology, 14(5), 332-338.

Vogelbruch, M., Nuss, B., Körner, M. et al., (2000). Aluminium-induced granulomas after inaccurate intradermal hyposensitization injections of aluminium-adsorbed depot preparations. Allergy, 55(9), 883-887.

Vyas, S. P., Singh, R. P., Jain, S. et al., (2005). Non-ionic surfactant based vesicles (niosomes) for non-invasive topical genetic immunization against hepatitis B. International journal of pharmaceutics, 296(1-2), 80-86.

Vyas, S., Singh, R., Jain, S. et al., (2005). Non-ionic surfactant based vesicles (niosomes) for non-invasive topical genetic immunization against hepatitis B. International journal of pharmaceutics, 296(1-2), 80-86.

Wang, J., Hu, J. h., Li, F. et al., (2007). Strong cellular and humoral immune responses induced by transcutaneous immunization with HBsAg DNA–cationic deformable liposome complex. Experimental dermatology, 16(9), 724-729.

Wang, J., Hu, J. H., Li, F. Q. et al., (2007). Strong cellular and humoral immune responses induced by transcutaneous immunization with HBsAg DNA–cationic deformable liposome complex. Experimental dermatology, 16(9), 724-729.

Warner, R. R., Myers, M. C., & Taylor, D. A. (1988). Electron probe analysis of human skin: determination of the water concentration profile. Journal of Investigative Dermatology, 90(2), 218-224.

Wertz, P. W., & Downing, D. T. (1987). Covalently bound ω-hydroxyacylsphingosine in the stratum corneum. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Lipids and Lipid Metabolism, 917(1), 108-111.

Williams, J., Fox-Leyva, L., Christensen, C. et al., (2000). Hepatitis A vaccine administration: comparison between jet-injector and needle injection. Vaccine, 18(18), 1939-1943.

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, 87(12), 4576-4579.

Wood, L. C., Jackson, S. M., Elias, P. M. et al., (1992). Cutaneous barrier perturbation stimulates cytokine production in the epidermis of mice. The Journal of clinical investigation, 90(2), 482-487.

World Health Organisation (2013). Global routine vaccination coverage 2012. Wkly Epidemiol, 88, 482–485.

Yamauchi, K., Onoue, Y., Tsujimoto, T. et al., (1997). Archaebacterial lipids: high surface activity of polyisoprenoid surfactants in water. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 10(1), 35-39.

CAPITULO 2

VACUNACIÓN TÓPICA CON NANOVESÍCULAS "SÚPER-ESTABLES" LISTAS PARA USAR

Los resultados mostrados en este Capítulo forman parte de la siguiente publicación y presentaciones a Congresos:

“Topical vaccination with super-stable ready to use nanovesicles”. **Ayelen Tatiana Caimi**, Federico Parra, Marcelo Alexandre de Farías, Rodrigo Villares Portugal, Ana Paula Pérez, Eder Lilia Romero, María José Morilla. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 2017. 152: p. 114-123. doi.org/10.1016/j.colsurfb.2016.12.039 (Impact factor: 3.997

“Topical vaccination with super-stable ready to use nanovesicles” **Caimi A**.; Parra F.; De Farías M.; Villares Portugal R.; Pérez AP.; Romero EL. ; Morilla MJ. Presentación de póster y charla oral. Reunión Conjunta SAIC.SAI.SAFE (2016) (Trabajo publicado en la revista Medicina. Buenos aires vol. 76 Supl. I – 2016)

“*Nanovacunación tópica. Aspectos de la formulación: incorporación de antígeno y estabilidad*” **Caimi A**, Parra F, Higa L, Pérez AP, Romero EL y Morilla MJ. Jornadas de Doctorandos y Estudiantes avanzados de Ciencia y Tecnología. Universidad Nacional de Quilmes. Exposición oral. (2015)

“Aplicación tópica con materia blanda”. **Caimi A**, Parra F, Higa L, Pérez AP, Romero EL y Morilla MJ. IV Simposio de jóvenes investigadores, Asociación Argentina de Nanomedicinas, CABA. Exposición oral (2014)

2.1 Introducción

La vacunación parenteral requiere del uso de agujas para inyectar cantidades controladas de antígeno y adyuvantes por las rutas intramuscular, subcutánea o intradérmica (Nicolas & Guy, 2008). Sin embargo, el musculo esquelético y el tejido subcutáneo, tienen relativamente poca cantidad de células presentadoras de antígeno (CPA) y la expresión de moléculas co-estimulatorias y del MHC II está ausente en miocitos que no pueden activar células T (Nicolas & Guy, 2008). Las vacunas inyectables necesitan de personal entrenado y su administración está relacionada con un alto riesgo de contagio de enfermedades infecciosas en países en desarrollo debido al reúso de agujas no estériles (Partidos et al., 2001). Estos hechos, sumados al complejo proceso de manufactura de vacunas líquidas, ubican al desarrollo de vacunas indoloras y no invasivas que no requieran el uso de agujas, como prioridad para las agencias de salud pública (Hickling et al., 2011). La vacunación tópica resulta muy atractiva debido a que tiene el potencial de permitir que la administración de la vacuna sea más equitativa, más segura e igual o más eficiente que la vacunación parenteral (Bal et al., 2010). Sin embargo, el principal desafío de una vacunación tópica, es la presencia de la barrera del estrato corneo (*SC*) que se interpone entre los antígenos y adyuvantes y el tejido linfoide asociado a la piel (SALT) que se encuentra unos pocos cientos de micrones por debajo de la superficie de la piel (Bal et al., 2010; Kirschner et al., 2012). En la vacunación tópica convencional, el estrato corneo se disrumpe por el tratamiento con agentes físicos y químicos agresivos (Carstens, 2009; Combadiere & Mahé, 2008), y los antígenos se combinan con altas dosis de poderosos agentes inmunomoduladores tales como la toxina de cólera o la toxina termolábil de *Escherichia coli*, o ligandos de receptores de tipo Toll (TLR), tales como imiquimod o motivos CpG bacterianos (Lee et al., 2013). La intensa actividad pro-inflmatoria de estos adyuvantes tópicos, puede inducir a reacciones adversas en la piel (Walter et al., 2013) y afecciones autoinmunes (Riminton et al., 2004). Por otro lado, el daño en la barrera de la piel produce irritación local, lo que potencia el desarrollo de posibles infecciones en la piel (Harandi et al., 2009). Estas son las principales razones del retraso en el desarrollo clínico de la vacunación tópica. En este escenario, materia blanda con propiedades elasto-mecánicas que permitan la penetración del estrato córneo intacto, podría allanar

el camino hacia una vacunación tópica más segura y eficiente. Liposomas Ultradeformables (LUD) preparados a partir de fosfatidilcolina de soja (SPC) y un activador de borde tal como colato de sodio (ColNa) fueron utilizados en ensayos preclínicos para la administración tópica desde mediados de los años 90 para inducir respuestas inmunes sistémicas humorales, celulares y séricas antígeno específicas (Chopra & Cevc, 2014; Gupta et al., 2005; Li et al., 2011; Paul et al., 1998; Paul et al., 1995; Wang et al., 2007). Además, en nuestro grupo previamente se reportó que la inmunización tópica con ovoalbúmina (OVA) incluida en la estructura de Arqueosomas Ultradeformables (AUD: preparados con arqueolípidos polares totales (APT) extraídos del arquebacteria *Halorubrum Tebenquichense*, SPC y ColNa en relaciones 3:3:1 p/p **(**Figura 2.1) inducen respuestas IgG OVA-específicas de larga duración, con títulos 2 veces mayores que aquellos inducidos por LUD-OVA (OVA incluida en el interior de LUD preparados con SPC y ColNa en relación 6:1 p/p y sin la presencia de APT) (Higa et al., 2012). Una tendencia similar se encontró luego de la administración tópica con antígenos de *Leishmania braziliensis* incluidos en AUD (Higa et al., 2016). AUD aplicados tópicamente pueden penetrar el estrato córneo e incrementar la penetración de una proteína como la OVA (PM ~45 KDa) hasta la epidermis viable (Carrer et al., 2014; Morilla & Romero, 2015). Además, AUD son más ávidamente capturados por células fagocíticas y APC inmaduras, que aquellas vesículas que carecen de APT (Morilla & Romero, 2015) Sin embargo, existen dos inconvenientes principales para el desarrollo de la vacunación tópica con nanovesículas ultradeformables: i. el complejo proceso de manufactura (Alving et al., 2012) y ii. la baja estabilidad de las formulaciones durante su almacenamiento y uso, dada básicamente por la presencia de una alta proporción de surfactantes necesarios para la ultradeformabilidad (Duangjit et al., 2014; Montanari et al., 2009).

El proceso de manufactura de vacunas liposomales consiste de varios pasos los que incluyen: la incorporación de los antígenos en la fase acuosa (Gupta et al., 2005; Li et al., 2011; Wang et al., 2007) o su asociación/partición en las bicapas lipídicas (Chopra & Cevc, 2014). A continuación, las nanovesículas y el antígeno se deben someterse juntos al proceso de reducción de tamaño de las vesículas, la eliminación de la fracción libre de la asociada y su cuantificación la esterilización y la deshidratación. Dichos procesos producen

efectos desestabilizantes tanto de las nanovesículas como en los antígenos proteicos (Mohammed et al., 2006). La inclusión del antígeno se lleva a cabo asumiendo que es un paso imprescindible para lograr una respuesta inmune antígeno específica, aunque evitarlo podría conducir a la producción de formulaciones mucho más simples. La mezcla física entre las nanovesículas y el antígeno, la cual puede realizarse in situ antes de la administración, podría acelerar la manufactura y reducir el costo industrial de un producto final para inmunización tópica. Por otro lado, las nanovesículas destinadas a uso farmacéutico deben ser capaces de conservar su estabilidad coloidal, física y química durante largos períodos de almacenamiento, y si es posible, resistir a una posible pérdida de la cadena de frío o, mejor aún, no necesitar de dicha cadena para su almacenamiento (Mohammed et al., 2006).

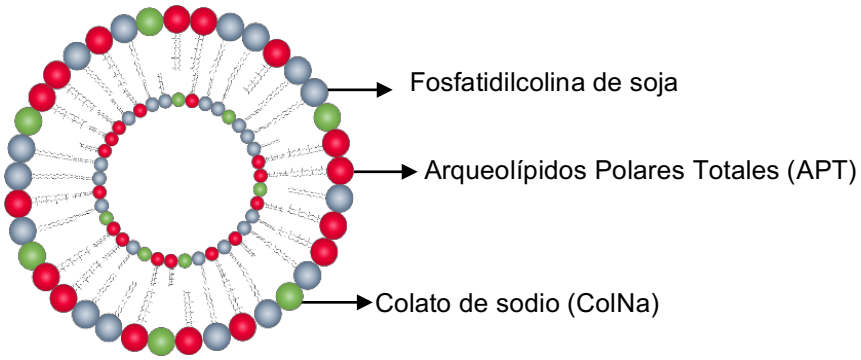


Figura 2.1 Representación de arqueosomas ultradeformables (AUD) preparados con arqueolípidos polares totales (APT) extraídos del arquea *Halorubrum Tebenquichense*, SPC y ColNa en relaciones 3:3:1 p/p

APT son una mezcla de lípidos bifitanilicos formados por cadenas isoprenoides unidos por enlaces éteres en configuración sn-2,3 al glicerol. Las vesículas que contienen APT demostraron ser más resistentes frente a la acción de enzimas lipolíticas, hidrolíticas o ataques oxidativos (Corcelli & Lobasso, 2006), y frente a situaciones de estrés físico tales como la nebulización (Altube et al., 2016), que aquellas vesículas preparadas sin APT. En este Capítulo, especulamos que los APT podrían incrementar la estabilidad estructural de las bicapas ultradeformables, permitiendo resistir procesos de esterilización, liofilización y almacenamiento. Luego de almacenados como un liofilizado, podrían ser rehidratados y mezclados físicamente con un antígeno en el momento previo a la inmunización. Para evaluar esta hipótesis, en este trabajo sometimos los AUD al estrés térmico de la esterilización por calor y al estrés de

congelamiento/descongelamiento producido en la liofilización. La dispersión acuosa de AUD esterilizados fueron liofilizados (AUD_{EL}) y luego almacenados a 4 y 40°C. Finalmente, se evaluó la inmunogenicidad de OVA asociada a los AUD frescos y AUD esterilizados y liofilizados de diferentes formas: incluida en el interior acuoso de AUD, mezclada físicamente con AUD y OVA y AUD administrados secuencialmente.

2.2 Materiales y métodos

2.2.1 Materiales

Fosfatidilcolina de soja (SPC, pureza> 90%) fue un obsequio de Lipoid, Ludwigshafen, Alemania. Colato de sodio (NaChol), Sephadex G-25, Sephacryl S-200, Ovalbúmina grado V (OVA), 2,2-azino-bis (3-etilbenzotiazolin-6-ácido sulfónico) (ABTS), nitrato de aluminio nonahidratado ($Al(NO_3)_3\times 9H_2O$), Tween-20 y Tritón X-100 fueron adquiridos en Sigma-Aldrich (MO, EE.UU.). Hidroxipireno-1.3.3-ácido trisulfonico (HPTS) fue de Molecular Probes (Eugene, Oregon). DPX (p-Xylene-Bis-Pyridinium Bromide) fue de Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA. Ficoll fue de GE Healthcare, Munich, Alemania. Hypaque fue adquirido en Winthrop Products, Buenos Aires, Argentina. Glicerol fue de ICN Biomedicals Inc. Aurora, Ohico. Glucosa, manosa y trehalosa fueron de Anedra, Argentina. El medio Roswell Park Memorial Institute 1640 (RPMI) fue de Gibco, Argentina. El suero fetal bovino (SFB), la solución antibiótica/antimicótica (penicilina 10000 UI/ml, sulfato de estreptomicina 10 mg/ml, anfotericina B 25 µg/ml), glutamina y tripsina/ácido etilendiaminotetraacético fueron adquiridos en PAA Laboratories GmbH (Pasching, Austria).

2.2.2. Crecimiento de arquebacterias, extracción y caracterización de lípidos polares totales

Arqueabacterias *H. tebenquichense*, aisladas de muestras de suelo de Salina Chica, Península de Valdés, Chubut, Argentina fueron crecidas en medio basal suplementado con extracto de levadura y glucosa a 37°C. La biomasa fue

crecida en 15 l de medio de cultivo en un biorreactor casero de acero inoxidable y cosechada luego de 96 h de crecimiento. Los arqueolípidos polares totales (APT) se extrajeron de la biomasa utilizando el método Bligh & Dyer modificado para halófilas extremas (Kates & Kushwaha, 1995). Se aislaron entre 400 y 700 mg de APT de cada lote de cultivo. La reproducibilidad de la composición de cada extracto de LPT se caracterizó rutinariamente por el contenido de fosfatos (Butcher et al., 1961), y espectrometría de masa, como se describe en Higa et al., 2012 (Higa et al., 2012)

2.2.3 Preparación de nanovesículas

Arqueosomas (ARC) preparados a partir de APT, liposomas ultradeformables (LUD) preparados con SPC: ColNa 6:1 p/v, arqueosomas ultradeformables (AUD) preparados de APT: SPC: ColNa 3:3:1 p/p y liposomas (L) hechos de SPC se prepararon por el método de hidratación de la película lipídica. Brevemente, mezclas de lípidos (60 mg de APT para ARC; 120 mg SPC y 20 mg ColNa para LUD; 60 mg de APT, 60 mg de SPC y 20 mg de ColNa para AUD y 60 mg de SPC para L) se disolvieron en 3 ml de cloroformo: metanol 1:1 v/v. Luego, los solventes se evaporaron en rotavapor a 40°C. Las películas lipídicas fueron secadas con N_2 y rehidratadas con 3 ml de fase acuosa (Buffer Tris-HCl 100 mM, pH 7,4 con NaCl 0,9% p/v – (buffer Tris-HCl)) hasta una concentración final de 40 mg/ml de lípidos totales en el caso de AUD y LUD y 20 mg/ml en el caso de ARQ y L. Las suspensiones resultantes se sonicaron (1 h en sonicador de baño 80 W, 80 KHz) y se extruyeron 10 veces a través de un sándwich de filtros de policarbonato con tamaños de poro de 0.2 µm y 0,1 µm usando un extrusor Thermobarrel (Northern Lipids, Vancouver, Canadá).

Para preparar las nanovesículas conteniendo OVA (AUD-OVA), la película lipídica se hidrató con 3 ml de una solución 6 mg/ml de OVA en buffer Tris-HCl. OVA libre se removió de AUD-OVA utilizando cromatografía de exclusión molecular a través de Sephacryl-S200 mediante la técnica de centrifugación en minicolumnas (Fry et al., 1978). Brevemente, alícuotas de 300 µl de AUD-OVA se colocaron en una jeringa de 3 ml llena con Sephacryl-S200 y se centrifugaron durante 3 min a 700g. Luego de la elusión con 300 µl de buffer

Tris HCl, se recolectaron 5 fracciones de entre 240 y 300 µl y el perfil de elusión se determinó mediante la cuantificación de proteínas y fosfolípidos en cada fracción.

Para preparar AUD y LUD conteniendo HPTS/DPX (AUD-HPTS/DPX y LUD-HPTS/DPX), las películas lipídicas se hidrataron con una solución 35 mM HPTS y 50 mM DPX en Buffer Tris-HCl pH 8,7. HPTS/DPX libre, no encapsulado, se removió de las nanovesículas mediante filtración en gel con Sephadex G-25 mediante la técnica de microcolumnas, como se describió antes.

2.2.4 Caracterización de nanovesículas

2.2.4.1 Tamaño y potencial Zeta

El tamaño, índice de polidispersidad (PDI) y el potencial de Zeta se determinaron mediante dispersión dinámica de luz (DLS) y análisis de dispersión de luz de fase (PALS), respectivamente, usando un equipo nanoZsizer (Malvern Instruments, Malvern, Reino Unido). Las muestras se diluyeron 1 en 20 con buffer Tris-HCl.

2.2.4.2 Cuantificación de fosfolípidos, OVA y HPTS

Los fosfolípidos se cuantificaron mediante un microensayo colorimétrico de fosfato (Butcher et al., 1961).

OVA se cuantificó mediante el método de ácido bicinconínico (BCA), empleando un kit comercial (Micro BCATMProtein Assay Kit, Thermo Scientific), luego de la delipidación de las muestras (Sprott et al., 2003; Wessel & Flügge, 1984). Brevemente, para la delipidación, 100 µl de AUD-OVA se colocaron en el interior de un tubo eppendorf al que a continuación se le agregaron 400 µl de metanol, 400 µl de cloroformo y 220 µl de agua. Luego de Vortexear vigorosamente, los tubos se centrifugaron durante 3 min a 9000g. Se removió la fase superior y se agregaron 600 µl de metanol. Luego de un segundo paso de centrifugación, el sobrenadante fue descartado y el precipitado de proteína resultante se secó con flujo de N_2. El precipitado se solubilizó en SDS 5% y se cuantificó de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

HPTS se cuantificó por espectrofuorometria (λEx 413 nm y λEm 515 nm) antes y después de la completa disrupción de las nanovesículas con 10% v/v

Tritón X-100. La intensidad de fluorescencia (IF) de la muestra, calculada como IF con tritón X-100 – IF sin disrumpir, se comparó con una curva estándar preparada con HPTS en Buffer Tris-HCl pH 8,7. La curva fue lineal en el rango de 0.8-12 μM de HPTS con un coeficiente de correlación de 0,996.

2.2.5 Nanovesículas congeladas-descongeladas y liofilizadas-rehidratadas

Nanovesículas recién preparadas se congelaron en presencia y ausencia de glicerol, solo o combinado con glucosa, manosa o trehalosa. Las nanovesículas, o una mezcla de nanovesículas con carbohidratos (0,07% p/v para glucosa y manosa, y 0,14% p/v para trehalosa, en una relación lípido:carbohidrato de 10:1 mol:mol, correspondiente a 4 mM de carbohidrato) fueron agregados a un tubo conteniendo 6.3 mg de glicerol estéril previamente pesados, hasta llegar a una concentración final de glicerol de 2.5% v/v (3.15% p/v). Alícuotas de 200 μl se congelaron a -80°C durante 24 h. Luego, parte de las muestras se dejaron a temperatura ambiente, y la otra parte se liofilizaron (-80°C y 0.05 mbar) durante 48 h utilizando un instrumento Freeze Dryer Unit Gamma A (MartinChrist, Germany). Previo a su uso, las muestras liofilizadas se rehidrataron en agua bidestilada hasta alcanzar su concentración lipídica inicial. El proceso de rehidratación se completó con 30 s de agitación con vortex. AUD y LUD cargados con HPTS-DPX también fueron congelados y liofilizados en presencia de glicerol y glucosa, como se describió antes, y la liberación de HPTS se evaluó luego de los procesos de descongelamiento y rehidratación, tal como se mencionó antes.

2.2.6 Análisis calorimétrico por calorimetría diferencial de barrido (DSC)

La temperatura de transición de fase (Tm) y el cambio de entalpia asociado (ΔH) de las nanovesículas frescas y liofilizadas (con y sin glucosa y glicerol), sólidas y rehidratadas se determinaron mediante calorimetría diferencial de barrido (DSC), desde -80 hasta 50°C, a un flujo de 5°C/min en un equipo Mettler Toledo DSC 822

2.2.7 Morfología por microscopía electrónica de transmisión criogénica (cryo-TEM)

La morfología de las nanovesículas frescas y liofilizadas-rehidratadas con glicerol y glucosa se analizó mediante microscopia electrónica criogénica (Cryo-TEM) y TEM. Para la realización del Cryo-TEM, las muestras se prepararon en un sistema de vitrificación de ambiente controlado Vitrobot Mark IV (FEI, The Netherlands), bajo condiciones de temperatura y humedad controladas (22°C, 100%). Las imágenes se adquirieron empleando un instrumento Jeol JEM-1400Plus (JEOL, Japón), operando a 120 kV con una cámara CCD GatanMultiScan 794. Tanto la toma de imágenes como su colección posterior se realizaron con el software Digital Micrograph (Gatan-USA). Las imágenes no fueron procesadas después de la adquisición. La preparación de las muestras y la adquisición de los datos se realizaron en el Electron Microscopy Laboratory (LME) del Brazilian Nanotechnology National Laboratory (LNNano).

Para la realización del TEM, las muestras se depositaron sobre una grilla de carbón. Sobre las muestras se colocó una gota de ácido fosfotúnstico durante un minuto, luego se secaron al aire y se analizaron empleando un equipo Jeol 1200-EX II (JEOL, Japón)

2.2.8 Calentamiento y esterilización de las nanovesículas

Las suspensiones de nanovesículas fueron colocadas en tubos de vidrio de 1 ml, ligeramente cubiertos por una tapa a rosca que permitió el contacto del vapor con las muestras. Las muestras se autoclavaron en un equipo VZ 100 (Villary Zaurdo S.R.L. Buenos Aires, Argentina) durante 15 min a 121°C. Luego de esterilizadas las muestras se dejaron a temperatura ambiente durante una hora, antes de medirles tamaño y cuantificar el contenido de HPTS. Las nanovesículas también se incubaron a 80°C durante 6 h en un baño termostatizado. AUD y LUD cargados con HPTS/DPX se sometieron al mismo tratamiento, y su contenido fue monitoreado como se describió antes.

2.2.9 Deformabilidad

La deformabilidad (D) de las nanovesículas se calculó según Van den Bergh et al., 2001 (van den Bergh, Wertz, Junginger, & Bouwstra, 2001), utilizando la siguiente formula $D=J(rv/rp)^2$, donde J es la tasa de penetración de las nanovesículas a través de una barrera de semipermeable, rv es el tamaño de las nanovesículas después de la extrusión, y rp es del tamaño de poro de la membrana. Para determinar J, las nanovesículas se extruyeron a través de dos membranas apiladas de 50 nm (rp) a 0,8 MPa utilizando un extrusor Thermobarrel. El volumen extruido se recolectó por minuto a lo largo de 15 minutos, se cuantificaron fosfolípidos a cada fracción y J se calculó como el área bajo la curva del gráfico de fosfolípidos recuperados en función del tiempo. El diámetro promedio de la vesícula después de la extrusión (rv) se midió por DLS.

2.2.10 Estabilidad frente al almacenamiento

La estabilidad coloidal de las suspensiones acuosas y liofilizadas se determinó luego de 5 meses de almacenamiento a 4 y 40 ° C, determinando el tamaño, PDI y potencial Z de las antes y después del tratamiento, como se describió antes.

2.2.11 Inmunización

2.2.11.1 Animales y esquema de inmunización

Ratones Balb/c machos de 4-6 semanas de edad se obtuvieron de la Facultad de Ciencias Veterinarias (UNLP). Se alojaron 5 ratones por jaula y se mantuvieron en una habitación ventilada en condiciones controladas a temperatura ambiente constante de 22 ºC, con un ciclo de luz-oscuridad de 12/12 horas y acceso libre a comida y agua. Todos los procedimientos se llevaron a cabo de acuerdo con los lineamientos institucionales y fueron aprobados por el Comité Institucional de Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio (CICUAL) del Departamento de Ciencia y Tecnología de la UNQ

Cinco ratones por grupo fueron inmunizados tópicamente de la siguiente forma: i: AUD con OVA incorporada en la fase acuosa, ii: AUD mezclado

físicamente con OVA, iii: administración secuencial de AUD seguida por OVA luego de 1h; iv: AUD esterilizado, liofilizado y rehidratado mezclado con OVA; v: LUD mezclado con OVA y vi; LUD esterilizado, liofilizado y rehidratado mezclado con OVA. Para la administración tópica se recortó el cabello del lomo manualmente el día anterior a la aplicación y se aplicaron las nanovesículas sobre la superficie de la piel intacta de cada ratón, en un área de 2 $cm^{2.}$ Los ratones se mantuvieron en jaulas individuales durante 30 minutos hasta que las gotas se secaron completamente. Las aplicaciones se realizaron una vez a la semana durante cuatro semanas (*prime*), luego los animales recibieron un refuerzo el día 42 (*boost*). Cada dosis consistió en 600 µg de fosfolípidos y 75 µg de OVA. Adicionalmente, se realizaron inmunizaciones subcutáneas de ARQ mezclados con OVA e intramusculares de OVA mezclada con $Al(OH)_3$ (5 mg) como controles, las cuales se llevaron a cabo los días 0 y 21 y un *boost* en el día 42.

2.2.11.2 Determinación de IgG total e isotipos

Se colectaron muestras de sangre semanalmente durante 10 semanas a partir de la vena de la cola y se analizaron los anticuerpos IgG total e isotipos IgG1 e IgG2a mediante ELISA. Brevemente, microplacas de 96 pocillos de fondo plano se sensibilizaron con 45 µg/ml de OVA diluida en buffer carbonato-bicarbonato 0,1 M pH 9,6 durante 12 h a 4 ºC. A continuación, se lavaron con PBS con 0,05% v/v de Tween 20 (PBST) y se bloquearon durante 1 hora a 37 °C con PBST. Tras otro lavado, se añadieron 100 µl de diluciones 1 en 3 de los sueros en PBST. Después de 2 h a 37 °C y un lavado adicional, las placas se incubaron durante 1 h a 37 °C con anticuerpo de anti-IgG de ratón producido en cabra, conjugado con peroxidasa de rábano (Millipore, Chemicon International, Temecula, California) diluído 1:5000 en PBST. Para determinar los isotipos, se utilizaron anticuerpos anti-IgG1 y anti-IgG2a de ratón producidos en cabra, conjugado con peroxidasa de rábano, diluidos 1:5000. Las placas se lavaron e incubaron con ABTS durante 10 min a temperatura ambiente (20-25 °C) en oscuridad. La absorbancia se midió a 405 nm usando un lector de microplacas. Los títulos de anticuerpos se determinaron como diluciones de punto final que mostraron una absorbancia de 0,3 unidades por encima del control negativo.

2.2.11.3 Respuesta celular

El día 35 (post-*prime*) y el día 49 (post-*boost*), los ratones se sacrificaron y se obtuvieron los esplenocitos empleando un gradiente de Ficoll-Hypaque según Boyurn et al., 1968 (Boyum, 1974). Brevemente, los bazos se disgregaron en una malla metálica empleando medio RPMI no suplementado. Los esplenocitos se aislaron por centrifugación durante 30 min a 1600 rpm (4 °C) en gradiente de Ficoll-Hypaque (densidad de 1,098 g/ml) en una centrífuga Gelec G144d. El sedimento resultante se lavó dos veces con RPMI y finalmente se suspendió en RPMI suplementado (10% de SFB, 100 U/ml de penicilina, 100 mg/ml de estreptomicina, 50 µM de 2-mercaptoetanol). Las células se contaron en una cámara Neubauer empleando colorante Türk y se sembraron en placas de 96 pocillos con fondo en forma de U a una densidad de 3 x 10^5 células por pocillo, en un volumen final de 200 µl. Las células se re-estimularon con 50 µg/ml de OVA o concanavalina A (5 µg/ml) como control positivo. Las células no estimuladas se usaron como control negativo. Después de 48 h de incubación, los sobrenadantes fueron recolectados y almacenados para su posterior uso.

La liberación de IFN-γ en el sobrenadante de las células se midió por ELISA siguiendo las instrucciones del fabricante. Las medidas de absorbancia se realizaron a 450 nm en un lector de microplacas.

2.2.12 Análisis estadístico

Los resultados se analizaron usando t-test independiente de dos muestras, análisis de varianza de 2 factores (ANOVA) seguido del test de Sidak, o análisis de varianza de un factor seguido de Dunnet, usando el software GraphPad Prism 4.01. Las diferencias se consideraron significativas para un valor de *$p < 0.05$; **$p < 0.001$; ***$p < 0.001$; ****$p < 0.0001$; n.s.: no significativo

2.3 Resultados

2.3.1 Nanovesículas congeladas-descongeladas y liofilizadas-rehidratadas

La estabilidad coloidal de las nanovesículas podría perderse luego de los procesos de congelación y descongelación (CD) o liofilización y rehidratación (LR) (Chen et al., 2010). Por lo tanto, en primer lugar, la estabilidad coloidal de las nanovesículas CD y LR desprotegidas (sin crio/lioprotectores) se determinó en términos de tamaño medio, polidispersidad (PDI) y potencial Z. Se observó que el tamaño de AUD_{CD} se incrementó 2 veces y el PDI se mantuvo por debajo de 0,5; mientras que el tamaño de LUD_{CD} aumentó 6 veces con un PDI cercano a ~ 1 respecto de las nanovesículas sin congelar/descongelar (Figura 2.3.A). Por otra parte, los tamaños de AUD_{LR} y LUD_{LR}, aumentaron significativamente, al igual que el PDI respecto de las nanovesículas sin liofilizar (figura 2.3.B). Estos resultados sugieren que AUD sería levemente más estable que LUD solo después del proceso de congelado/descongelado, mientras que la liofilización/rehidratación desestabilizó igualmente los dos tipos de nanovesículas. Por lo tanto, a continuación, se determinó la estabilidad coloidal de las nanovesículas ante CD y LR agregando glicerol como crioprotector. Se observó que AUD_{CD} y LUD_{CD} en presencia de glicerol mantuvieron su tamaño original con un PDI inferior a 0.25. Los mismos resultados se encontraron luego de combinar glicerol con pequeñas cantidades de azúcares (glucosa, manosa y trehalosa). El glicerol solo, sin embargo, no fue suficiente para estabilizar a las vesículas frente a LR, ya que el tamaño y PDI de AUD_{LR} y LUD_{LR} aumentó 5 veces. En este caso, la combinación de glicerol con pequeñas cantidades de cualquiera de los 3 carbohidratos sí fue efectivo para mantener el tamaño de las nanovesículas por debajo de los 250 nm; el PDI sin embargo, sólo se mantuvo en el caso de la protección con glicerol y glucosa. En particular, el factor de crioprotección (cf), calculado como la relación de tamaño nanovesículas LR/nanovesículas frescas, fue cercano a 1 en el caso de glicerol y glucosa (2,5% v/v glicerol y 0,08% p/v glucosa) tanto para AUD_{LR} como para LUD_{LR}. En general, el glicerol fue suficiente para estabilizar por completo las vesículas ante el proceso de CD, pero se requirió de glicerol y glucosa en pequeñas proporciones para estabilizar nanovesículas ante el proceso de LR. No se detectaron cambios

significativos en el potencial Z, aunque el contenido de HPTS de las formulaciones AUD_{LR} y LUD_{LR} se perdió completamente en presencia de glicerol y glucosa

El estudio de DSC de nanovesículas frescas AUD y LUD mostró temperaturas de transición de fase (Tm) de -25.4°C y -25,8°C y entalpias de fusión (ΔH) de 47.8 KJ / mol y 22.8 KJ / mol, respectivamente (Tabla 2.1) (Figura 2.2). Dado que los arqueosomas (nanovesículas completamente hechas de APT) muestran valores de entalpía de fusión inusualmente altos, del orden de 760 KJ / mol, el alto ΔH de AUD podría atribuirse a su contenido de APT, correspondiente a un 43% en peso. Tanto el fosfolípido bifitanilo sintético, como la fosfatidilcolina de difitanoil (DPhPC), forman bicapas altamente empaquetados y ordenadas debido a la interdigitación de las cadenas funcionalizadas con metilo (Shinoda et al., 2003). El alto ΔH de AUD podría explicarse por las fuertes

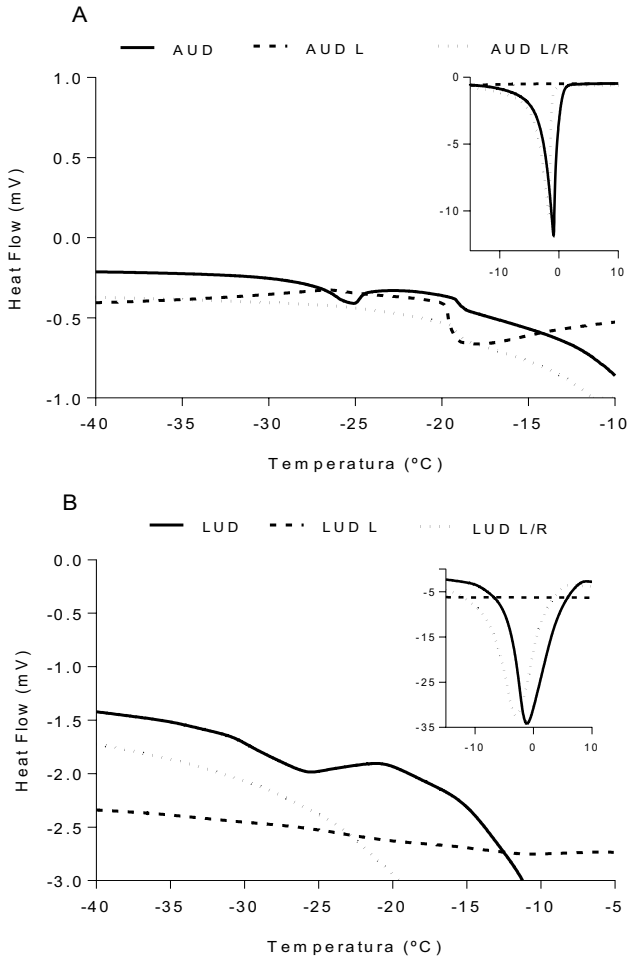


Figura 2.2. Termogramas de AUD (A) y LUD (B) recién preparados, liofilizados (L) con glucosa y glicerol sólido (L) y reconstituidos (L / R). Inserción: picos correspondientes a fusión de medio acuoso.

interacciones de Van der Waals entre la mezcla homogénea que forman las cadenas de fitanoilo de APT y las cadenas de acilo de SPC.

Por otro lado, observamos que AUD y LUD sin crioprotectores (sin glicerol-glucosa) se comportaron termodinámicamente de forma diferente ante el proceso de liofilización. Como se esperaba, AUD liofilizados sin crioprotectores mostraron una Tm de -4 ° C, lo que significa un aumento de 21 °C en comparación con la Tm de AUD frescos. Tras la rehidratación, la Tm de estos AUD volvió a su valor original (-23 ° C) (Tabla 1). En el caso de LUD liofilizados sin crioprotectores, éstos mostraron un Tm de -37 ° C, lo que significa una disminución de 12 ° C en comparación con la Tm de LUD frescos. Tras la rehidratación, la transición de fase de LUD desapareció. Adicionalmente, observamos que AUD y LUD protegidos con glicerol-glucosa también se comportaron de forma diferente frente a la liofilización. AUD liofilizados con crioprotectores mostraron una Tm similar a la de los AUD frescos (-19°C versus -25°C), mientras que el ΔH se redujo aproximadamente a la mitad (18 KJ/mol). Luego de la rehidratación, tanto la Tm como el ΔH permanecieron invariables. Por otro lado, LUD liofilizados con glicerol-glucosa, incrementaron la Tm hasta -11.5°C, disminuyeron ΔH y luego de la rehidratación, nuevamente la transición de fase desapareció.

Tabla 2.1 Parámetros termodinámicos de nanovesículas frescas, liofilizadas y liofilizadas y rehidratadas.

Formulación	Proceso	Tm (°C)	ΔH (KJ/mol fosfolípido)
AUD	Fresco	-25.4	47,8
	L	-3.91	2,4
	LR	-23	18,8
	L con glicerol-glucosa	-19	18
	LR con glicerol-glucosa	-18.6	21,6
LUD	Fresco	-25.8	22,8
	L	-37	3,1
	LR	pnd	-
	L con glicerol-glucosa	-11.5	0,8
	LR con glicerol-glucosa	pnd	-

L: liofilizado; LR: liofilizado y rehidratado; pnd: pico no detectado

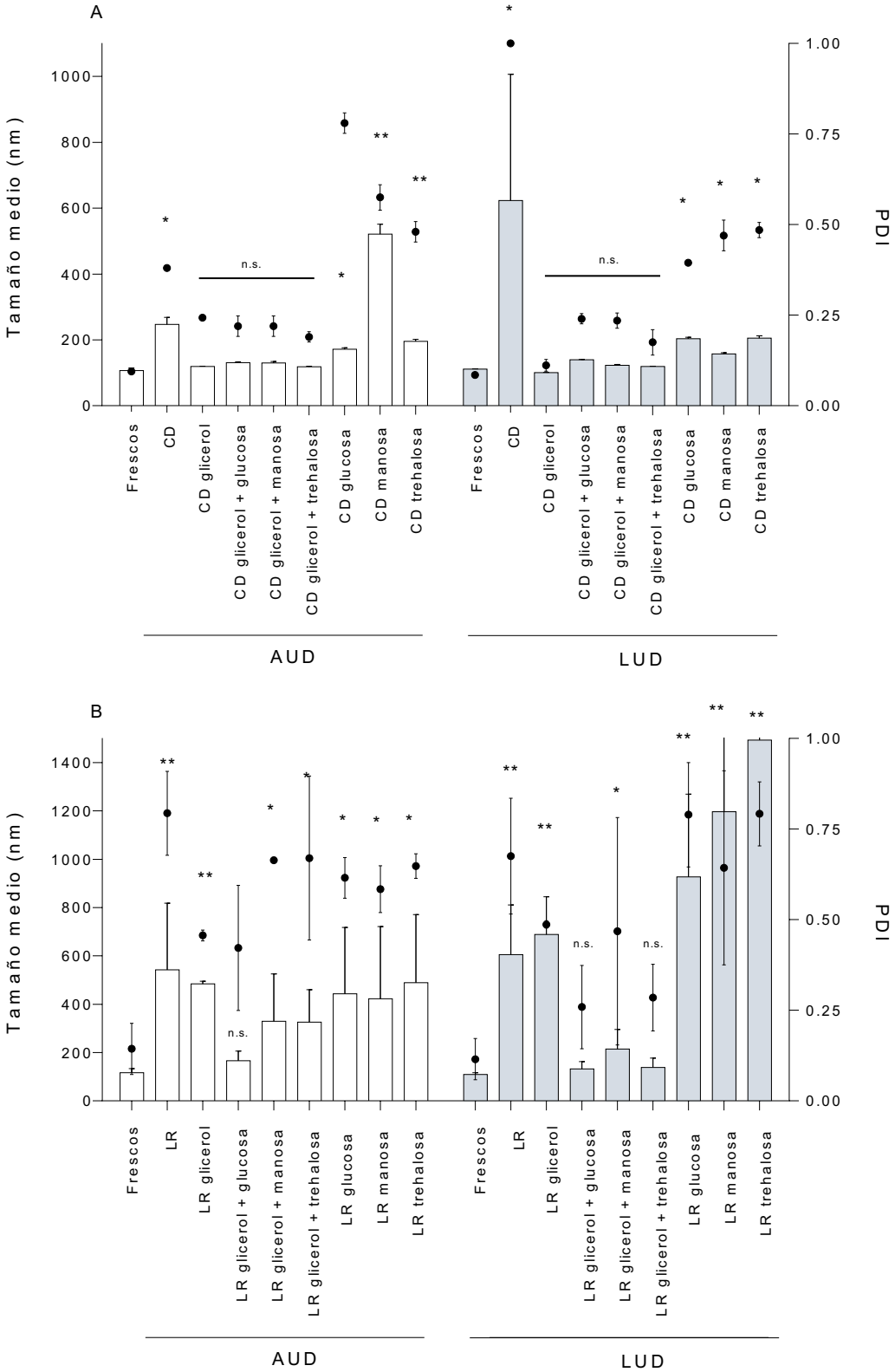


Figura 2.3. Efecto de los crioprotectores en el tamaño medio y el índice de polidispersidad (PDI) de AUD y LUD antes y después de (A) congelación-descongelación (CD) y (B) liofilización y reconstitución (LR). Las columnas muestran el tamaño medio y los puntos muestran PDI. Los valores se expresan como media ± desvió estándar (DE) (n = 5). Prueba t de Student independiente de dos muestras contra nanovesículas recién preparadas.

LUD sin crioprotectores fueron más sensibles al proceso de liofilización que AUD en las mismas condiciones. Tm y ΔH de la transición de fase de gel a liquido cristalino de las bicapas lipídicas es muy sensible al empaquetamiento de los lípidos. La liofilización produjo una reorganización irreversible del empaquetamiento de SPC y ColNa en LUD, debido a que Tm y ΔH no recuperaron los valores similares a la formulación fresca luego de su rehidratación. En contraste, el mayor empaquetamiento de la bicapa de AUD permitió que esta formulación sufriera un estrés menor frente a la liofilización y Tm y ΔH pudieron volver a los valores originales de la formulación fresca luego de su rehidratación. La liofilización de las vesículas sin crioprotectores alteró la organización en los dos tipos de bicapas, aunque LUD sufrió cambios irreversibles en mayor medida en comparación con AUD.

La morfología de AUD y LUD frescos y liofilizados con glucosa y glicerol y rehidratados se analizó por Cryo-TEM y TEM. Las imágenes de Cryo-TEM de AUD (Figura 2.4.A) y LUD (Figura 2.4.C) frescos mostraron la presencia de nanovesículas unilamelares de aproximadamente 100 nm, lo que coincide con el tamaño detectado mediante DLS. Adicionalmente, las imágenes revelaron algunas vesículas de entre 460 y 40 nm. AUD y LUD mostraron no solo vesículas unilamelares, sino que además se observaron vesículas elongadas, lo cual podría ser una consecuencia de la deformabilidad de las bicapas. Además, en ambas muestras se pudieron ver pequeñas vesículas que aparentemente se encontraban ubicadas en el interior de otras más grandes. AUD_{LR} (Figura 2.4.B) y LUD_{LR} (Figura 2.4.D) protegidos, mostraron un incremento en el tamaño medio hasta aproximadamente 300-400 nm, sin cambios aparentes en su morfología. Las imágenes de TEM de estas mismas formulaciones (AUD_{LR} Figura 2.4.E y AUD_{LR} Figura 2.4.F) mostraron una tendencia similar. El tamaño de las muestras LR obtenidas por Cryo-TEM y TEM fueron mayores que las medidas por DLS. Debido a las diferencias en los principios de medición de ambos tamaños, los resultados de ambas técnicas no se pueden comparar directamente, aunque son métodos complementarios. Sin embargo, aunque no se encontraron incrementos significativos en el tamaño de vesículas LR medidos por DLS, sí se observó un aumento en el PDI. Un tamaño promedio constante, con un aumento de PDI

puede explicarse por una distribución de tamaños más heterogénea, tal como se observó en las imágenes de Cryo-TEM

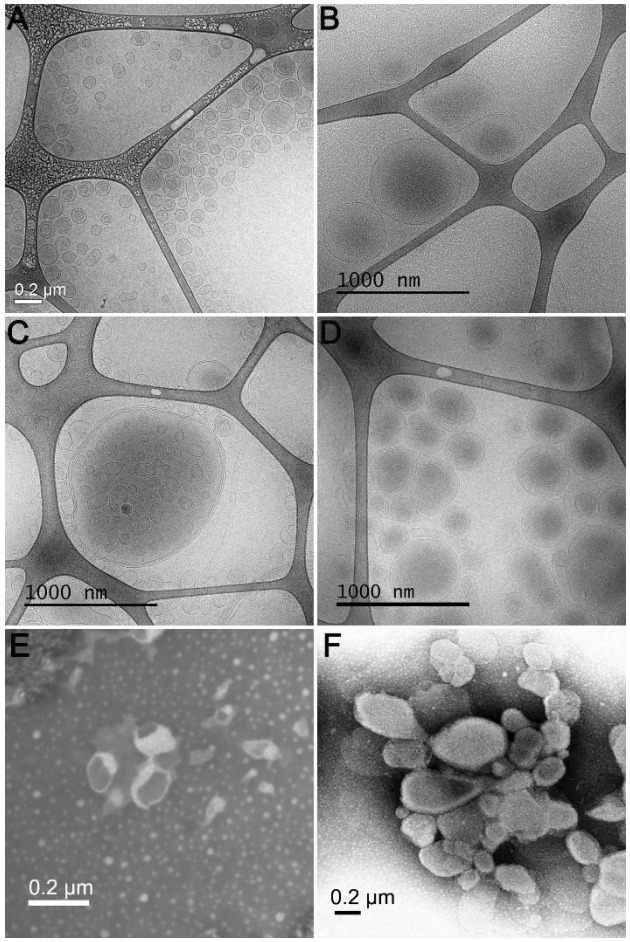


Figura 2.4 Morfología de AUD y LUD frescos y liofilizados con glucosa y glicerol (protegidos) y rehidratados (LR). Cryo-TEM: (A) AUD frescos, (B) AUD_{LR}, (C) LUD, (D) LUD_{LR}; TEM: (E) AUD_{LR}, (F) LUD_{LR}

2.3.2 Calentamiento y esterilización de las nanovesículas

Es posible que las nanovesículas pierdan su estabilidad coloidal luego de ser calentadas durante el proceso de autoclave (KIKUCHI, CARLssoN, YACHI, & HIROTA, 1991). Nuestros resultados mostraron que luego de incubar las nanovesículas a 80°C durante 6 h, o luego de esterilizarlas (E) por autoclave, AUD mantuvieron tanto su tamaño como su PDI, aunque LUD incrementaron 5 veces su tamaño (Figura 2.5). No se observaron cambios significativos en el potencial Z de ninguna de las dos nanovesículas, aunque ambas perdieron completamente su contenido de HPTS luego de la esterilización

2.3.3. Nanovesículas esterilizadas, liofilizadas y reconstituidas (ELR)

Para aumentar la vida media, minimizar el crecimiento microbiano y la degradación química, las nanovesículas frescas deben ser esterilizadas y liofilizadas. En este trabajo, las nanovesículas fueron sometidas a la esterilización por autoclave, a continuación, se les agregó glicerol y glucosa, y finalmente se liofilizaron (L). Una vez que fueron rehidratadas (R), tanto el tamaño como el PDI de AUD_{ELR} permaneció estable, mientras que el tamaño de LUD_{ELR} se duplicó (Figura 2.5)

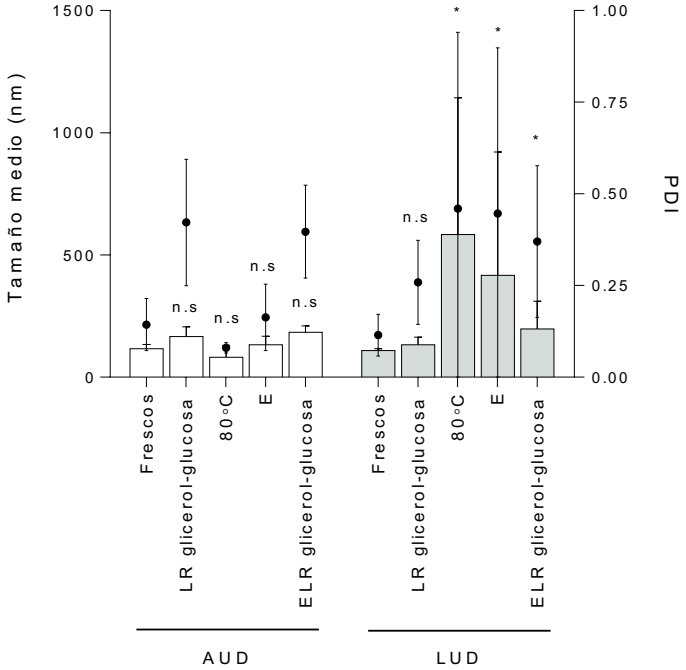


Figura 2.5 Efecto de la incubación a 80 ° C, esterilización mediante autoclave (E) y esterilización, liofilización y rehidratación (ELR) sobre el tamaño medio y el índice de polidispersidad de AUD y LUD. Las columnas muestran el tamaño medio y los puntos muestran PDI. Los valores se expresan como media ± DE (n = 5). Prueba t de Student Independiente de dos muestras contra nanovesículas recién preparadas.

2.3.4 Deformabilidad de nanovesículas esterilizadas, liofilizadas y rehidratadas (ELR)

Debido a que para una inmunización tópica es necesario emplear nanovesículas altamente elásticas que puedan penetrar el estrato córneo, se determinó la deformabilidad (*D*) de nanovesículas sometidas a esterilización, liofilización y luego rehidratadas. Se encontró que la *D* de las nanovesículas ELR

fue similar al de las nanovesículas frescas (4000 y 4600 para AUD y AUD_{ELR}, y 4300 y 3800 para LUD y LUD_{ELR}, respectivamente) (Figura 2.6). No se encontraron variaciones significativas de D para las nanovesículas mezcladas con OVA (5300 y 3000 para AUD_{ELR} + OVA y LUD_{ELR} + OVA, respectivamente). En todos los casos, *D* de ELR fue significativamente superior a la de liposomas convencionales no deformables (L), caracterizadas por un muy bajo flujo de fosfolípidos (Perez et al., 2016).

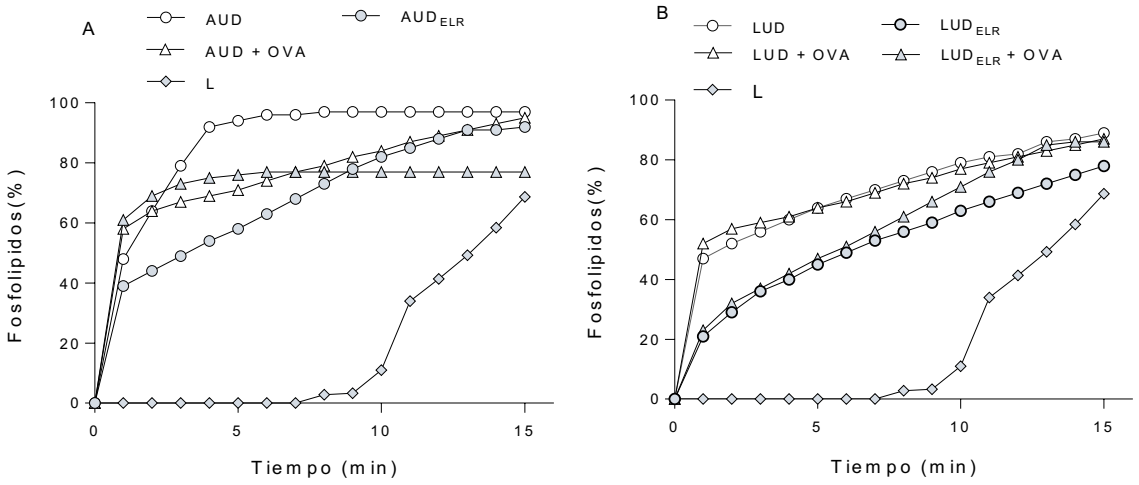


Figura 2.6 Flujo de fosfolípidos correspondiente al pasaje de (A) AUD y AUD_{ELR} y (B) LUD y LUD_{ELR} con y sin OVA mezclada físicamente a través de membranas de 50 nm en función del tiempo, comparados con el de liposomas convencionales (L)

2.3.5 Estabilidad frente al almacenamiento

La estabilidad coloidal de dispersiones acuosas o nanovesículas esterilizadas y liofilizadas (EL, como sólidos) almacenadas durante 5 meses a 4°C y 40°C se estudió en términos de tamaño, PDI y potencial Z. La estabilidad coloidal de la dispersión acuosa de AUD permaneció sin cambios por hasta 5 meses a 4°C y hasta 3 meses a 40°C (Figura 2.7). Resultados similares se observaron para la formulación solida AUD_{EL}, con la diferencia que, en este caso, el tamaño se mantuvo por hasta 5 meses a 40°C. La estabilidad coloidal de dispersiones acuosas de LUD, sin embargo, se perdió rápidamente. El tamaño a 4° y 40°C aumentó luego de 3 meses. El tamaño de LUD_{EL} sólido se incrementó 2 veces luego de 3 meses a 4°C, y su PDI incrementó hasta un valor de 0,5; luego de 3 meses a 40°C, su tamaño fue 8 veces superior, y su PDI cercano a 0,5. Estos resultados sugieren que AUD son más estables al almacenamiento a

altas temperaturas que LUD. Al contrario de lo que sucede con LUD_{EL}, AUD_{EL} podría ser almacenado a temperatura ambiente, sin la necesidad de mantener una cadena de frio.

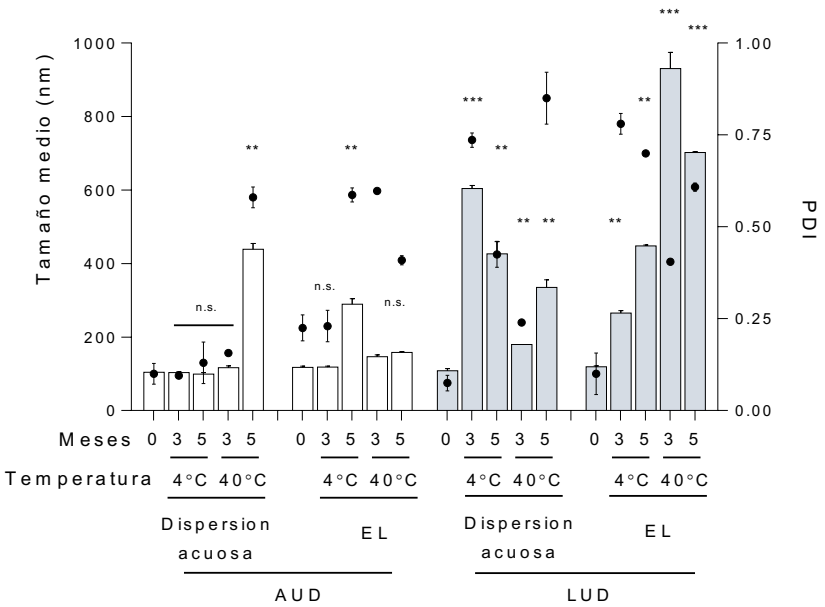


Figura 2.7 Estabilidad coloidal de AUD y LUD en dispersión acuosa o esterilizadas y liofilizadas (EL) sólidas tras el almacenamiento a 4 ° C y 40 ° C. Las columnas muestran el tamaño y los puntos muestran el PDI. Los valores se expresan como media ± DE (n = 3). Prueba t de Student Independiente de dos muestras contra nanovesículas recién preparadas.

2.3.6 Respuesta inmune tras la aplicación tópica

Las nanovesículas elásticas con antígenos incorporados en la membrana, o disueltos en la fase acuosa, son comúnmente utilizados para inmunización tópica (Chopra & Cevc, 2014; Gupta et al., 2005; Li et al., 2011; Wang et al., 2007). Los pasos de inclusión de antígeno agregan una complejidad adicional a los pasos de manufactura de la vacuna, lo que lleva a una producción más desafiante y costosa. Con los fines de simplificar estos procesos, en este trabajo evaluamos la respuesta inmune sistémica frente a nanovesículas que fueron mezcladas físicamente con el antígeno modelo OVA (AUD + OVA) comparada con aquella obtenida frente a nanovesículas con el antígeno en su interior (AUD-OVA). Adicionalmente, evaluamos el efecto de una administración secuencial de nanovesículas, seguida por OVA (tras 1 hora). Como controles, se administraron de forma intramuscular OVA mezclada con alúmina (Alum + OVA) y subcutánea arqueosomas mezclados con OVA (ARC + OVA). Las

características estructurales de las formulaciones administradas se muestran en la Tabla 2.

Tabla 2.2. Características estructurales de las formulaciones administradas a los ratones

Formulación	Concentración PL (mg/ml ± DE)	Tamaño medio (nm ± DE)	PDI	Potencial Z (mV ± DE)
AUD	28,7 ± 3,0	108 ± 9	0,10 ± 0,03	-25 ± 6
AUD-OVA	30,1 ± 3,9	118 ± 2	0,10 ± 0,04	-31 ± 3
AUD + OVA	15,5 ± 3,3	112 ± 7	0,11 ± 0,03	-34 ± 1
AUD_{ELR}+ OVA	11,6 ± 0,6	170 ± 39	0,41 ± 0,14	-36 ± 3
LUD	28,5 ± 5,2	107 ± 9	0,09 ± 0,03	-14 ± 3
LUD + OVA	15,2 ± 4,5	111 ± 7	0,08 ± 0,01	-13 ± 2
AUD_{ELR}+ OVA	10,8 ± 1,4	193 ± 100	0,58 ± 0,15	-12 ± 1
ARC + OVA	19	107	0,424	-40

Sorprendentemente, no se encontraron diferencias significativas en cuanto a la magnitud y duración de la respuesta de los títulos sistémicos anti-OVA entre AUD-OVA y AUD+OVA (Figura 2.8). Los títulos luego de la administración secuencial de AUD seguida por OVA luego de 1 hora, fueron similares a los de AUD-OVA en el período “*prime*” (día 28), aunque decrecieron luego del *boost* (Figura 2.9). En concordancia con resultados previos, AUD-OVA y AUD+OVA indujeron menores títulos que la administración intramuscular de Alum +OVA y subcutánea de ARC+OVA. Como se esperaba –debido a la presencia de APT en AUD-, la respuesta a AUD-OVA fue 2 logaritmos mayor que la inducida por LUD-OVA

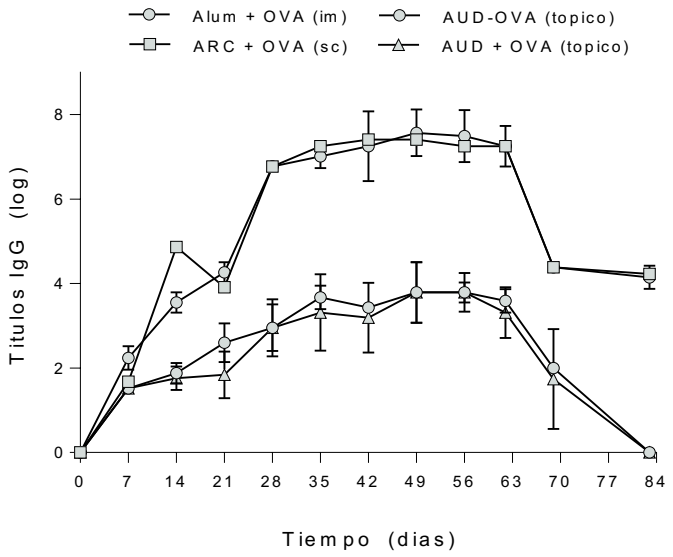


Figura 2.8 Títulos séricos de IgG después de la aplicación tópica de OVA incluidos en AUD o mezclados físicamente con AUD en comparación con la aplicación subcutánea de OVA mezclado con ARC y la administración intramuscular de OVA mezclada con alúmina.

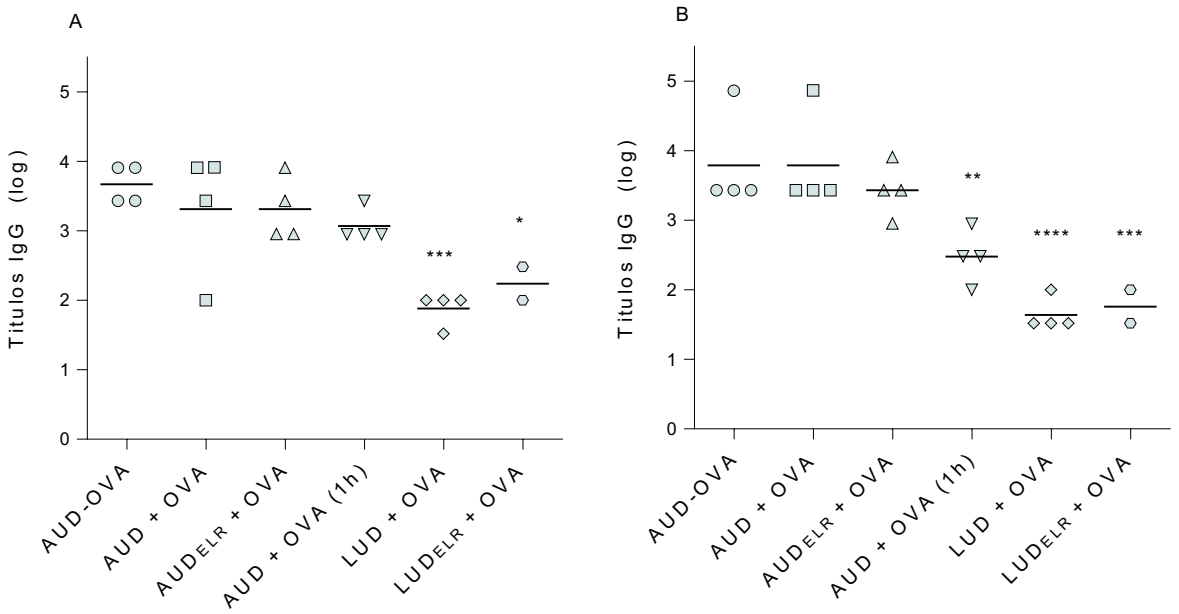


Figura 2.9. Títulos de IgG post-*prime* (A) y post-*boost* (B) obtenidos tras la administración tópica de nanovesículas. Comparaciones múltiples de Dunnett contra UDA-OVA.

A continuación, se estudió la respuesta a la administración tópica de nanovesículas ELR mezcladas con OVA (AUD_{ELR}+OVA y LUD_{ELR}+OVA). No se encontraron diferencias significativas entre los títulos inducidos por AUD_{ELR} y AUD frescos (Figura 2.9), ni entre la baja respuesta de LUD_{ELR} y LUD frescos.

No se observaron diferencias significativas entre el balance de isotipos en ninguna formulación tópica de AUD (Figura 2.10). Se observó, sin embargo, que el componente IgG2a de la administración tópica de AUD fue 2 veces inferior que la administración parenteral. Remarcablemente, LUD_{ELR}+OVA no indujo el isotipo IgG2a.

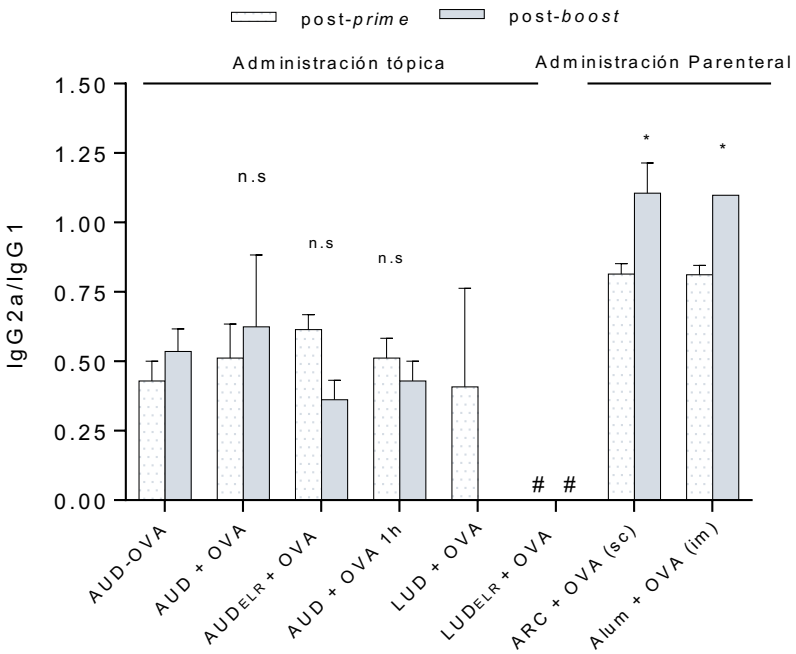


Figura 2.10 Relación de isotipos IgG2a / IgG1. Comparaciones múltiples de Dunnett contra AUD-OVA. # IgG2a por debajo del límite de detección

Finalmente, se estudió el efecto de AUD_{ELR} +OVA sobre la inmunidad celular mediante la cuantificación de IFN-γ liberado por esplenocitos de los animales inmunizados re-estimulados con OVA. No se encontraron diferencias en los títulos de IFN-γ de los esplenocitos incubados con OVA y medio de cultivo, para ratones inmunizados con AUD_{ELR}+OVA (Figura 2.11)

Sin embargo, los títulos de IFN-γ inducidos por concanavalina A u OVA fueron significativamente mayores en los ratones inmunizados con AUD_{ELR}+OVA que en aquellos inmunizados con LUD_{ELR}+OVA. Estas diferencias no se mantienen luego del *boost*, debido a una disminución en la respuesta a AUD_{ELR}+OVA. Adicionalmente observamos que el número de los esplenocitos de animales inmunizados con AUD_{ELR}+OVA fue significativamente mayor que el de los ratones inmunizados con LUD_{ELR}+OVA. En general, los resultados

sugerirían la inducción de una respuesta celular no específica a AUD_{ELR}+OVA, involucrando una actividad pro-mitótica, junto con títulos bajos de la citoquina proinflamatoria, limitada a la etapa previa al refuerzo (Figura 2.11).

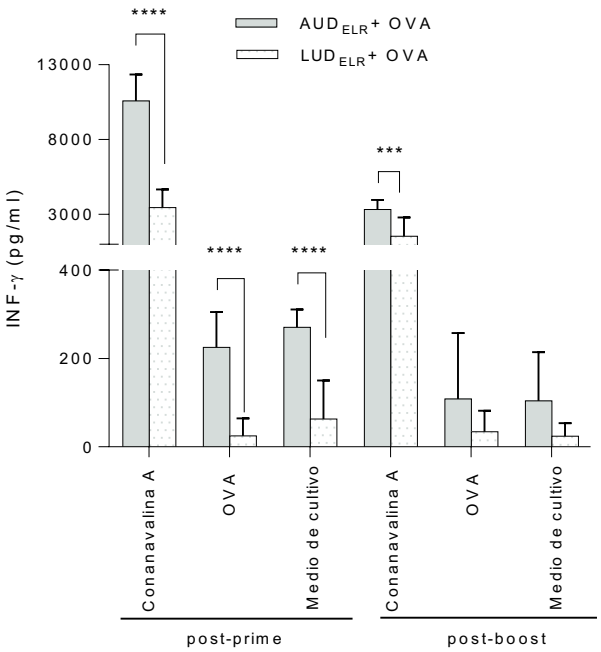


Figura 2.11 Producción de IFN-γ por esplenocitos tras la reestimulación. Los valores representan producción media ± DE (n = 5). Prueba de comparaciones múltiples de Sidak.

2.4 Discusión

Dos factores principales determinan la profundidad de penetración de las nanovesículas tópicas a través del estrato córneo intacto: la elasticidad bicapa o la ultradeformabilidad y el tamaño. La ultradeformabilidad resulta del módulo de Young reducido de las bicapas, que es casi un orden de magnitud menor que el de las bicapas de fosfolípidos no deformables ordinarias (Higa et al., 2016). La ultradeformabilidad se logra al incluir una alta proporción de activadores de borde en la bicapa de fosfolípidos (Cevc & Blume, 1992). Las nanovesículas ultradeformables pueden atravesar poros de radios más pequeños que su tamaño, sin disrupción (Gregor Cevc, Gebauer, Stieber, Schätzlein, & Blume, 1998). Por otro lado, evidencia experimental respalda la existencia de una relación inversa entre el tamaño de las nanovesículas y su capacidad para

penetrar en la piel intacta. Por ejemplo, las vesículas con un tamaño ≥ 600 nm no pueden entregar su contenido en las capas más profundas de la piel; aquellas de tamaño ≤ 300 nm pueden entregar su contenido hasta cierto punto en las capas más profundas de la piel, mientras que aquellas de tamaño ≤ 120 nm han mostrado la entrega a la epidermis viable y la dermis (Verma et al., 2003). Por otro lado, existe un tamaño de poro empírico por debajo del cual se pueden romper las nanovesículas que lo atraviesan. Se ha descripto que las nanovesículas ultradeformables intactas penetran poros de un diámetro tres veces más pequeño que su tamaño (Trotta et al., 2002). De hecho, el diámetro de los poros en la matriz lipídica del estrato córneo puede abrirse como máximo a 20-40 nm sin un daño importante de la piel (Cevc & Blume, 1992; Cevc et al., 1998; Ogunsola et al., 2012; Trotta et al., 2002; Verma et al., 2003). Por lo tanto, las nanovesículas menores a 120 nm, y no más grandes, tienen posibilidades de penetrar en la piel. Por lo tanto, es esencial que el tamaño de las nanovesículas se mantenga cercano a 100 nm a lo largo de su fabricación y el almacenamiento.

Teniendo esto en cuenta, registramos la estabilidad coloidal de AUD cuando se sometió a las tensiones físicas sufridas en los procesos de esterilización, liofilización y almacenamiento. Primero determinamos la estabilidad coloidal de AUD frente a autoclave. Los métodos más comunes para esterilizar materiales son la filtración estéril a través de una membrana de 0,2 µm, irradiación gamma, esterilización con calor mediante autoclave a 121 ° C durante 15 minutos o esterilización con vapor. La filtración no elimina las partículas de virus, consume grandes cantidades de muestra y conlleva a pérdida de este en los filtros, por lo que la esterilización en autoclave es uno de los métodos más efectivos para descontaminar material duro. Sin embargo, los liposomas sufren cambios estructurales cuando se calientan: los liposomas ordinarios hechos de lípidos de diésteres de cadenas acílicas unidas al glicerol como SPC o lípidos pegilados no pueden mantener el tamaño de las vesículas cuando se someten a autoclave (Brown et al., 2009). En este trabajo encontramos que una dispersión acuosa de AUD podría calentarse sin perder su estabilidad coloidal. Después de esterilizar en autoclave o incubar 6 horas a 80 ° C, LUD sufrió agregación, en cambio AUD mantuvo el tamaño y PDI, pero el HPTS, colorante fluorescente impermeable a la membrana altamente hidrosoluble, se perdió por completo.

En segundo lugar, determinamos la estabilidad coloidal de AUD frente al proceso de liofilización. Este es un método estándar para eliminar el agua a fin de prolongar la vida útil de las formulaciones liposomales durante su almacenamiento (Crowe et al., 1994). Para evitar la fusión de vesículas y la pérdida del material encapsulado debido a la tensión mecánica por la formación de cristales de hielo durante la congelación, en estos procesos se agregan crioprotectores tales como dimetilsulfóxido, glicerol, aminas cuaternarias o azúcares (Crowe et al., 1990). Los crioprotectores pueden formar una matriz vidriosa protectora en la que las nanovesículas se inmovilizan, evitan la agregación y protegen las bicapas de los cristales de hielo. Sin embargo, los requisitos para proteger las nanovesículas contra el secado son mucho más estrictos. En este caso, los lioprotectores se usan para evitar el estrés de secado sufrido durante la formación de hielo y la eliminación de agua no congelada de las nanovesículas. El mecanismo de estabilización de los lioprotectores se explica por la hipótesis del reemplazo de agua (Allison et al., 1996; Crowe et al.,1990; Crowe et al., 1994). Los lioprotectores reemplazan las moléculas de agua originales, aumentan la distancia entre las membranas debido a los efectos volumétricos y osmóticos, y disminuyen el estrés inter e intra bicapa (Koster et al., 2000). La mayoría de las moléculas utilizadas como crioprotectores también son lioprotectores. Entre 5 y 20% p/v, las soluciones de trehalosa, glucosa, sacarosa o manitol son los crioprotectores más comunes y también los más utilizados para proteger los liposomas. Hemos reportado anteriormente, sin embargo, que debido a su alto contenido de ColNa, LUD no puede ser liofilizado, ni siquiera en alta concentración de sacarosa (10 y 20% p v) (Montanari et al., 2009). En este trabajo, especulamos que la cantidad de 0,072% p / v del disacárido manosa-glucosa (proporcionada por el 8,2% p / p de SDGD-5 en APT), combinado con la carga altamente negativa (proporcionada por el 55% p / p de PGP-Me en APT), podría proteger a AUD de la liofilización. Esta suposición resultó parcialmente correcta: AUD fue más estable que la LUD ente el proceso de congelación, pero no ante la deshidratación durante la liofilización. Los resultados sugieren que APT son parcialmente crioprotectores, pero no lioprotectores. La crioprotección completa se logró mediante la adición de glicerol. El glicerol es un crioprotector muy conocido para células de mamíferos. Su ventaja competitiva sobre los azúcares se debe a su capacidad de penetrar

la membrana plasmática. El estrés osmótico en una solución de glicerol hipertónico es por lo tanto mucho más pequeño que el impuesto por una solución de azúcar hipertónica. Parte del agua extra- e intra-celular es reemplazada por glicerol. Por lo tanto, la cantidad de hielo formado es menor, la fracción de agua no congelada permanece más grande y el grado de contracción es limitado. Además, al contrario de los azúcares que deben disolverse en los medios de dispersión de las nanovesículas antes de que se cierren las bicapas (lo que afecta el proceso de fabricación posterior, como la obstrucción de los filtros durante la extrusión), se puede agregar glicerol a las suspensiones de nanovesículas ya formadas. Además, el glicerol se empaqueta entre las moléculas de lípidos en la bicapa, estableciendo puente de hidrógeno con los grupos fosfato de los fosfolípidos, aumentando el área ocupada por molécula de fosfolípidos (Fluhr, Darlenski, & Surber, 2008). Finalmente, el glicerol se usa frecuentemente en preparaciones dermatológicas tópicas debido a sus efectos humectantes y suavizantes, y se ha usado solo o combinado con otros agentes para liofilizar liposomas (Rudolph & Crowe, 1985; Stark, Pabst, & Prassl, 2010). Para proteger completamente a AUD y LUD del estrés por secado, sin embargo, se requirió la combinación de glicerol con una pequeña cantidad de glucosa, para mantener al mínimo el estrés osmótico.

Nuestra hipótesis fue que, debido al contenido de APT, AUD podría mostrar una mayor resistencia a la esterilización por calor, la liofilización y el almacenamiento que LUD. APT es un extracto natural que consiste en fosfatidilglicerolfosfato metiléster (PGP-Me), diglicosildifitanilglicerol sulfato 1-O-[α-D-manosa- (2'-SO3H) -1 '→ 2'] - α-D-glucosa] -2, 3-di-O-fitanil-sn-glicerol) (SDGD), ácido diglicosildifitanilgliceroldieter sulfónico (SDGD-5PA), fosfatidilglicerol (PG) y bifosfatidilglicerol (BPG) (Higa et al., 2012). Los arqueosomas (nanovesículas completamente hechas de APT) muestran una estabilidad química mayor que los liposomas convencionales (preparados a partir de fosfolípidos), debido a los enlaces éteres, resistentes a la hidrólisis, las cadenas isoprenoides sin dobles enlaces resistentes a la oxidación y la estereoisomería *sn*2,3 resistente a fosfolipasas estereoespecíficas (Corcelli & Lobasso, 2006). Sin embargo, encontramos que mientras AUD fue más resistente a la esterilización por calor que LUD, su contenido de arqueolípidos no fue suficiente para protegerlos contra la congelación y deshidratación, ya que,

para liofilizarlos, se requirió la adición de glicerol y glucosa, al igual que para LUD. Sin embargo, la estabilidad frente al almacenamiento fue significativamente diferente: el tamaño de AUD permaneció sin cambios después de 5 meses a 40 ° C, mientras que LUD se agregaron.

La presencia de APT fue responsable de mantener el tamaño reducido de AUD en el proceso de ELR requerido para aumentar su vida útil. Sin embargo, aunque el tamaño pequeño favorece la penetración de la piel, los títulos más altos inducidos por AUD en comparación con LUD se debieron al contenido de PGP-Me, el componente principal del APT. PGP-Me es un ligando del receptor de scavenger clase A, y responsable de la captura extensa de nanovesículas que contienen APT por macrófagos J774A.1. Además, el contenido de azúcar de los glicolípidos como SDGD y SDGD-5PA de APT podría ser reconocido por los receptores de manosa expresados en APC (He et al., 2007).

Finalmente, encontramos que la aplicación tópica de nanovesículas ultradeformables mezcladas con antígeno antes de la administración, provocó una respuesta sistémica antígeno-específica, lo que permitiría evitar los pasos de inclusión del antígeno. Algunos años atrás, se reportó que vesículas ultradeformables que contenían ketotifeno (revisar que se escriba asi) en el exterior mejoraban significativamente la penetración y la deposición en la piel del fármaco sobre la de las vesículas con ketotifeno en el interior acuosos. Los fármacos hidrófilos, por lo tanto, pueden no necesitar ser atrapados en el interior de las vesículas para penetrar en la piel (Elsayed, Abdallah, Naggar, & Khalafallah, 2006). Nuestros resultados sugieren que lo mismo se aplicaría en la vacunación tópica con antígenos voluminosos como la OVA. No se encontraron diferencias en la respuesta tópica OVA específica sesgada a Th2 entre AUD_{ELR} y AUD frescos. Si bien no se indujo respuesta celular específica, AUD_{ELR} + OVA fue la única formulación que indujo una respuesta no específica mediada por células. Por lo tanto, es posible evitar los complejos pasos de inclusión de los antígenos en las bicapas de las vesículas o dentro de su espacio acuoso y su posterior purificación, ya que la formulación preparada con una simple mezcla física es suficiente para inducir una respuesta inmune. Más adelante abordaremos si AUD podría mezclarse con otros antígenos diferentes a la OVA

para provocar una respuesta inmune. Este hallazgo es significativamente importante para la fabricación industrial de vacunas de nanopartículas.

2.5 Referencias

Altube, M. J., Selzer, S. M., de Farias, M. A. et al., (2016). Surviving nebulization-induced stress: *dexamethasone in pH-sensitive archaeosomes. Nanomedicine, 11(16), 2103-2117.*

Alving, C. R., Rao, M., Steers, N. J. A. et al., (2012). Liposomes containing lipid A: an effective, safe, generic adjuvant system for synthetic vaccines. Expert review of vaccines, 11(6), 733-744.

Allison, S. D., Dong, A., & Carpenter, J. F. (1996). Counteracting effects of thiocyanate and sucrose on chymotrypsinogen secondary structure and aggregation during freezing, drying, and rehydration. Biophysical journal, 71(4), 2022-2032.

Bal, S. M., Ding, Z., van Riet, E. A. et al., (2010). Advances in transcutaneous vaccine delivery: do all ways lead to Rome? Journal of Controlled Release, 148(3), 266-282.

Boyum, A. (1974). Separation of Blood Leucocytes, Granulocytes and Lymphocyte. Tissue Antigens, 4, 269-274.

Brown, D. A., Venegas, B., Cooke, P. H . A. et al., (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.

Butcher, C., Van Gent, C., & Pries, C. (1961). Micromethod for lipid phosphorus determination. Anal chim acta, 24, 203-204.

Carrer, D. C., Higa, L. H., Tesoriero, M. V. D. A. et al., (2014). Structural features of ultradeformable archaeosomes for topical delivery of ovalbumin. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 121, 281-289.

Carstens, M. G. (2009). Opportunities and challenges in vaccine delivery. European journal of pharmaceutical sciences, 36(4-5), 605-608.

Cevc, G., & Blume, G. (1992). Lipid vesicles penetrate into intact skin owing to the transdermal osmotic gradients and hydration force. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes, 1104(1), 226-232.

Cevc, G., Gebauer, D., Stieber, J. A. et al., (1998). Ultraflexible vesicles, Transfersomes, have an extremely low pore penetration resistance and transport therapeutic amounts of insulin across the intact mammalian skin. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes, 1368(2), 201-215.

Combadière, B., & Mahé, B. (2008). Particle-based vaccines for transcutaneous vaccination. Comparative immunology, microbiology and infectious diseases, 31(2-3), 293-315.

Corcelli, A., & Lobasso, S. (2006). 25 characterization of lipids of halophilic archaea Methods in microbiology (Vol. 35, pp. 585-613): Elsevier.

Crowe, J. H., Carpenter, J. F., Crowe, L. M. A. et al., (1990). Are freezing and dehydration similar stress vectors? A comparison of modes of interaction of stabilizing solutes with biomolecules. Cryobiology, 27(3), 219-231.

Crowe, J. H., Leslie, S. B., & Crowe, L. M. (1994). Is vitrification sufficient to preserve liposomes during freeze-drying? Cryobiology, 31(4), 355-366.

Chen, C., Han, D., Cai, C. A. et al., (2010). An overview of liposome lyophilization and its future potential. Journal of Controlled Release, 142(3), 299-311.

Chopra, A., & Cevc, G. (2014). Non-invasive, epicutaneous immunisation with toxoid in deformable vesicles protects mice against tetanus, chiefly owing to a Th2 response. European journal of pharmaceutical sciences, 56, 55-64.

Duangjit, S., Pamornpathomkul, B., Opanasopit, P. A. et al., (2014). Role of the charge, carbon chain length, and content of surfactant on the skin penetration of meloxicam-loaded liposomes. International journal of nanomedicine, 9, 2005.

Elsayed, M. M., Abdallah, O. Y., Naggar, V. F. et al., (2006). Deformable liposomes and ethosomes: mechanism of enhanced skin delivery. International journal of pharmaceutics, 322(1-2), 60-66.

Fluhr, J., Darlenski, R., & Surber, C. (2008). Glycerol and the skin: holistic approach to its origin and functions. British Journal of Dermatology, 159(1), 23-34.

Fry, D. W., White, J. C., & Goldman, I. D. (1978). Rapid separation of low molecular weight solutes from liposomes without dilution. Analytical biochemistry, 90(2), 809-815.

Gupta, P. N., Mishra, V., Rawat, A. A. et al., (2005). Non-invasive vaccine delivery in transfersomes, niosomes and liposomes: a comparative study. International journal of pharmaceutics, 293(1-2), 73-82.

Harandi, A. M., Davies, G., & Olesen, O. F. (2009). Vaccine adjuvants: scientific challenges and strategic initiatives. Expert review of vaccines, 8(3), 293-298.

He, L.-Z., Crocker, A., Lee, J. A. et al., (2007). Antigenic targeting of the human mannose receptor induces tumor immunity. The Journal of Immunology, 178(10), 6259-6267.

Hickling, J., Jones, K., Friede, M. A. et al., (2011). Intradermal delivery of vaccines: potential benefits and current challenges. Bulletin of the World Health Organization, 89, 221-226.

Higa, L. H., Arnal, L., Vermeulen, M. A. et al., (2016). Ultradeformable archaeosomes for needle free nanovaccination with Leishmania braziliensis antigens. PloS one, 11(3), e0150185.

Higa, L. H., Schilrreff, P., Perez, A. P. A. et al., (2012). Ultradeformable archaeosomes as new topical adjuvants. Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine, 8(8), 1319-1328.

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

Kikuchi, H., Carlsson, A., Yachi, K. . A. et al., (1991). Possibility of heat sterilization of liposomes. Chemical and pharmaceutical bulletin, 39(4), 1018-1022.

Kirschner, N., Rosenthal, R., Günzel, D. A. et al., (2012). Tight junctions and differentiation–a chicken or the egg question? Experimental dermatology, 21(3), 171-175.

Koster, K. L., Lei, Y. P., Anderson, M. A. et al., (2000). Effects of vitrified and nonvitrified sugars on phosphatidylcholine fluid-to-gel phase transitions. Biophysical journal, 78(4), 1932-1946.

Lee, M.-Y., Shin, M.-C., & Yang, V. C. (2013). Transcutaneous antigen delivery system. BMB reports, 46(1), 17.

Li, N., Peng, L.-h., Chen, X. A. et al., (2011). Effective transcutaneous immunization by antigen-loaded flexible liposome in vivo. International journal of nanomedicine, 6, 3241.

Mohammed, A. R., Bramwell, V. W., Coombes, A. G. A. et al., (2006). Lyophilisation and sterilisation of liposomal vaccines to produce stable and sterile products. Methods, 40(1), 30-38.

Montanari, J., Roncaglia, D., Lado, L. . A. et al., (2009). Avoiding failed reconstitution of ultradeformable liposomes upon dehydration. International journal of pharmaceutics, 372(1-2), 184-190.

Morilla, M. J., & Romero, E. L. (2015). Nanomedical therapeutic and prophylaxis strategies against intracellular protozoa in the Americas Nanotechnology in Diagnosis, Treatment and Prophylaxis of Infectious Diseases (pp. 297-317): Elsevier.

Nicolas, J.-F., & Guy, B. (2008). Intradermal, epidermal and transcutaneous vaccination: from immunology to clinical practice. Expert review of vaccines, 7(8), 1201-1214.

Ogunsola, O. A., Kraeling, M. E., Zhong, S. . A. et al., (2012). Structural analysis of “flexible” liposome formulations: new insights into the skin-penetrating ability of soft nanostructures. Soft Matter, 8(40), 10226-10232.

Partidos, C. D., Beignon, A.-S., Semetey, V. A. et al., (2001). The bare skin and the nose as non-invasive routes for administering peptide vaccines. Vaccine, 19(17-19), 2708-2715.

Paul, A., Cevc, G., & Bachhawat, B. (1998). Transdermal immunisation with an integral membrane component, gap junction protein, by means of ultradeformable drug carriers, transfersomes. Vaccine, 16(2-3), 188-195.

Paul, A., Cevc, G., & Bachhawat, B. K. (1995). Transdermal immunization with large proteins by means of ultradeformable drug carriers. European journal of immunology, 25(12), 3521-3524.

Perez, A. P., Altube, M. J., Schilrreff, P. A. et al., (2016). Topical amphotericin B in ultradeformable liposomes: formulation, skin penetration study, antifungal and antileishmanial activity in vitro. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 139, 190-198.

Riminton, D. S., Kandasamy, R., Dravec, D. A. et al., (2004). Dermal enhancement: bacterial products on intact skin induce and augment organ-specific autoimmune disease. The Journal of Immunology, 172(1), 302-309.

Rudolph, A. S., & Crowe, J. H. (1985). Membrane stabilization during freezing: the role of two natural cryoprotectants, trehalose and proline. Cryobiology, 22(4), 367-377.

Shinoda, W., Mikami, M., Baba, T. A. et al., (2003). Molecular dynamics study on the effect of chain branching on the physical properties of lipid bilayers: structural stability. The Journal of Physical Chemistry B, 107(50), 14030-14035.

Sprott, G. D., Sad, S., Fleming, L. P. A. et al., (2003). Archaeosomes varying in lipid composition differ in receptor-mediated endocytosis and differentially adjuvant immune responses to entrapped antigen. Archaea, 1(3), 151-164.

Stark, B., Pabst, G., & Prassl, R. (2010). Long-term stability of sterically stabilized liposomes by freezing and freeze-drying: Effects of cryoprotectants on structure. European journal of pharmaceutical sciences, 41(3-4), 546-555.

Trotta, M., Peira, E., Debernardi, F. A. et al., (2002). Elastic liposomes for skin delivery of dipotassium glycyrrhizinate. International journal of pharmaceutics, 241(2), 319-327.

van den Bergh, B. A., Wertz, P. W., Junginger, H. E. . A. et al., (2001). Elasticity of vesicles assessed by electron spin resonance, electron microscopy and extrusion measurements. International journal of pharmaceutics, 217(1-2), 13-24.

Verma, D., Verma, S., Blume, G. . A. et al., (2003). Liposomes increase skin penetration of entrapped and non-entrapped hydrophilic substances into human skin: a skin penetration and confocal laser scanning microscopy study. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, 55(3), 271-277.

Walter, A., Schäfer, M., Cecconi, V., Matter, C. A. et al., (2013). Aldara activates TLR7-independent immune defence. Nature communications, 4, 1560.

Wang, J., Hu, J. h., Li, F. A. et al., (2007). Strong cellular and humoral immune responses induced by transcutaneous immunization with HBsAg DNA–cationic deformable liposome complex. Experimental dermatology, 16(9), 724-729.

Wessel, D. m., & Flügge, U. (1984). A method for the quantitative recovery of protein in dilute solution in the presence of detergents and lipids. Analytical biochemistry, 138(1), 141-143.

CAPITULO 3

ARQUEOSOMAS ULTRADEFORMABLES CON IMIQUIMOD PARA VACUNACIÓN TÓPICA

Los resultados mostrados en este Capítulo forman parte de la siguiente publicación y presentaciones a Congresos:

"Novel imiquimod nanovesicles for topical vaccination". **Ayelen Tatiana Caim**i, María Julia Altube, Marcelo Alexandre de Farias, Rodrigo Villares Portugal, Ana Paula Perez, Eder Lilia Romero, Maria Jose Morilla. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 174, 536-543. doi.org/10.1016/j.colsurfb.2018.11.031. (Impact factor: 3.997)

"*Topical vaccination with novel imiquimod ultradeformable nanovesicles*" **Caimi A**, De Farias M.; Villares Portugal R.; Perez AP.; Romero EL.; Morilla MJ. XVII Brazil MRS Meeting, Sociedade Brasileira De Pesquisa Em Materiais, Natal, Brasil (2018)

"*Topical vaccination with novel imiquimod ultradeformable nanovesicles*" **Caimi A**, De Farias M.; Villares Portugal R.; Perez AP.; Romero EL.; Morilla MJ. Reunión Conjunta SAIC.SAI.SAFIS (2018) (Trabajo publicado en la revista Medicina. Buenos aires vol. 78 Supl. III – 2018)

3.1 Introducción

El desarrollo de procedimientos de inmunización sin agujas, no invasivos e indoloros es una prioridad para las agencias de salud pública (Hickling et al., 2011). Sin embargo, el mayor desafío que debe sortear la vacunación tópica es el estrato córneo (*SC*) que es la principal barrera que limita la llegada de antígenos y adyuvantes al tejido linfoide asociado a la piel (SALT), que se encuentra a unos pocos cientos de micrómetros de profundidad de la superficie de la piel (Bal et al., 2010). La vacunación tópica con materia blanda es una nueva estrategia para inducir una respuesta inmune sin disrumpir el SC. En este sentido, previamente mostramos que AUD aplicados tópicamente pueden penetrar el *SC* e inducir títulos de IgG antígeno específicos (Carrer et al., 2014; Higa et al., 2016; Higa et al., 2012). Como se describió en el **Capítulo 1 (sección 1.3.1**), los APT son una mezcla de lípidos bifitanilos formado por cadenas poliisoprenoides saturadas unidas mediante enlaces éter *sn*-2,3 al glicerol. Por un lado, los APT son ligandos específicos de receptores *scavenger* de tipo A, expresados en células fagocíticas y células presentadoras de antígenos (CPA) (Altube et al., 2017). Por ello, vesículas preparadas completa o parcialmente con APT como arqueosomas o AUD son más ávidamente capturados por CPA que nanovesículas carentes de APT. Por otro lado, APT les confiere a AUD estabilidad frente a esterilización por calor y almacenamiento en ausencia de cadena de frio (**Capitulo 2**, Caimi et al., 2017). Sin embargo, la respuesta inmune producida por AUD aplicado tópicamente contra antígenos de OVA y de *Leishmania brasilenzis*, es menor que la obtenida tras la administración parenteral usando el adyuvante universal alúmina o vesículas completamente hechas de APT (Caimi et al., 2017; Higa et al., 2012). Asimismo, AUD genera una relación IgG2a/IgG1 $\approx$ 0,5, lo que sugiere una tendencia hacia una respuesta del tipo humoral (Th2) (Caimi et al., 2017; Higa et al., 2016).

El imiquimod (IMQ), por otro lado, es un ligando sintético del receptor de tipo toll 7 (*Toll Like Receptor 7* -TLR7) que induce la producción de ciertas citoquinas como IFN-γ, TNF-α, IL-1β, IL-6, IL-8 y IL-12 en células inmunes como monocitos/macrófagos, células dendríticas (CD) (CD dérmicas y CD plasmacitoides), células B y granulocitos (M. Schön & Schön, 2007; Stanley et al., 2002). IMQ induce memoria celular a través de la activación de células T

efectoras, células de Langerhans (CL), linfocitos y macrófagos, que circulan linfáticamente y activan una respuesta inmune adaptativa (Rechtsteiner et al., 2005). IMQ aplicado tópicamente induce la maduración de CL y estimula la migración de estas CPA hacia nódulos linfáticos próximos donde promueven una respuesta específica de células T (Stanley et al., 2002). Aldara® es una crema comercial de 5% IMQ, aprobada para el tratamiento de afecciones cutáneas dermatológicas, incluyendo verrugas genitales externas y perianales, carcinoma basocelular superficial y queratosis actínica en la cara y el cuero cabelludo (Vidal & Alomar, 2008). Aldara es una emulsión de aceite en agua que consiste en ácido isoesteárico como fase oleosa en la que el IMQ se solubiliza al 5%. En ensayos clínicos, la aplicación tópica de Aldara en pacientes con melanoma y cáncer de próstata vacunados con péptidos, ha demostrado aumentar la respuesta celular inmune (Adams et al., 2008; Feyerabend et al., 2009). Sin embargo, las respuestas inducidas por Aldara decaen rápidamente, resultando en una respuesta de memoria débil y sólo una parcial protección tumoral (Stein et al., 2011; Warger et al., 2007). Además, el ácido esteárico causa reacciones adversas cutáneas en 75 % de los pacientes y recientemente se ha descripto que contribuye a la generación de respuestas inflamatorias vía activación del inflamasoma (Walter et al., 2013). Además, la emulsión aceite en agua del producto comercial es inestable, de hecho, la crema Aldara se comercializa en sobres de un solo uso y se recomienda que los sobrantes sean descartados. Por otro lado, IMQ presenta una baja permeabilidad en la piel (Telò et al., 2016). Para una vacunación cutánea, se requiere que IMQ atraviese el *SC* para que penetre en la piel y sea capturado por las CD dérmicas y CL para su activación y migración hacia nódulos linfáticos de drenaje. Al mismo tiempo, para evitar peligrosos efectos adversos sistémicos, el IMQ debe mantenerse en el sitio de administración sin entrar en el torrente sanguíneo. Todos estos datos sugieren que es necesario el desarrollo de una nueva formulación de IMQ para su uso en vacunación tópica.

IMQ ha sido formulado en diferentes tipos de vehículos particulados tales como nanogeles (Stein et al., 2014), una nanoemulsión sólida (Gogoll et al., 2016) y emulsiones (Lopez et al., 2017) para la inmunización tópica. Sin embargo, todos estos enfoques se basan en la liberación de IMQ desde la superficie de la piel y no en la llegada de las nanopartículas cargadas con IMQ

a CPA. Recientemente, demostramos que la suspensión acuosa de vesículas formadas completamente por APT que contienen IMQ es capaz de inducir una respuesta celular sistémica antígeno-específica tras su aplicación subcutánea (Parra et al., 2018)

La hipótesis de este capítulo es que al incluir IMQ en AUD se podría mejorar la respuesta inmune generada por AUD o IMQ libre ya que aumentaría su penetración en piel y el *targeting* a las CPA de la piel. Para evaluar esta hipótesis, en este trabajo en primer lugar se obtuvieron formulaciones de AUD y LUD conteniendo IMQ (AUD_1 y LUD_1) y con IMQ asociado externamente (AUD_2 y LUD_2). Luego se determinó la penetración *in vitro* en piel humana, la citotoxicidad, la captura celular y la liberación de citoquinas proinflamatorias por queratinocitos humanos y macrófagos tras la incubación con nanovesículas. Tras lo cual, se determinó la capacidad de las nanovesículas para estimular respuestas inmunes contra el antígeno modelo OVA tras su administración tópica. Finalmente, se determinó la estabilidad post-almacenamiento de las formulaciones.

3.2 Materiales y métodos

3.2.1 Materiales

Los reactivos utilizados fueron los mencionados en el **Capítulo 2**. En este capítulo en particular se agregaron los siguientes materiales: Imiquimod (pureza> 98%) fue obsequiado por Laboratorio Lazar (Buenos Aires, Argentina). Lipopolisacáridos de *Escherichia coli* 0111: B4 (LPS), Laurdan y 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolio bromuro (MTT) y B sal 1,2-dihexadecanoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina trietilamonio (RhPE) fueron adquiridos en Sigma-Aldrich (MO, EE.UU.). El medio de cultivo Modified Eagle's (MEM) fue de Gibco, Argentina.

3.2.2 Crecimiento de arqueobacterias, extracción y caracterización de lípidos polares totales

Arquebacterias *H. tebenquichense* fueron crecidas en un biorreactor casero de acero inoxidable y cosechada luego de 96 h de crecimiento como se describió en el **Capítulo 2, sección 2.2.2**. Los APT se extrajeron de la biomasa y su composición se caracterizó rutinariamente tal como se describió en ese capítulo.

3.2.3 Preparación de nanovesículas ultradeformables

3.2.3.1 Nanovesículas vacías y con IMQ

Se prepararon nanovesículas ultradeformables por el método de hidratación de la película lipídica, como se describió en el Capítulo 2, sección 2.2.3

Para optimizar la incorporación de IMQ, se probaron diferentes estrategias durante la preparación de las nanovesículas. Por un lado, IMQ se incorporó en la fase acuosa. Brevemente, la película lipídica se hidrató con 5 o 10 mg/ml de IMQ en ácido láctico 100 mM, pH 2,3 (Tabla 3.1). Por otro lado, diferentes cantidades de IMQ se mezclaron en la fase orgánica junto con la mezcla de lípidos y surfactante (AUD1 y LUD1). Para esto, se utilizaron dos estrategias diferentes: i) IMQ se solubilizó en cloroformo: metanol 4:1 v/v, ii) IMQ se disolvió en ácido linóleo (AL) y se agregó al cloroformo: metanol 4:1 v/v. Tras la formación de las películas lipídicas, se suspendieron en buffer Tris-HCl y las muestras se sonicaron y extruyeron como se describió en el Capítulo 1. Además, se prepararon nanovesículas vacías (sin IMQ) con AL (LUD* y AUD*). Por último, para incrementar la cantidad de IMQ en las formulaciones, se prepararon nanovesículas mixtas, con IMQ incorporado y adherido superficialmente. Para ello, se mezcló un volumen de AUD1 y LUD1 con una pequeña alícuota de IMQ 10 mg/ml en ácido láctico 100 mM, pH 2,3, en una proporción de fosfolípidos (PL): IMQ 1:0,33 p/p (dilución 1 a 5 de la solución de IMQ) (AUD2 y LUD2).

Para determinar captura intracelular se utilizaron nanovesículas (AUD, AUD1, AUD2, LUD, LUD1, LUD2) con una doble marca fluorescente: el par fluoróforo-quencher HPTS-DPX en el interior acuoso y el lípido fluorescente RhPE que se incorporó en la membrana lipídica. Para esto se agregó RhPE junto

con los lípidos en cloroformo: metanol 1:1 % v/v, para obtener una concentración 50 µg/ml de RhPE. Las películas lipídicas se resuspendieron con una solución 35 mM de HPTS y 50 mM de DPX en buffer Tris-HCl, y se continuó con la preparación de las nanovesículas como se describió en la sección 3.2.3.1

El HPTS y DPX libres se eliminaron por cromatografía de exclusión molecular empleando un lecho de Sephadex G-25 con tamaño de poro fino (20 – 80 µm) en columnas de 3 ml de volumen de lecho. Se sembraron 200 µl de muestra por columna, que luego se centrifugaron 5 min a 2000 rpm en centrifuga G144D (Gelec, Argentina)

3.2.4 Caracterización de nanovesículas ultradeformables

3.2.4.1 Cuantificación de fosfolípidos e IMQ

Los fosfolípidos se cuantificaron mediante el microensayo colorimétrico de fosfato (Böttcher & Pries, 1961).

IMQ se cuantificó por absorbancia a 305 nm tras la disrupción completa de las nanovesículas en etanol: HCl 98:2 v/v. Para realizar la curva de calibración se diluyó un stock de IMQ 1 mg/ml en ácido láctico 100 mM, pH 2,3, en etanol: HCl 98:2 v/v. La curva estándar fue lineal en el rango 0,125-20 µg/ml IMQ con un coeficiente de correlación de 0,988.

3.2.4.2 Cuantificación de HPTS y RhPE

El HPTS encapsulado se cuantificó midiendo intensidad de fluorescencia a λ_{em} 515 nm y λ_{ex} 413 nm en espectrofluorómetro Perkin Elmer LS55. La intensidad de fluorescencia (IF) de la muestra se comparó con una curva estándar preparada con HPTS/DPX en Buffer Tris HCl pH 8,7. La curva fue lineal en el rango de concentración 0,8-12 µM de HPTS con un coeficiente de correlación de 0,9976. RhPE se cuantificó midiendo emisión de fluorescencia a λ_{em} 580 nm y λ_{ex} 561 nm luego de la disrupción completa de las nanovesículas en metanol. Se utilizó una curva de calibración preparada con RhPE en metanol, que fue lineal en el rango de 0,075–0,5 µg/ml con un coeficiente de correlación de 0,9977.

3.2.4.3 Tamaño y potencial Zeta

El tamaño y el potencial de Zeta se determinaron por DLS como se describió en el **Capítulo 2, sección 2.2.4.1**

3.2.4.4 Morfología por microscopía electrónica de transmisión criogénica (cryo-TEM)

Se prepararon las muestras en un sistema de vitrificación en ambiente controlado Vitrobot Mark IV (FEI, Países Bajos) con temperatura controlada a 22°C y humedad de 100%. Las imágenes fueron adquiridas con un instrumento Jeol JEM-1400Plus (JEOL, Japón), a 120 kV usando una cámara CCD GatanMultiScan 794. La recolección de imágenes se hizo con el software Digital Micrograph (Gatan-USA). La preparación de las muestras y la adquisición de datos fue realizada en el Laboratorio de Microscopía Electrónica (LME), Brazilian Nanotechnology National Laboratory (LNNano).

3.2.4.5 Polarización generalizada (PG) y anisotropía de fluorescencia (AF) de Laurdan

El orden y la fluidez de las bicapas de las nanovesículas se determinaron midiendo PG y AF de la sonda Laurdan, respectivamente, de acuerdo a Altube et al., 2017 (Altube et al., 2017). Brevemente, las nanovesículas se marcaron con Laurdan mezclando 10 µl de solución de Laurdan 120 mM en metanol con un volumen de nanovesículas suficiente para obtener una relación 1:20 mol:mol Laurdan:lípidos. Las medidas se llevaron a cabo en un espectrofluorometro *LS 55, PerkinElmer.*

PG se calculó usando la siguiente ecuación: $PG= I_{440} – I_{490} / I_{440} + I_{490}$. Donde I_{440} e I_{490} son las intensidades de fluorescencia a λ_{em}=440 nm y λ_{em}=490 nm respectivamente, obtenidas de los espectros entre 400-600 nm con una λ_{ex}=364nm ($Slit_{ex}$: 5,0 nm y $Slit_{em}$: 5,0 nm. Velocidad de escaneo: 100 nm/min)

AF se calculó mediante el software del fluorómetro de acuerdo con la siguiente ecuación: $AF= (I_0-G\ I_{90})/ (I_0+2G\ I_{90})$. Donde I_0 e I_{90} son las intensidades de fluorescencia a λ_{em}=440 nm con λ_{ex}=364 nm y el polarizador de excitación orientado a 0 y a 90°, respectivamente. El factor de corrección (G) se obtuvo a partir de la relación de la intensidad de emisión a 0 y 90° con el polarizador de excitación orientado a 90° (después de la sustracción de la luz dispersa).

3.2.4.6 Deformabilidad

La deformabilidad (*D*) de las nanovesículas se calculó según Van den Bergh et al., 2001 con modificaciones (Elsayed et al., 2006), como $D=J(ra/rb)^2$, donde J es la tasa de penetración a través de una barrera de permeabilidad, ra es el tamaño de las nanovesículas después de la extrusión, y rb es del tamaño de las nanovesículas antes de la extrusión. Para determinar J, las nanovesículas se extruyeron a través de dos membranas apiladas de 100 nm (rp) a 0,8 MPa utilizando un extrusor Thermobarrel. El volumen extruido se recolectó por minuto a lo largo de 15 minutos, se cuantificaron fosfolípidos a cada fracción y J se calculó como el área bajo la curva del gráfico de fosfolípidos recuperados en función del tiempo. El diámetro promedio de la vesícula antes de la extrusión (rb) y después de la extrusión (ra) se midió por DLS.

3.2.5 Captura en macrófagos y queratinocitos

En una placa de cultivo de 24 pocillos se sembraron $1,5x10^5$ células HaCaT por pocillo con MEM completo suplementado al 10% SFB o $3x10^5$ células J774A.1 por pocillo con RPMI completo suplementado al 10% SFB. En ambos casos, luego de 24 horas el medio de cultivo fue reemplazado por 300 µl de las formulaciones AUD*, AUD_1, AUD_2, LUD*, LUD_1 y LUD_2 con la doble marca fluorescente HPTX/DPH-RhPE. Las mismas fueron diluidas en MEM al 5% SFB a una concentración de PL de 500 µg/ml. Luego de 3 y 5 h de incubación las células se lavaron con PBS, se levantaron con tratamiento con tripsina y se resuspendieron en PBS. Se analizaron un total de $1x10^4$ células mediante citometría de flujo (BD FACSCaliburTM, BD Biosciences, San José, CA, EE.UU.). Los datos se analizaron utilizando el software WinMDI 2.9 (Microsoft, Redmond, WA, EE.UU.). Las intensidades de fluorescencia obtenidas fueron normalizadas en función de la relación fluoróforo/PL para cada fluoróforo de la siguiente forma:

IF RhPE normalizada= IF RhPE medida / (µg RhPE/mg PL)

IF HPTS normalizada= IF HPTS medida / (µg HPTS/mg PL)

Donde IF RhPE medida es la intensidad de fluorescencia a $\lambda_{exitación}$ 561nm y $\lambda_{emisión}$ 580nm para las células incubadas con cada una de las

nanovesículas, IF HPTS medida es la intensidad de fluorescencia en a $\lambda_{exitación}$ 413 nm y $\lambda_{emisión}$ 515 y µg RhPE/mg PL o mM HPTS/mg PL es la cantidad de cada uno de los fluoróforos cuantificada por mg de PL. Al utilizar esta relación se puede comparar la captura celular de diferentes formulaciones con diferentes proporciones RhPE-HPTS/PL.

3.2.6 Citotoxicidad en macrófagos y queratinocitos

Macrófagos murinos J774A.1 A.1 (ATCC® TIB-67™) fueron suministrados por la Dra. Erina Petrera, de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad Nacional de Buenos Aires, Argentina. Los queratinocitos humanos (células HaCaT) fueron suministrados por el Dr. Salvatierra de la Fundación Instituto Leloir (Buenos Aires, Argentina). Ambas líneas celulares se cultivaron rutinariamente en RPMI o MEM, respectivamente, suplementados con 10% de SFB, 1% de antibiótico-antimicótico y 2 mM de glutamina a 37 °C en 5% de CO_2 y 95% de humedad.

La viabilidad celular tras la incubación con IMQ, AUD*, LUD*, AUD_2 y LUD_2 se determinó utilizando el ensayo de MTT. Brevemente, las células J774A.1 A.1 y HaCaT se sembraron en placas de 96 pocillos a una densidad de 5,5 x 10^4 y 4 x 10^4 células por pocillo, respectivamente. Luego de 24 h de crecimiento, las células se incubaron con 200 µl de diferentes concentraciones de las formulaciones diluidas en medio fresco con 5% de SFB. Las concentraciones de las formulaciones fueron 25, 50 y 100 µg/ml de PL y la correspondiente concentración de IMQ entre 1 y 20 µg/ml de IMQ. Después de 24 o 48 h de incubación, los sobrenadantes se recogieron y almacenaron a -20 °C para el posterior análisis de citoquinas. Las células se lavaron con PBS y se añadieron 100 µl de MTT 5 mg/ml a cada pocillo. Tras de 3 horas de incubación a 37°C, se eliminó la solución de MTT, los cristales de formazán insolubles se disolvieron en dimetilsulfóxido y se midió la absorbancia a 570 nm en un lector de microplacas (Cytation 5 BioTeck, Winooski, VT, EE. UU.). La viabilidad celular se expresó como porcentaje respecto a las células cultivadas en medio de cultivo.

3.2.7 Liberación de citoquinas proinflamatorias

La liberación de citoquinas proinflamatorias en los sobrenadantes se determinó tras la incubación de células J774A.1 A.1 y HaCaT con las formulaciones a concentraciones no citotóxicas (5 µg/ml IMQ) durante 24 h. Como control positivo se utilizó 1 µg/ml de LPS. TNF-α e IL-6 de ratón o humano se cuantificaron en sobrenadantes por ELISA (BD, OptEIA, BD Biosciences, CA, EE. UU.), siguiendo las instrucciones del fabricante.

3.2.8 Penetración en piel *in vitro*

Se utilizaron explantos de piel humana de pacientes caucásicos, que se sometieron a cirugía plástica abdominal. Los pacientes eran sanos y no presentaron antecedentes de enfermedades dermatológicas. Tras la escisión, la piel se cortó en trozos de 10 x 10 cm^2, se extrajo el tejido adiposo subcutáneo, se envolvió en papel de aluminio y se almacenó en bolsas de polietileno a -20 °C hasta su uso. Luego, se cortaron discos de 24 mm de diámetro de la piel congelada, se descongelaron, se limpiaron con buffer Tris-HCl y se transfirieron directamente al modelo de penetración de Saarbrücken sobre un papel de filtro humedecido con buffer Tris-HCl. A continuación, se aplicaron, sobre 4,5 cm^2 de superficie de piel, 50 µl en forma de gotas de 2,5 µl cada una, de las formulaciones seleccionadas que contenían 0,1 mg de IMQ. La piel se incubó a 37 °C durante 1 hora tras secarse las gotas de las formulaciones. Los ensayos se realizaron por quintuplicado usando piel del mismo individuo. Después del tiempo de incubación, las capas de piel se segmentaron utilizando el método de *tape stripping* como se describe en Wagner et al., 2000 (Wagner et al., 2000). Brevemente, se limpió la superficie de la piel con un algodón y se la sujetó utilizando alfileres a un polifan. Se colocó sobre la piel estirada, una máscara de teflón con un orificio central de 15 mm de diámetro. Un trozo de cinta comercial (Scotch 3M) se adhirió sobre la abertura en contacto directo con la piel. Por encima se colocó una pesa de 1 kg, que se sostuvo durante 1 minuto y luego la cinta fue retirada rápidamente. El procedimiento se repitió 20 veces. La primera cinta se eliminó, el resto de las cintas se agruparon de a 5 piezas y la piel restante, es decir la epidermis profunda y la dermis, se cortó en trozos pequeños. A continuación, se extrajo el IMQ incubando las cintas y la piel en 3 ml de

metanol:ácido láctico 100 mM 1:1 v/v a temperatura ambiente durante toda la noche. IMQ se cuantificó en los sobrenadantes por espectrofluorescencia (λ_{ex} 260 nm y λ_{em} 340) (Perkin Elmer LS55 Fluorescence Espectometer, U.K.). La intensidad de fluorescencia se extrapoló a una curva de calibración de IMQ en metanol:ácido láctico 100 mM 1:1 v/v. La curva fue lineal en el rango 30-750 nM de IMQ con un coeficiente de correlación de 0,996.

3.2.9 Inmunización

3.2.9.1 Animales y esquema de inmunización

Ratones Balb/c machos de 4-6 semanas de edad se obtuvieron de la Facultad de Ciencias Veterinarias (UNLP). Se alojaron 5 ratones por jaula y se mantuvieron en una habitación ventilada en condiciones controladas a temperatura ambiente constante de 22 ºC, con un ciclo de luz-oscuridad de 12/12 horas y acceso libre a comida y agua. Todos los procedimientos se llevaron a cabo de acuerdo con los lineamientos institucionales y fueron aprobados por el CICUAL. Tres grupos de cinco ratones por grupo fueron inmunizados tópicamente con 75 µg de OVA mezclado con: i. IMQ; ii. LUD_2; y iii. AUD_2. Utilizando el procedimiento explicado en el Capítulo 1. Las aplicaciones se realizaron una vez a la semana durante cuatro semanas (*prime*), luego los animales recibieron un refuerzo el día 42 (*boost*). Cada dosis consistió de 600 µg de fosfolípidos y 150-200 µg de IMQ.

3.2.9.2 Determinación de IgG total e isotipos

Se colectaron muestras de sangre semanalmente durante 10 semanas a partir de la vena de la cola y se analizaron los anticuerpos IgG total y los isotipos IGg1 e IgG2a mediante ELISA, como se describió en el **Capítulo 2, sección 2.2.11.2**

3.2.9.3 Respuesta celular

El día 35 (post-*prime*) y el día 49 (post-*boost*), los ratones se sacrificaron y se obtuvieron los esplenocitos empleando un gradiente de Ficoll-Hypaque según como se describió en el **Capítulo 2, sección 2.2.11.3**. Los esplenocitos se re-estimularon con 50 µg/ml de OVA o con concanavalina A (5 µg/ml) como control positivo. Las células no estimuladas se usaron como control negativo.

Tras 48 h de incubación, la placa se centrifugó a 350 x g durante 4 min, el sobrenadante se recogió cuidadosamente y se almacenó a -20 °C para el posterior ensayo de citoquinas. Luego, se añadieron 100 µl de solución 5 mg/ml de MTT a cada pocillo. Luego de 3 horas de incubación, la placa se centrifugó en las mismas condiciones y se eliminó la solución de MTT. Los cristales de formazán insolubles se disolvieron en dimetilsulfóxido y la absorbancia se midió a 570 nm en un lector de microplacas.

El índice de estimulación (IE) se calculó de acuerdo con la siguiente ecuación, según Wang et al. al., 2014 (Wang et al., 2014):

$$IE = (Abs\ 570\ ERI)/ (Abs\ 570\ CN - Abs\ 570\ ERNI)$$

donde Abs 570 es la absorbancia a 570 nm, ERI son esplenocitos de ratones inmunizados, CN es el control negativo (esplenocitos de ratones inmunizados pero sin re-estimular) y ERNI son esplenocitos de ratones no inmunizados

La liberación de IFN-γ en el sobrenadante de las células se midió por ELISA siguiendo las instrucciones del fabricante. Las medidas de absorbancia se realizaron a 450 nm en un lector de microplacas. Los títulos INF- γ se normalizaron según el SI de esplenocitos, de acuerdo con la siguiente ecuación:

$$INF\text{-}\gamma/IE = (INF\text{-}\gamma\ OVA - INF\text{-}\gamma\ CN) / IE$$

Donde INF-γ OVA es la concentración de INF-γ secretada por esplenocitos de ratones inmunizados y re-estimulados con OVA, INF-γ CN es la concentración de INF-γ secretada por esplenocitos de ratones inmunizados sin re-estimular y SI es el índice de estimulación descripto arriba.

3.2.10 Estabilidad tras el almacenamiento

La estabilidad coloidal de AUD_1 y LUD_1 se determinó tras 6 meses de almacenamiento a 4°C. Se determinó el tamaño, PDI y potencial Zeta antes y después del almacenamiento como se describió anteriormente.

3.2.11 Análisis estadístico

Los resultados se analizaron usando el análisis de varianza de una entrada (ANOVA) seguido del test de Sidak, Dunnet o Turkey, usando el software GraphPad Prism 4.01. Las diferencias se consideraron significativas para un valor de *$p < 0.05$; **$p < 0.001$; ***$p < 0.001$; ****$p < 0.0001$. n.d.: no significativo

3.3 Resultados

3.3.1 Formulación y caracterización de nanovesículas conteniendo IMQ

En primer lugar, se llevaron a cabo distintas estrategias para incorporar IMQ en las nanovesículas. Por un lado, IMQ se incorporó en el medio acuoso (Tabla 3.1, F1 y F2). Por otro, se agregó en la fase orgánica, junto con la mezcla de lípidos y surfactante (Tabla 3.1, F3 and F4). En ambos casos, las vesículas obtenidas presentaron muy baja cantidad de IMQ incorporado, entre 0,03 y 0,25 mg/ml. La mayor parte del IMQ, que no pudo ser incorporado a las vesículas, no se solubilizó y fue retenido en las membranas durante la extrusión. Por ello, exploramos una tercera estrategia basada en la solubilización de IMQ en ácido linoleico (AL). Para esto, en primer lugar, preparamos y caracterizamos nanovesículas vacías agregando diferentes cantidades de AL (3,6 y 4,8 % p/v) en

la fase orgánica durante la preparación (AUD* y LUD*) (Tabla 3.1, F6, F7, F12 y F13). Utilizando 3,6 % p/v AL se obtuvieron suspensiones liposomales, mientras que utilizando 4,8 % p/v AL para LUD se formaron agregados macroscópicos. La presencia de APT en la matriz de AUD favoreció la integración de AL a las suspensiones, en comparación con LUD. Mientras que LUD con AL fue difícil de preparar resultando en la formación de vesículas en 1 de cada 5 preparaciones, AL se incorporó adecuadamente en todas las preparaciones de AUD*. A continuación, preparamos las nanovesículas utilizando cantidades crecientes de IMQ solubilizado en AL, para lograr la máxima incorporación posible (Tabla 3.1, F8, F9, F10, F11 y F14, F15, F16, F17). Partiendo de 4 mg/ml de IMQ, se obtuvo la mayor eficiencia de encapsulación (EE) (F11 para LUD y F15 para AUD). F15 (AUD_1) presentó un tamaño de 216 nm, potencial Z -32 mV, 1,8 ± 0,4 mg/ml de

Tabla 3.1 Composición y contenido de IMQ de las formulaciones preparadas en las diferentes estrategias evaluadas Los valores se expresan como media ± DE (n = 3).

Formulación	Preparación			IMQ cuantificado (mg/ml)
	Composición	IMQ inicial (mg/ml)	AL (%p/v)	
Imiquimod incorporado en fase acuosa La película lipídica se hidrató con IMQ (5 mg/ml y 10 mg/ml) en ácido láctico 100 mM en buffer Tris				
LUD				
F1	SPC:ColNa (6:1)	5	-	0,04
F2	SPC:ColNa (6:1)	10	-	0,03
Imiquimod incorporado en fase orgánica IMQ (1 mg/ml y 5 mg/ml) en $CHCl_3$:CH_3OH 4:1 v/v				
LUD				
F3	SPC:ColNa (6:1)	1	-	0,03
F4	SPC:ColNa (6:1)	5	-	0,08
AUD				
F5	P:SPC:ColNa (3:3:1)	5	-	0,25
Imiquimod solubilizado en ácido linoleico IMQ en ácido linoleico y mezclado con los lípidos y surfactantes en la mezcla de solventes orgánicos				
LUD				
F6	SPC:ColNa (6:1)	-	3,6	-
F7	SPC:ColNa (6:1)	-	4,8	-
F8	SPC:ColNa (6:1)	0,5	3,6	0,42
F9	SPC:ColNa (6:1)	1	3,6	0,63
F10	SPC:ColNa (6:1)	2	3,6	0,32 ± 0,02
F11	SPC:ColNa (6:1)	4	4,8	0,45 ± 0,57
AUD				
F12	APT:SPC:ColNa (3:3:1)	-	3,6	-
F13	APT:SPC:ColNa (3:3:1)	-	4,8	-
F14	APT:SPC:ColNa (3:3:1)	2	3,6	1,18
F15	APT:SPC:ColNa (3:3:1)	4	4,8	1,82 ± 0,42
F16	APT:SPC:ColNa (3:3:1)	5	4,8	0,74
F17	APT:SPC:ColNa (3:3:1)	8	4,8	0,71

IMQ: Imiquimod; SPC: Fosfatidilcolina de soja; ColNa: Colato de sodio; APT: arqueolípidos polares totales

IMQ y una relación IMQ/PL de 60 µg/mg con 46 ± 10 % EE (Tabla 3.2). Por otro lado, F11 (LUD_1) presentó un tamaño de 300 nm, potencial Z -24 mV, 0,4 ± 0,6 mg/ml de IMQ y relación IMQ/PL 30 µg/mg con 11 ± 14 % EE.

Tabla 3.2. Composición y características estructurales de las nanovesículas. Los valores se expresan como media ± DE (n= 5)

Formula-ción	Tamaño medio (nm ± DE)	PDI ± DE	Potencial Z (mV ± DE)	PL (mg/ml ± DE)	IMQ (mg/ml ± DE)	IMQ/PL (µg/mg ± DE)	EE (%)
AUD*	214 ± 49	0,25 ± 0,12	-22 ± 2	22,2 ± 2,7	-	-	-
AUD_1	216 ± 38	0,26 ± 0,07	-32 ± 6	31,3 ± 14,6	1,84 ±0,42	61 ± 20	46 ± 10
AUD_2	250 ± 94	0,35 ± 0,09	-26 ± 4	6	2,1± 0,2	350 ± 33	-
AUD_1 + AL	261 ± 35	0,30 ± 0,02	-34 ± 1	-	-	-	-
LUD*	325 ± 208	0,33 ± 0,11	-19 ± 2	5,9 ± 1,5	-	-	-
LUD_1	317 ± 84	0,29 ± 0,06	-24 ± 4	14,5 ± 17,4	0,45 ±0,57	31 ± 39	11 ± 14
LUD_2	280 ± 159	0,37 ± 0,09	-14 ± 4	6	1,4 ± 0,1	233 ± 17	-
LUD_1 + AL	361 ± 35	0,36 ± 0,05	-18 ± 2	-	-	-	-

DE: desviación estándar. PDI: índice de polidispersidad; PL: fosfolípido; IMQ: imiquimod; EE: eficiencia de encapsulación
AUD * y LUD *: nanovesículas preparadas con 30 µl de ácido linoleico por ml de suspensión
AUD_1 y LUD_1: nanovesículas que contienen IMQ en ácido linoleico
AUD_2 y LUD_2: nanovesículas que contienen IMQ mezcladas con IMQ en ácido láctico
AUD_1 y LUD_1 + LA: Control de AUD_1 y LUD_1 con ácido láctico y sin IMQ.

AUD_1 resultó de menor tamaño medio, menor potencial Z, relación IMQ/PL 2 veces mayor y mayor eficiencia de encapsulación que LUD_1. Sin embargo, como se esperaba, la relación IMQ/PL de AUD_1 fue baja (Tabla 3.2). Teniendo en cuenta 600 µg de fosfolípidos como una dosis normalmente empleada en la vacunación tópica (Caimi et al., 2017; Carrer et al., 2014; Higa et al., 2012), esta formulación proporcionaría 36 µg IMQ/ratón, 70 veces menos IMQ que si se administra como Aldara o emulsión IMQ (2,5 mg IMQ/ratón) (Arnold, 2017; Lopez et al., 2017). Para superar esta limitación, la dosis de IMQ se incrementó mezclando AUD_1 y LUD_1 con IMQ disuelto en ácido láctico 100 mM. Nuestra hipótesis es que una asociación electrostática entre IMQ disuelto en ácido láctico, con carga positiva, y las nanovesículas con carga negativa, contribuiría a aumentar la penetración de IMQ a través de *SC*. La mezcla de AUD_1 y LUD_1 con IMQ en ácido láctico, dio como resultado las formulaciones AUD_2 y LUD_2 de pH 5,5 sin IMQ precipitado, que permitieron aumentar la dosis de IMQ hasta 150-200 µg/ratón. Observamos que la mezcla con IMQ no cambió el tamaño medio ni el PDI de las nanovesículas. Sin embargo, la mezcla con IMQ, y no la solución del ácido láctico, aumentó el potencial Z de AUD_2 y LUD_2, mostrando algún tipo de asociación electrostática (Tabla 3.2)

Observamos que la suplementación con IMQ con alteró el tamaño medio de las vesículas, y solo produjo un pequeño cambio en el PDI (De 0.26 a 0.35 y de 0.29 a 0.37 para AUD_2 y LUD_2, respectivamente). La suplementación, sin embargo, y no el ácido láctico, aumentaron el potencial Z de AUD_2 y LUD_2 (Tabla 3.2).

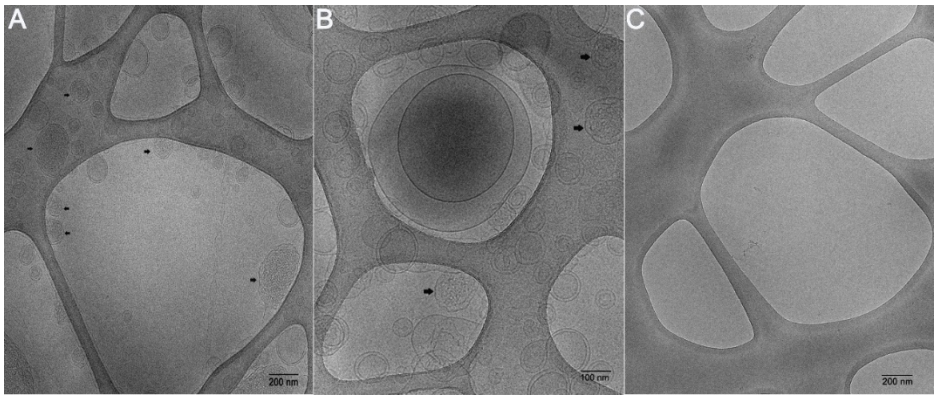


Figura 3.1. Imágenes de Cryo-TEM de (A) AUD*; (B) AUD_1 y (C) IMQ en ácido linoleico. Las flechas negras destacan los agregados dentro de las nanovesículas.

Las imágenes de Cryo-TEM de AUD_1 mostraron nanovesículas unilamelares y bilamelares entre 100 y 200 nm (Figura 3.1), con una morfología similar a la observada previamente para AUD sin AL (**Capítulo 2, Figura 2.4)**. En algunas nanovesículas se observaron agregados en el interior (flechas negras) estructuras no lamelares (fases bicontinuas cúbicas) previamente descritas para las mezclas de monolinoleína y ácido linoleico a 97:3 p/p (Negrini & Mezzenga, 2011).

La fluidez y el orden de las bicapas no se vieron afectados por la incorporación del IMQ (Figura 3.2 A y B), pero la deformabilidad de las nanovesículas mostró cambios significativos inducidos tanto por el ácido linoleico y como por la mezcla con IMQ (Figura 3.3 A y B). Mientras que la adición de ácido linoleico disminuyó ≈ 40 y ≈ 60% la deformabilidad de AUD_1 y LUD_1 (respecto de AUD y LUD sin ácido linoleico) respectivamente, la mezcla con IMQ disminuyó ligeramente, 10%, la deformabilidad AUD_2 pero aumentó 40% la deformabilidad LUD_2 (respecto de AUD_1 y LUD_1, respectivamente). En general, la deformabilidad de todas las nanovesículas se mantuvo entre 2,5 y 6 veces mayor que la de las nanovesículas no deformables preparadas con SPC: APT 1:1 p/p (Tabla 3.3).

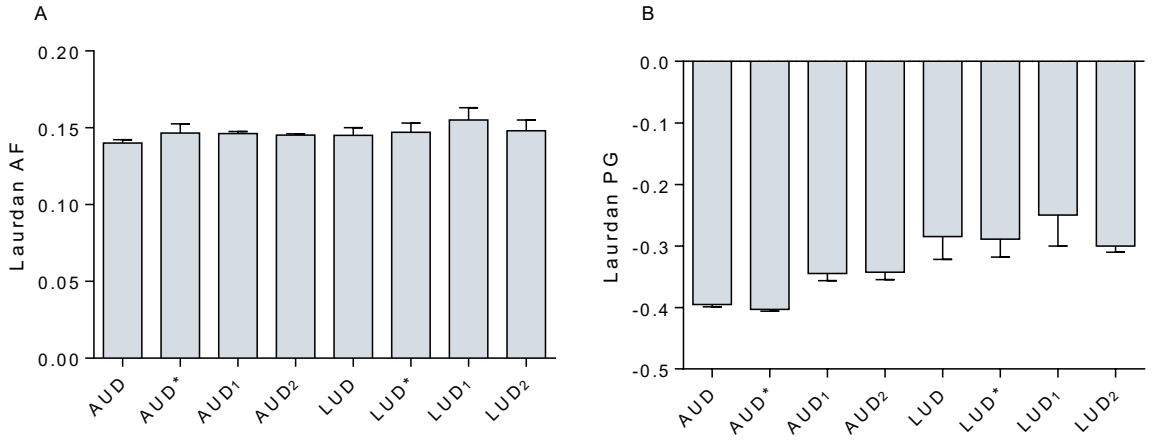


Figura 3.2. Anisotropía de fluorescencia de Laurdan (AF) (A) y polarización generalizada (PG) (B) de las nanovesículas. Los valores se expresan como media ± DE (n = 2).

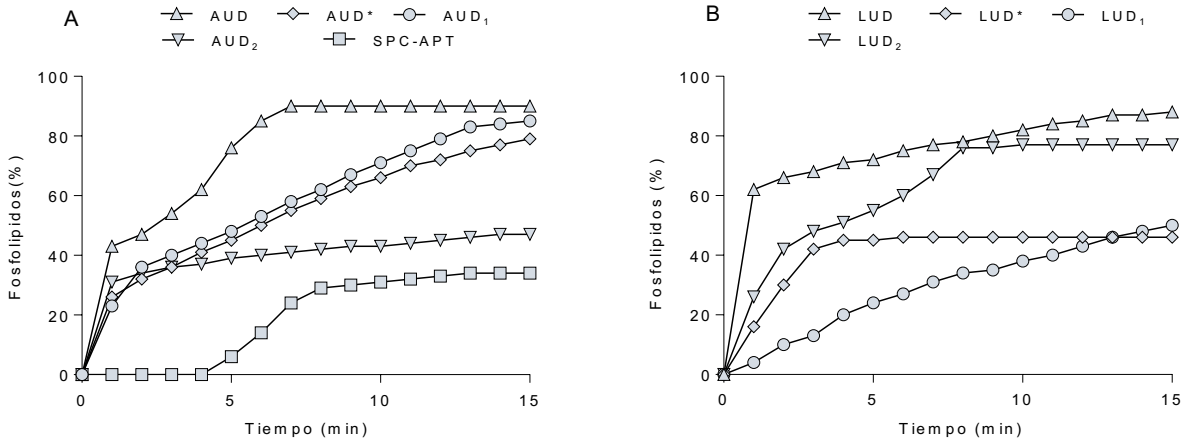


Figura 3.3. Flujo de fosfolípidos correspondiente al pasaje de AUD (A) y LUD (B) a través de membranas de 100 nm en función del tiempo.

Tabla 3.3 Deformabilidad (D) y flujo de penetración a través de la barrera de permeabilidad (J) de las formulaciones

Formulación	J	*D* = J(ra/rb)
AUD	1132	920
AUD*	806	570
AUD_1	853	480
AUD_2	591	400
APT:SPC	284	155
LUD	1118	890
LUD*	615	378
LUD_1	438	330
LUD_2	924	726

3.3.2 Captura celular

La captura de AUD*, AUD_1, AUD_2, LUD*, LUD_1 y LUD_2 marcadas con el análogo lipídico RhPE y el fluoróforo HPTS en concentraciones de 500 µg/ml PL en macrófagos (células J774A.1 como modelo de CPA) y queratinocitos (células HaCaT tipo celular principal de la epidermis) se estudió luego de 3 y 5 horas de incubación por citometría de flujo.

La IF de RhPE dentro de las células es un indicador del grado de internalización de las nanovesículas, mientras que la IF del HPTS brinda información sobre la integridad de las nanovesículas tras dicha internalización (Altube et al., 2016). HPTS y su *quencher*, DPX, se cargaron en el interior acuoso de los nanovesículas en concentraciones tales que la cercanía de las moléculas hace que la fluorescencia de HPTS sea bloqueada por el DPX. Si las nanovesículas se rompen, las moléculas se diluyen y se alejan, generando un incremento de la fluorescencia del HPTS aumenta como se muestra en la Figura 3.4.

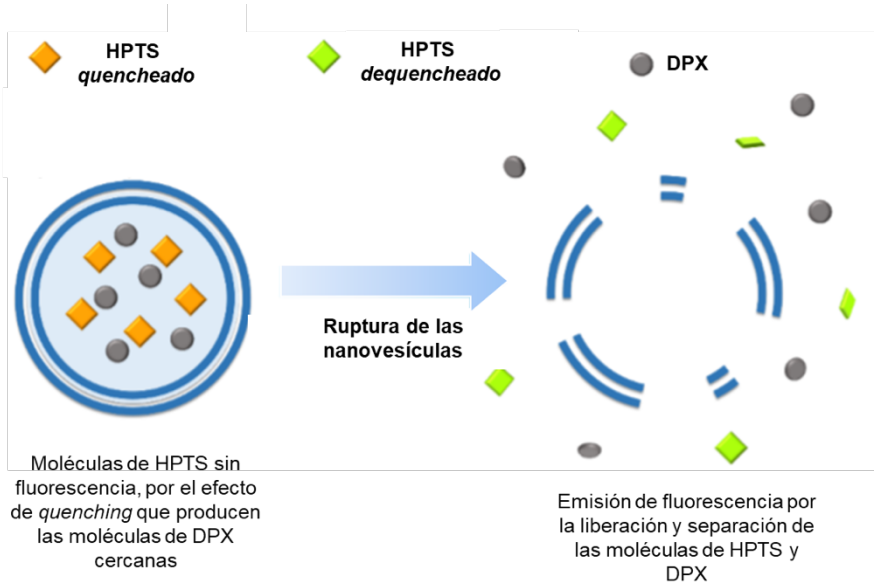


Figura 3.4 Ruptura de nanovesículas, liberación y *dequenching* de HPTS

La Tabla 3.3 muestra las relaciones RhPE/PL y HPTS/PL de las formulaciones. Se observaron diferencias en la incorporación de RhPE y HPTS en las nanovesículas, por lo que se requirió de un paso de normalización en función de la relación.

AUD* fue la formulación más capturada por células J774A.1, tanto luego de 3 como de 5 horas (10 veces más capturada que LUD*). La incorporación del IMQ y su adición externa disminuyó significativamente la captura de los AUD* a valores comparables con aquellas correspondientes a las formulaciones de liposomas ultradeformables (LUD*, LUD_1 y LUD_2) (Figura 3.5.A). Mediante el estudio de IF de HPTS hallamos que, si bien AUD_1 y AUD_2 fueron menos capturadas por los macrófagos que AUD*, la pérdida de su integridad en el interior celular fue equivalente a la de AUD*, señalando liberación de los componentes de las nanovesículas en el interior de las células revelada sobre todo tras 5 h de incubación. Por el contrario, todas las formulaciones de LUD* mostraron baja IF de HPTS (Figura 3.5.B).

Tabla 3.3 Concentración de PL, HPTS y RhPE de las nanovesículas marcadas con las sondas fluorescentes.

Formulación	PL (mg/ml)	HPTS (mM)	HPTS/PL (mM/mg)	RhPE µg/ml	Rho/PL (µg/mg)
AUD	29	2	0,08	1,3	0,05
AUD_1	42	2	0,05	5,1	0,12
AUD_2	6	1	0,18	0,6	0,11
LUD	28	1	0,05	1,9	0,07
LUD_1	14	1	0,07	4,3	0,30
LUD_2	6	1	0,21	1,9	0,32

En las células HaCaT, la captura celular fue menor que en células J774A.1, encontrándose IF de RhPE significativamente bajas. Sólo se observó captura en aquellas formulaciones que contienen IMQ, encontrándose la máxima internalización en el caso de AUD_2 tras 5 h de incubación (Figura 3.5.C). No se observaron diferencias entre AUD* y LUD*. La ruptura de las nanovesículas en el interior de estas células también fue significativamente menor que en J774A.1 (3.5.D).

3.3.3 Citotoxicidad sobre queratinocitos y macrófagos

Las diferencias en citotoxicidad tras 24 y 48 h de incubación con IMQ libre, AUD_2 y LUD_2 se evaluaron en macrófagos J774A.1 y células HaCaT. Dado que no se observaron diferencias significativas entre la captura de AUD_1 y AUD_2

en células J774, pero fue significativamente más alta para AUD_2 en HaCaT, y teniendo en cuenta que buscamos trabajar con formulaciones que incorporen la mayor cantidad de IMQ, elegimos testear la citotoxicidad sólo de AUD_2. Comparativamente evaluamos también el efecto de LUD_2.

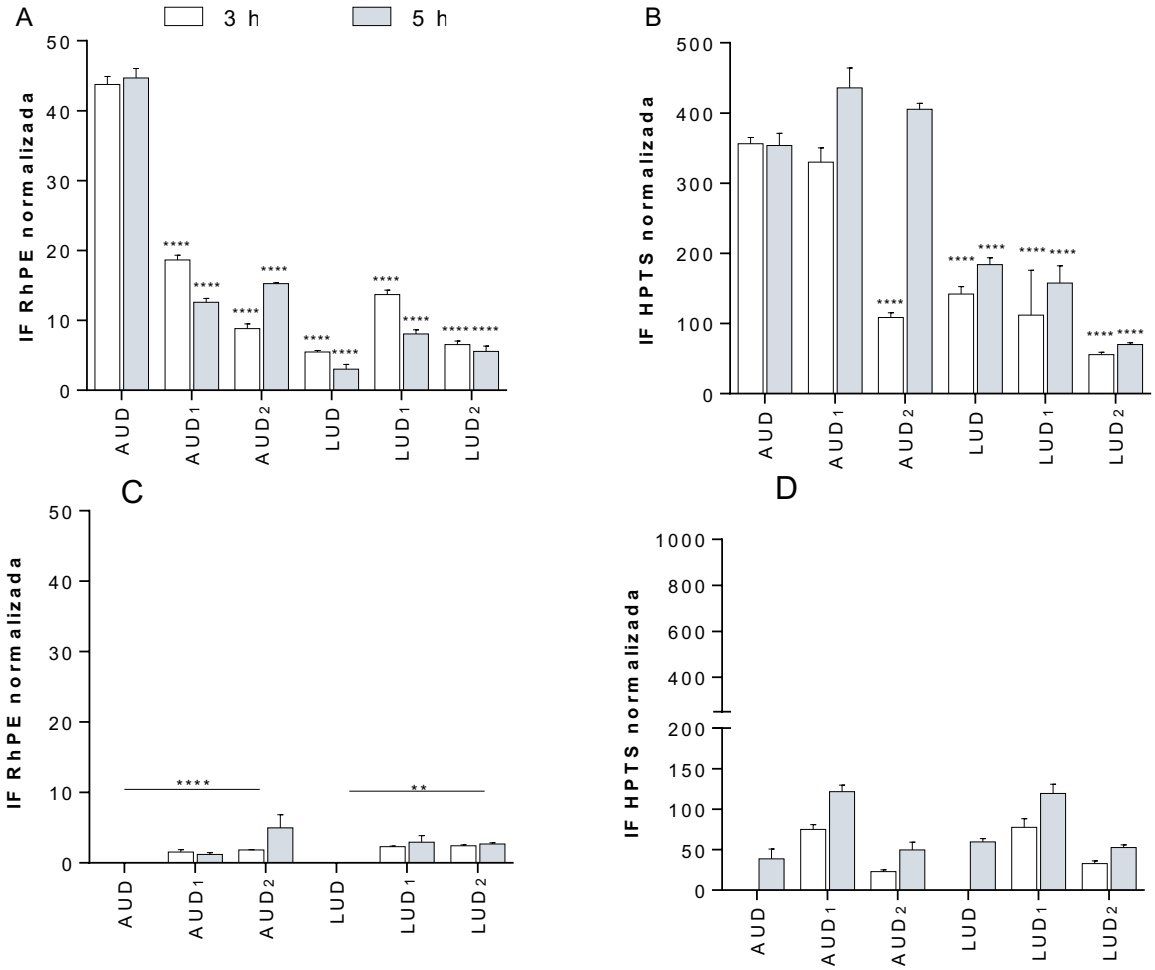


Figura 3.5 Captura en células J774A.1 (A y B) y HaCaT (C y D) luego de 3 y 5 horas de incubación. A y C corresponden a IF de RhPE normalizada, mientras que B y D corresponden a IF de HPTS normalizada. En las figuras A y B, los asteriscos indican diferencias significativas respecto de AUD utilizando comparación múltiple de Dunnett. En la figura C y D los asteriscos celestes representan diferencias significativas entre las formulaciones a 3 horas y los celestes a 5 horas utilizando comparación multiple de Turkey.

El método de MTT permite medir la proliferación y actividad metabólica celular de manera general. El mecanismo exacto de la reducción de MTT a

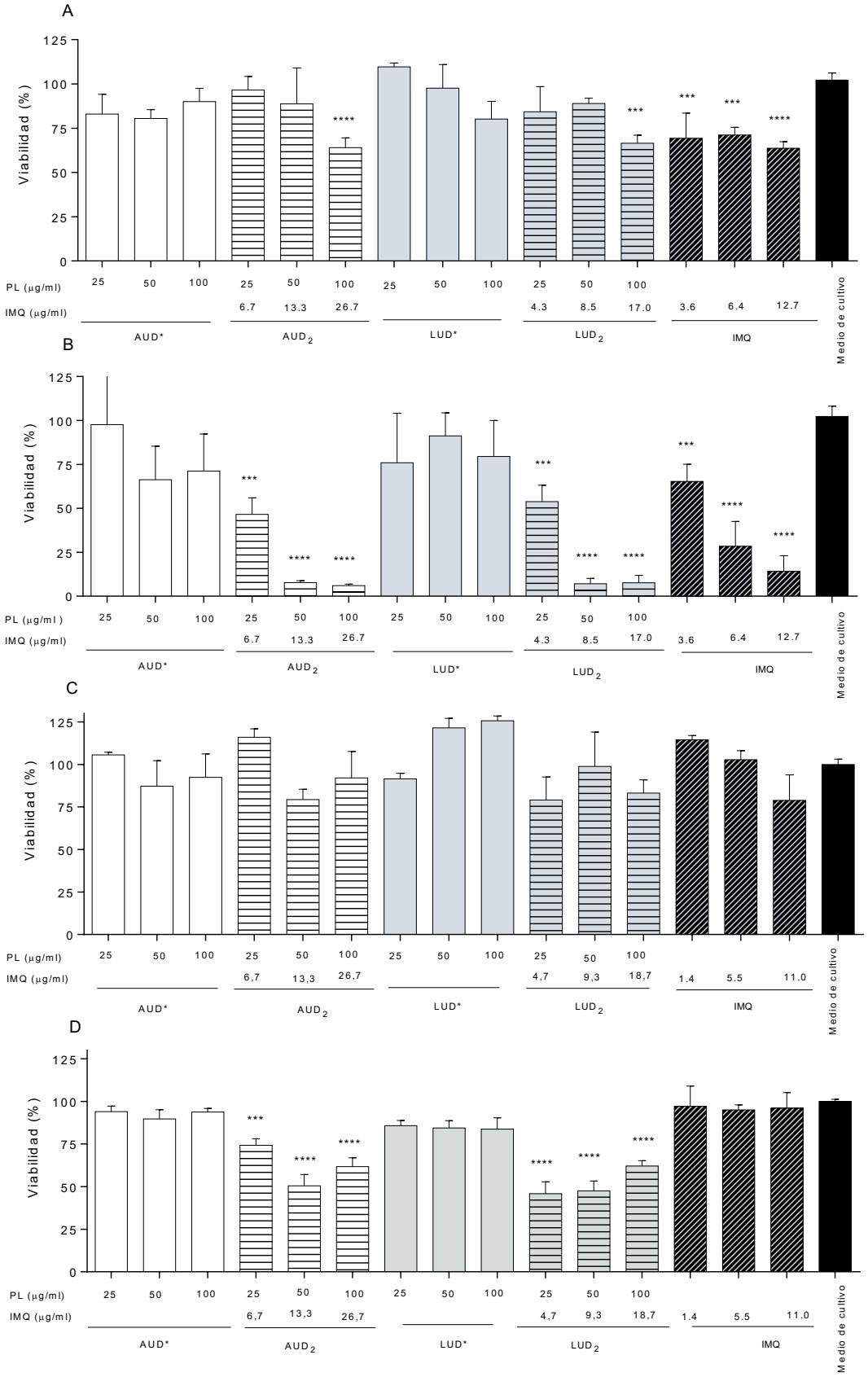


Figura 3.6. Viabilidad de células J774A.1 (A y B) y células HaCaT (C y D) tras 24 h (A y C) y 48 h (B y D) de incubación de con nanovesículas vacías, IMQ, AUD_2 y LUD_2, determinada por ensayo de MTT. Los valores se expresan como media ± DE (n = 2). Los asteriscos indican diferencias significativas respecto del control con medio de cultivo utilizando el test de Dunnet

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).

En este trabajo hallamos que las nanovesículas vacías no disminuyeron significativamente la viabilidad de J774A.1 (Figura 3.6 A y B) ni de HaCaT (Figura 3.6 C y D) después de 24 o 48 h de incubación. Por el contrario, la viabilidad de los macrófagos disminuyó en función de la dosis y el tiempo de incubación tras la incubación con IMQ libre, AUD_2 y LUD_2, resultando todas las muestras igualmente citotóxicas: a ≈ 8,5-13 μg/ml de IMQ la viabilidad de las células J774A.1 disminuyó 85-90% tras 48 h de incubación. Por otro lado, la viabilidad de los queratinocitos solo disminuyó 50% tras 48 h de incubación con AUD_2 y LUD_2 en concentraciones 13,3 μg/ml y 4,7 μg/ml de IMQ, respectivamente (Figura 3.6 C y D).

3.3.4 Liberación de citoquinas proinflamatorias

En la Figura 3.7, se observa la inducción de las citoquinas proinflamatorias IL-6 y TNF-α en células J774A.1 A.1 y HaCaT tras 24 horas de incubación con concentraciones no citotóxicas de IMQ libre, AUD_2 y LUD_2. En células J774A.1 A.1, IMQ libre, así como AUD_2 y LUD_2 indujeron IL-6 (sin diferencias significativas) en una cantidad menor que la inducida por LPS; AUD_2 indujo significativamente más liberación de TNF-α que las demás muestras, incluyendo LPS (Figura 3.7.A y B). Por otro lado, en células HaCaT, AUD_2 indujo más IL-6 que las demás muestras (Figura 3.7.C), pero ninguna de ellas indujo TNF-α.

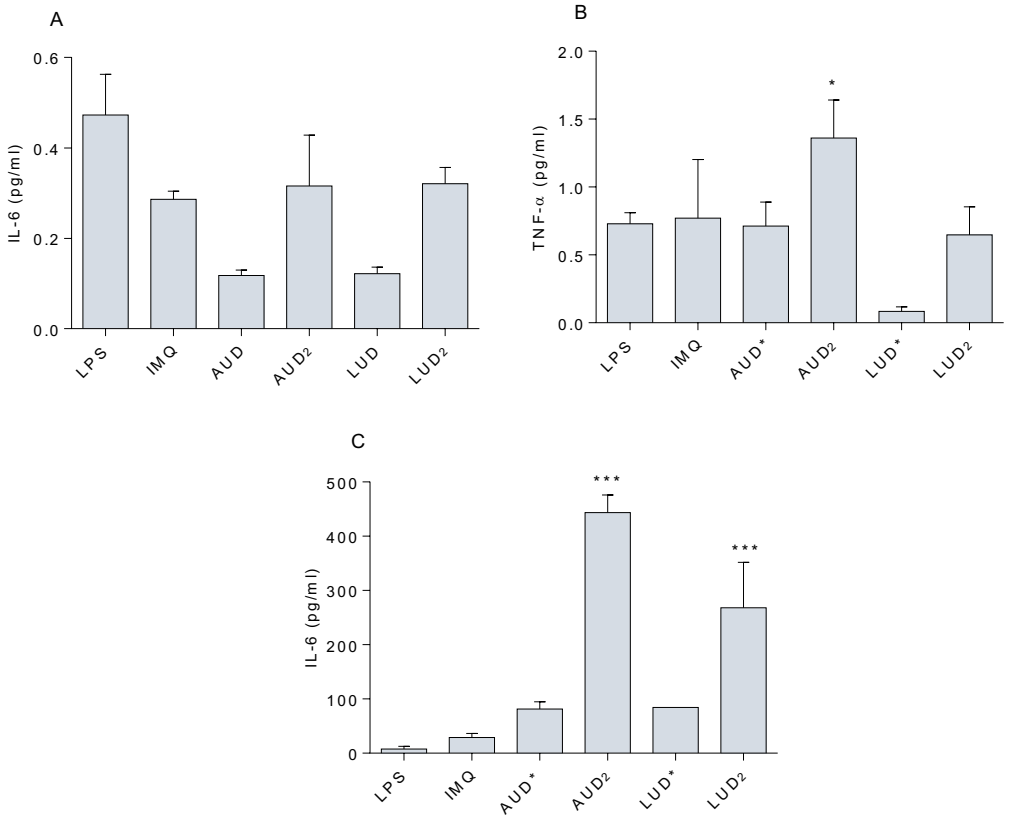


Figura 3.7. Citoquinas proinflamatorias liberadas por células J774A.1 (A y B) (IL-6 y TNF-α, respectivamente) y por células HaCaT (C) (IL-6) tras 24 horas de incubación con nanovesículas vacías, IMQ libre, AUD_2 y LUD_2. Los valores se expresan como medias ± DE (n = 2). Los asteriscos indican diferencias significativas respecto a IMQ utilizando el test de Dunnet

3.3.5 Penetración *in vitro* en piel

Una vez realizada la caracterización fisicoquímica, y el estudio de citotoxicidad, captura y liberación de citoquinas proinflamatorias, se estudió la penetración *in vitro* en explantos de piel humana de IMQ libre, AUD_2 y LUD_2. Los resultados mostraron que, al cabo de 1 h de incubación, 12 ± 3% de la dosis de IMQ aplicada como AUD_2 se encontró en el *SC* (Figura 3.4). Por el contrario, tras la aplicación tópica de IMQ libre y LUD_2, se encontraron 7 ± 2% y 4 ± 1% en el *SC*, respectivamente. En todos los casos menos del 0,05% de la dosis se cuantificó en la epidermis viable. En general, la acumulación total de IMQ en la piel fue 3 veces mayor cuando se aplicó como AUD_2 (30 ± 8 $\mu g/cm^2$) que como LUD_2 (10 ± 3 $\mu g/cm^2$) y 1,5 veces mayor que como IMQ libre (20 ± 6 $\mu g/cm^2$).

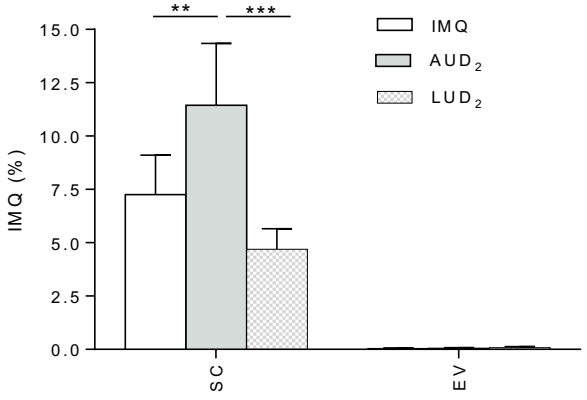


Figura 3.4. Acumulación de IMQ en piel *in vitro*. Porcentaje acumulado de la dosis IMQ aplicada en el estrato córneo (SC) y la epidermis viable (EV) tras 1 h de incubación con IMQ, AUD_2 y LUD_2. Los asteriscos indican diferencias significativas utilizando comparación multiple de Turkey

3.3.6 Respuesta inmune tras la aplicación tópica

3.3.6.1 Determinación de IgG total e isotipos

La respuesta inmune sistémica tras la aplicación tópica de IMQ, AUD2 y LUD2 se evaluó usando OVA como antígeno modelo. Hallamos que AUD2 y LUD2 indujeron títulos séricos de IgG más altos que IMQ libre (Figura 3.8 A). Mientras que IMQ libre no produjo el isotipo IgG2a, la relación IgG2a/IgG1 (indicador de la polarización de la respuesta Th1/Th2 en ratones) de LUD2 fue ~ 0,5, es decir, igual que la informada para AUD sólo (sin IMQ ni ácido linoleico), lo que sugiere una tendencia a una respuesta humoral (Caimi et al., 2017). AUD2, por otro lado, indujo una relación de isotipos ~ 1 (Figura 3.8 B)

3.3.6.2 Respuesta celular

Además, el efecto de la inmunización sobre la inmunidad celular se determinó midiendo la producción de IFN-γ y el IE en esplenocitos estimulados con OVA. Los títulos INF- γ normalizados por IE de los esplenocitos estimulados con OVA, fueron significativamente mayores en ratones inmunizados con AUD_2 que en el resto de los grupos, tanto *post-prime* como *post-boost* (Figura 3.9). Por el contrario, IMQ libre indujo títulos bajos de INF-γ, mientras que los inducidos por LUD_2 estuvieron por debajo del límite de detección. Estos resultados sugieren que solo AUD_2 generó una tendencia hacia una respuesta celular.

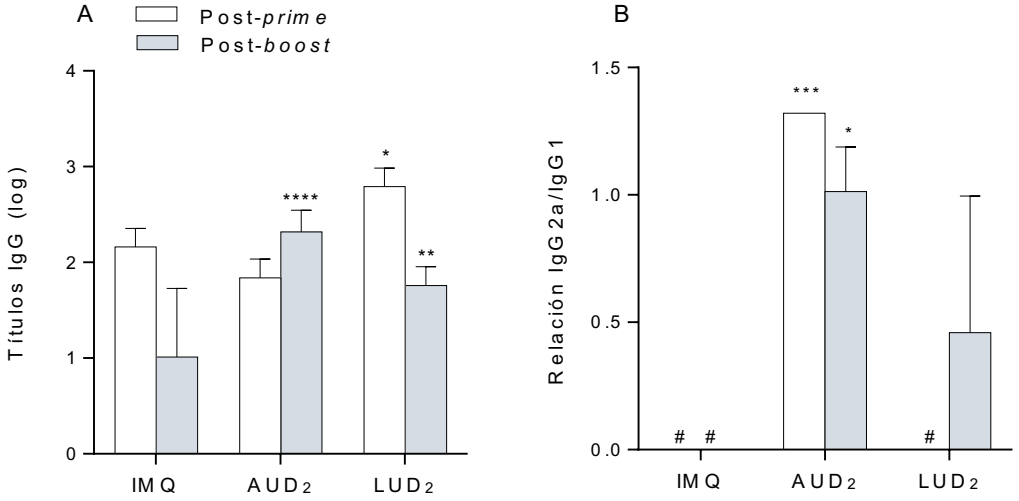


Figura 3.8. Respuesta inmune sistémica tras aplicación tópica de nanovesículas mezcladas con OVA. (A) Títulos de IgG en suero post-*prime* y post-*boost*. (B) relación isotipo IgG2a / IgG1. Los asteriscos indican diferencias significativas respecto a IMQ tras la comparación múltiple de Dunnett. # IgG2a debajo del límite de detección

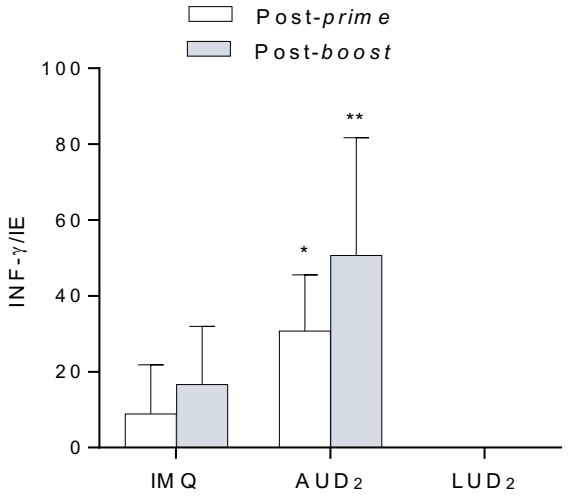


Figura 3.9. Producción de IFN-γ normalizada por el índice de estimulación (IE) de esplenocitos de ratones inmunizados, tras la estimulación con OVA. Los valores representan la producción media ± DE (n = 5). Los asteriscos indican diferencias significativas respecto a IMQ tras la comparación múltiple de Dunnett.

3.3.7 Estabilidad de las nanovesículas tras el almacenamiento

La estabilidad coloidal de la dispersión acuosa de AUD_1 y LUD_1 almacenadas durante 6 meses a 4 °C se evaluó en términos de tamaño medio, PDI y potencial Z. La estabilidad coloidal de AUD_1 se mantuvo sin cambios hasta 5 meses a 4 °C. Se detectó un aumento del tamaño de AUD_1 solo después de 6

meses (Figura 3.10). Sin embargo, la estabilidad coloidal de LUD_1 se perdió rápidamente. Después de 1 mes de almacenamiento, el tamaño de LUD_1 aumentó de 220 nm a varias micras y apareció precipitado. Después de 5 meses de almacenamiento aparecieron dos fases en LUD_1.

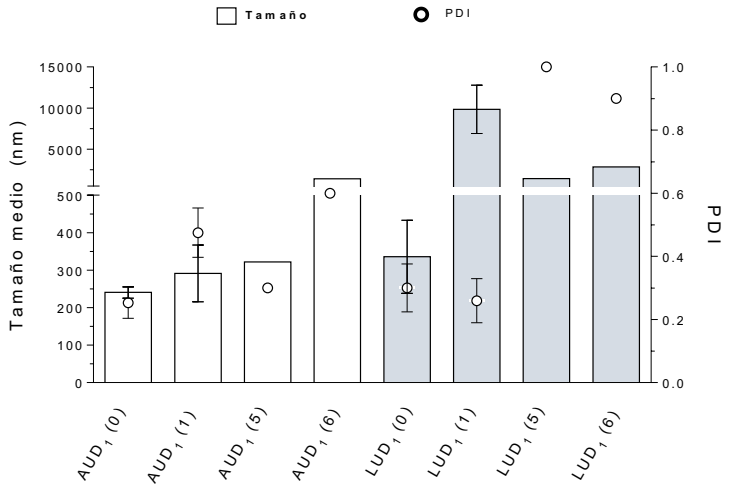


Figura 3.10 Estabilidad coloidal tras almacenamiento. Tamaño e índice de polidispersidad de AUD_1 y LUD_1 recién preparados (0) y después de 1 (1), 5 (5) y 6 (6) meses de almacenamiento a 4 ºC. PDI: índice de polidispersidad

3.4 Discusión

IMQ es una molécula pequeña (PM 240,3 Da) de la familia de las aminas imidazoquinolinas (Figura 3.11) poco soluble en solventes hidrófilicos o lipófilicos (Telò et al., 2016). IMQ es prácticamente insoluble en agua a pH fisiológico, en solventes orgánicos comunes y en excipientes farmacéuticos. Por ser una base débil de pKa 7,3, IMQ es soluble en ácido láctico 0,1 M y en ácidos grasos tales como ácido esteárico, ácido oleico y ácido linoleico (Chollet et al., 1999). Estas cuestiones dificultan la incorporación de grandes cantidades de IMQ en nanovesículas ultradeformables.

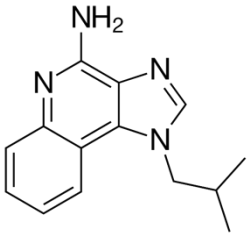


Figura 3.11 Estructura de IMQ (1- [2-metilpropil] -1H-imidazo [4,5-c] quinolin-4-amina).

Las nanovesículas ultradeformables, por otro lado, en lugar de difundir a través del *SC* lo penetran (Cevc, 2004). En contraste con la difusión, la penetración de nanovesículas es independiente del gradiente de concentración a través de la barrera y del coeficiente de partición en la barrera (Cevc, 2004; Morilla & Romero, 2016). Se observó, además, que las drogas solubles no necesariamente deben estar atrapadas en el espacio acuoso de las nanovesículas para penetrar (Elsayed et al., 2006)0, ya que las nanovesículas ultradeformables interrumpen la lámina lipídica intercelular, facilitando la penetración de fármacos libres a través del *SC* (Brewer et al., 2013; Duangjit et al., 2014).

En este trabajo, en primer lugar, se desarrollaron varias estrategias para la incorporación de IMQ en AUD y LUD: i. En el especio acuoso interno, para lo que el IMQ se solubilizó en ácido láctico 100 mM, como lo reportó Parra, et al. (F. L. Parra et al., 2018), ii. En la membrana lipídica, para lo que el IMQ se solubilizó en la mezcla de cloroformo/metanol, como ha reportado Ma et al., (Ma et al., 2015) iii. solubilizado en ácido linoleico de acuerdo con lo descripto por Celia et al (Celia et al., 2012). El ácido linoleico es el ácido graso poliinsaturado más abundante (C18: 2, cis-9, 12) en la epidermis y es un componente esencial de las ceramidas del *SC*, para la organización y la función de barrera de la permeabilidad de la piel (Hansen & Jensen, 1985). Ácido linoleico se ha vuelto cada vez más popular en la industria cosmética debido a sus propiedades beneficiosas para la piel. Ejerce múltiples efectos sobre las membranas celulares, la barrera epidérmica e incluso los procesos inflamatorios (Abels & Proksch, 2006; Proksch et al., 1993). Por otro lado, el IMQ es altamente soluble en ácido linoleico (17 mg/ml). Celia et al. reportó la incorporación de ácido linoleico a 0,05 y 0,1% p/v en liposomas de composición SPC y ColNa para su

aplicación tópica (Celia et al., 2012). Se ha sugerido que el ácido linoleico se integra completamente en la bicapa de las vesículas (Hąc-Wydro et al., 2009; Leekumjorn et al., 2009; Rogerson et al., 2006) y actúa como un activador de borde que puede modificar tanto la fluidez de la bicapa como el tamaño medio de las vesículas (Jewell et al., 2005). En este trabajo la mejor estrategia fue utilizar 4,8 %p/v de ácido linoleico y 4 mg/ml de IMQ para obtener suspensiones liposomales con la máxima eficiencia de encapsulación, siendo 47 ± 10 % para AUD_1 y 11 ± 14 % para LUD_1. En coincidencia con esto, Ma et al., (Ma et al., 2015) reportó la incorporación de IMQ en transetosomas (SPC 36 mg, ácido oleico 4 mg, etanol 0,2 ml/ml en PBS, pH 5.8) con una EE 85 % y 0,42 mg/ml IMQ.

En segundo lugar, investigamos la existencia de diferencias en citotoxicidad, captura y liberación de citoquinas proinflamatorias tras la incubación con las diferentes nanovesículas se evaluaron en macrófagos (como modelo de CPA) y queratinocitos (principal tipo celular de la epidermis). TLR7 es altamente expresado en macrófagos J774A.1 y se sabe que 0,5-4 µg/ml de IMQ induce la producción de grandes cantidades de citoquinas proinflamatorias, incluidas IL-6 y TNF-α (De Meyer et al., 2012). En altas concentraciones (30-50 µg/ml) IMQ inicia la muerte de macrófagos por autofagia a través de TLR7 (De Meyer et al., 2012). Los receptores TLR7, ubicados en la pared de los endosomas, pueden reconocer componentes microbianos que sólo son accesibles después de que el microbio se ha desintegrado (de Janneway, 2008). Por otro lado, en células HaCaT que no expresan TLR7 ni TLR8, 5 µg/ml de IMQ induce la producción de TNF-α, IL-1β, IL-6 e IL-8 por un mecanismo independiente de TLR7 (Schön et al., 2006). En las células HaCaT, IMQ interactúa con el receptor de adenosina A_{2A} y disminuye la activación de la adenilato ciclasa, disminuyendo así los niveles de cAMP (Schön et al., 2006). Esta acción disminuye la acción inhibitoria de cAMP en la transcripción de mediadores proinflamatorios y contribuye a la inducción de citoquinas por parte del IMQ en queratinocitos. Por encima de 100 µg/ml, IMQ induce directamente la apoptosis en queratinocitos mediante la activación de la ruta mitocondrial (Meyer et al., 2003; Schön et al., 2006).

Nuestros resultados mostraron que AUD fue más ávidamente capturado por células J774A.1 que LUD debido a la presencia de receptores *scavenger* de tipo A sobre los macrófagos. Sin embargo, encontramos que la incorporación de IMQ en las formulaciones disminuyó dicha captura, aunque con una liberación significativamente alta de HPTS intracitoplasmática. Este resultado se tradujo en la ruptura de las nanovesículas y el incremento en la disponibilidad de IMQ en las células, capaz de ser reconocido por TLR7 e iniciar la secreción de citoquinas proinflamatorias, aún tras haber sido en menor magnitud que AUD. En cuanto a las células HaCaT, mostramos que sólo aquellas formulaciones con IMQ en su estructura fueron muy poco capturadas. Los resultados encontrados sugieren que debido al mayor potencial de entrega endosomal de IMQ en los macrófagos y la mayor interacción con el receptor de adenosina A_{2A} superficial en queratinocitos, AUD_2 indujo mayores cantidades de liberación de citoquinas proinflamatorias que IMQ libre y LUD_2 por macrófagos y queratinocitos.

Los resultados de penetración en piel mostraron que a pesar de su menor deformabilidad medida por el ensayo de extrusión a través de membranas, la penetración de IMQ en la piel humana como AUD_2 fue mayor que como LUD_2. La combinación de una mayor cantidad de IMQ incorporado y una mayor interacción de IMQ con la superficie AUD_2 en comparación con LUD_2, podría explicar la mayor penetración de IMQ como AUD_2. Ntimenou et al., 2012 encontraron que la deformabilidad se puede utilizar como una herramienta predictiva para mejorar el transporte de la piel para moléculas hidrofílicas, pero no siempre *D* se correlaciona linealmente con la penetración a través de la piel humana (Ntimenou et al., 2012).

Solo dos trabajos han reportado recientemente, la penetración cutánea de IMQ incorporado en vesículas ultradeformables. Peralta et al., 2015 encontraron que el porcentaje de IMQ que penetró en la piel humana de las suspensiones de liposomas ultraflexibles (SPC:NaCol:IMQ 10:3:1 relación molar) no fue significativamente diferente de su suspensión en buffer. La mayor parte del IMQ se encontró en la epidermis (8,5%) y en la dermis (3,4%) sin llegar al compartimento receptor de las celdas de Franz en cantidades cuantificables. Ma et al., 2015 reportaron que la acumulación de IMQ en piel de cerdo aumentó significativamente cuando se administró incorporado en transetosomas

(SPC:desoxicolato de sodio:etanol a 36 mg:8 mg:0,2 ml/ml de suspensión) (20-24 $\mu g/cm^2$) en comparación con Aldara (14,4 $\mu g/cm^2$) después de 24 horas de incubación. La encapsulación de IMQ en transetosomas incrementó la acumulación de IMQ en el *SC* y los estratos más profundos, mientras que se redujo la llegada a la sangre, evitando los efectos secundarios sistémicos en comparación con Aldara (Ma et al., 2015). Si bien el modelo de piel y el tiempo de incubación fueron diferentes, nuestros resultados mostraron una mayor acumulación de IMQ para AUD_2 en comparación con transetosomas y Aldara. Además, una persistencia prolongada de IMQ en las capas superiores de la piel es ventajosa en términos de maximizar la respuesta inmunológica y reducir los posibles efectos secundarios sistémicos de IMQ (Gogoll et al., 2016). Nuestros resultados mostraron que con AUD_2 acumularon cantidades más altas de IMQ en las capas superiores de la piel que en la epidermis viable.

Luego de administrar tópicamente las formulaciones en el lomo de ratones, encontramos que AUD_2 indujo una relación de isotipos IgG2a/IgG1 ~ 1, incrementándose dicha relación respecto de AUD sin IMQ mostrada en el Capítulo 2; lo que estuvo acompañado de mayores títulos de INF-γ y estimulación de esplenocitos que los inmunizados con IMQ libre y LUD_2.

Finalmente, encontramos que AUD_1 se mantuvo estable coloidalmente hasta 5 meses a 4 °C, mientras que después de 1 mes de almacenamiento, el tamaño de LUD_1 aumentó y se formó un precipitado. Dado que el ácido linoleico es susceptible a la oxidación debido a la presencia de dobles enlaces, las formulaciones con ácido linoleico siempre requieren la adición de antioxidantes (Goebel et al. 2010). La presencia de bajas cantidades de lípidos neutros, carotenoides con alta actividad antioxidante, como bacterioruberina (datos no mostrados), en APT, podría ser responsable de la mayor estabilidad coloidal de AUD_1 que LUD_1.

Como conclusión, en este trabajo presentamos nuevos arqueosomas ultradeformables-IMQ para vacunación tópica. Estas nanovesículas indujeron la liberación de citoquinas proinflamatorias en macrófagos y queratinocitos *in vitro* e incrementaron la penetración en el *SC* del IMQ. Aplicadas tópicamente, AUD_2 provocó altos niveles de anticuerpos IgG2a en suero y producción de INF-γ, lo que significa que AUD_2 indujo efectivamente una respuesta inmune mediada por Th1, en comparación con AUD sin IMQ e IMQ solos. AUD_2 sería un adyuvante

alternativo para la vacunación sin agujas y sin dolor, en reemplazo de la inyección intramuscular convencional.

3.6 Referencias

Abels, C., & Proksch, E. (2006). Therapie des atopischen EkzemsTherapy of atopic dermatitis. *Der Hautarzt, 57*(8), 711-725.

Adams, S., O'Neill, D. W., Nonaka, D. et al., (2008). Immunization of malignant melanoma patients with full-length NY-ESO-1 protein using TLR7 agonist imiquimod as vaccine adjuvant. *The Journal of Immunology, 181*(1), 776-784.

Altube, M. J., Selzer, S. M., de Farias, M. A. et al., (2016). Surviving nebulization-induced stress: dexamethasone in pH-sensitive archaeosomes. Nanomedicine, 11(16), 2103-2117.

Altube, M. J., Cutro, A., Bakas, L. et al., (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.

Arnold, R. (2017). Microbial Control. *Microreviews in Cell and Molecular Biology, 1*(2).

Bal, S. M., Ding, Z., van Riet, E. et al., (2010). Advances in transcutaneous vaccine delivery: do all ways lead to Rome? *Journal of Controlled Release, 148*(3), 266-282.

Böttcher, C., & Pries, C. (1961). A rapid and sensitive sub-micro phosphorus determination. *Analytica Chimica Acta, 24*, 203-204.

Boyum, A. (1968). Separation of leukocytes from blood and bone marrow. *Scand. J. clin. lab. Invest., 21*, 77.

Brewer, J., Bloksgaard, M., Kubiak, J. et al., (2013). Spatially resolved two-color diffusion measurements in human skin applied to transdermal liposome penetration. *Journal of investigative dermatology, 133*(5), 1260-1268.

Caimi, A. T., Parra, F., de Farias, M. A. et al., (2017). Topical vaccination with super-stable ready to use nanovesicles. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 152*, 114-123.

Carrer, D. C., Higa, L. H., Tesoriero, M. V. D. et al., (2014). Structural features of ultradeformable archaeosomes for topical delivery of ovalbumin. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 121*, 281-289.

Castell, J. V., & Gmez-Lechn, M. J. (1996). *In vitro methods in pharmaceutical research*: Elsevier.

Celia, C., Cilurzo, F., Trapasso, E. et al., (2012). Ethosomes® and transfersomes® containing linoleic acid: physicochemical and technological features of topical drug delivery carriers for the potential treatment of melasma disorders. *Biomedical microdevices, 14*(1), 119-130.

Cevc, G. (2004). Lipid vesicles and other colloids as drug carriers on the skin. *Advanced drug delivery reviews, 56*(5), 675-711.

Chollet, J. L., Jozwiakowski, M. J., Phares, K. R. et al., (1999). Development of a topically active imiquimod formulation. *Pharmaceutical development and technology, 4*(1), 35-43.

de Janeway, I. (2008). K Murphy, P. Travers, M. Walport.

De Meyer, I., Martinet, W., Schrijvers, D. M. et al., (2012). Toll-like receptor 7 stimulation by imiquimod induces macrophage autophagy and inflammation in atherosclerotic plaques. *Basic research in cardiology, 107*(3), 269.

Duangjit, S., Pamornpathomkul, B., Opanasopit, P. et al., (2014). Role of the charge, carbon chain length, and content of surfactant on the skin penetration of meloxicam-loaded liposomes. *International journal of nanomedicine, 9*, 2005.

Elsayed, M. M., Abdallah, O. Y., Naggar, V. F. et al., (2006). Deformable liposomes and ethosomes: mechanism of enhanced skin delivery. *International journal of pharmaceutics, 322*(1-2), 60-66.

Feyerabend, S., Stevanovic, S., Gouttefangeas, C. et al., (2009). Novel multi-peptide vaccination in Hla-A2+ hormone sensitive patients with biochemical relapse of prostate cancer. *The Prostate, 69*(9), 917-927.

Goebel, A. S., Knie, U., Abels, C. et al., (2010). Dermal targeting using colloidal carrier systems with linoleic acid. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, 75*(2), 162-172.

Gogoll, K., Stein, P., Lee, K. . et al., (2016). Solid nanoemulsion as antigen and immunopotentiator carrier for transcutaneous immunization. *Cellular immunology, 308*, 35-43.

Hąc-Wydro, K., Jędrzejek, K., & Dynarowicz-Łątka, P. (2009). Effect of saturation degree on the interactions between fatty acids and phosphatidylcholines in binary and ternary Langmuir monolayers. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 72*(1), 101-111.

Hansen, H. S., & Jensen, B. (1985). Essential function of linoleic acid esterified in acylglucosylceramide and acylceramide in maintaining the epidermal water permeability barrier. Evidence from feeding studies with oleate, linoleate, arachidonate, columbinate and α-linolenate. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Lipids and Lipid Metabolism, 834*(3), 357-363.

Hickling, J., Jones, K., Friede, M. et al., (2011). Intradermal delivery of vaccines: potential benefits and current challenges. *Bulletin of the World Health Organization, 89*, 221-226.

Higa, L. H., Arnal, L., Vermeulen, M. et al., (2016). Ultradeformable archaeosomes for needle free nanovaccination with Leishmania braziliensis antigens. *PloS one, 11*(3), e0150185.

Higa, L. H., Schilrreff, P., Perez, A. P. et al., (2012). Ultradeformable archaeosomes as new topical adjuvants. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine, 8*(8), 1319-1328.

Jewell, C., Cusack, S., & Cashman, K. (2005). The effect of conjugated linoleic acid on transepithelial calcium transport and mediators of paracellular permeability in human intestinal-like Caco-2 cells. *Prostaglandins, leukotrienes and essential fatty acids, 72*(3), 163-171.

Jose Morilla, M., & Lilia Romero, E. (2016). Carrier deformability in drug delivery. *Current pharmaceutical design, 22*(9), 1118-1134.

Kirschner, N., & Brandner, J. M. (2012). Barriers and more: functions of tight junction proteins in the skin. *Annals of the New York Academy of Sciences, 1257*(1), 158-166.

Leekumjorn, S., Cho, H. J., Wu, Y. et al., (2009). The role of fatty acid unsaturation in minimizing biophysical changes on the structure and local effects of bilayer membranes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes, 1788*(7), 1508-1516.

Lopez, P. A., Denny, M., Hartmann, A.-K. et al., (2017). Transcutaneous immunization with a novel imiquimod nanoemulsion induces superior T cell responses and virus protection. *Journal of dermatological science, 87*(3), 252-259.

Ma, M., Wang, J., Guo, F. et al., (2015). Development of nanovesicular systems for dermal imiquimod delivery: physicochemical characterization and in vitro/in vivo evaluation. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine, 26*(6), 192.

Meyer, T., Nindl, I., Schmook, T. et al., (2003). Induction of apoptosis by Toll-like receptor-7 agonist in tissue cultures. *British Journal of Dermatology, 149*, 9-13.

Negrini, R., & Mezzenga, R. . et al., (2011). pH-responsive lyotropic liquid crystals for controlled drug delivery. *Langmuir, 27*(9), 5296-5303.

Ntimenou, V., Fahr, A., & Antimisiaris, S. G. (2012). Elastic vesicles for transdermal drug delivery of hydrophilic drugs: a comparison of important physicochemical characteristics of different vesicle types. *Journal of biomedical nanotechnology, 8*(4), 613-623.

Parra, F., Caimi, A. T., Altube, M. J. . et al., (2018). MULTIEFFECTOR VESICLES (MUVE): the adjuvancy of imiquimod trapped in archaeosomes. *Nanomedicine, Future Medicine*.

Parra, F. L., Caimi, A. T., Altube, M. J. et al., (2018). Make It Simple: (SR-A1+TLR7) Macrophage Targeted NANOarchaeosomes. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology, 6*(163). doi: 10.3389/fbioe.2018.00163

Proksch, E., Holleran, W., Menon, G. K. et al., (1993). Barrier function regulates epidermal lipid and DNA synthesis. *British Journal of Dermatology, 128*(5), 473-482.

Rechtsteiner, G., Warger, T., Osterloh, P. et al., (2005). Cutting edge: priming of CTL by transcutaneous peptide immunization with imiquimod. *The Journal of Immunology, 174*(5), 2476-2480.

Rogerson, M. L., Robinson, B. H., Bucak, S. et al., (2006). Kinetic studies of the interaction of fatty acids with phosphatidylcholine vesicles (liposomes). *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 48*(1), 24-34.

Schön, M., & Schön, M. (2007). Imiquimod: mode of action. *British Journal of Dermatology, 157*(s2), 8-13.

Schön, M. 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.

Stanley, M. (2002). Imiquimod and the imidazoquinolones: mechanism of action and therapeutic potential. *Clinical and experimental dermatology, 27*(7), 571-577.

Stein, P., Gogoll, K., Tenzer, S . et al., (2014). Efficacy of Imiquimod-Based Transcutaneous Immunization Using a Nano-Dispersed.

Stein, P., Rechtsteiner, G., Warger, T. et al., (2011). UV exposure boosts transcutaneous immunization and improves tumor immunity: cytotoxic T-cell priming through the skin. *Journal of Investigative Dermatology, 131*(1), 211-219.

Telò, I., Pescina, S., Padula, C. et al., (2016). Mechanisms of imiquimod skin penetration. *International journal of pharmaceutics, 511*(1), 516-523.

van Meerloo, Johan, Kaspers, Gertjan JL. et al., (2011). Cell sensitivity assays: the MTT assay Cancer cell culture (pp. 237-245): Springer. Vidal, D., & Alomar, A. (2008). Mode of action and clinical use of imiquimod. *Expert Review of Dermatology, 3*(2), 151-159.

Wagner, H., Kostka, K.-H., Lehr, C.-M. et al., (2000). Drug distribution in human skin using two different in vitro test systems: comparison with in vivo data. *Pharmaceutical research, 17*(12), 1475-1481.

Walter, A., Schäfer, M., Cecconi, V. et al., (2013). Aldara activates TLR7-independent immune defence. *Nature communications, 4*, 1560.

Wang, N., Wang, T., Zhang, M. et al., (2014). Mannose derivative and lipid A dually decorated cationic liposomes as an effective cold chain free oral mucosal vaccine adjuvant-delivery system. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, 88*(1), 194-206.

Warger, T., Rechtsteiner, G., Schmid, B. et al., (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 & immunology, 32*(1), 57-65.

CAPITULO 4

VACUNACIÓN TÓPICA CONTRA INFLUENZA EMPLEANDO ARQUEOSOMAS ULTRADEFOMABLES CON IMIQUIMOD

Los resultados mostrados en este Capítulo forman parte de la siguiente publicación y presentaciones a Congresos:

"Novel imiquimod nanovesicles for topical vaccination". **Ayelen Tatiana Caimi**, María Julia Altube, Marcelo Alexandre de Farias, Rodrigo Villares Portugal, Ana Paula Perez, Eder Lilia Romero, Maria Jose Morilla. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 174, 536-543. doi.org/10.1016/j.colsurfb.2018.11.031. (Impact factor: 3.997)

"*Vacunación tópica contra Influenza, utilizando nanovesículas super-estabes y listas para usar*." **Caimi A**.; Parra F.; De Farias M.; Villares Portugal R.; Perez AP.;Romero EL.; Morilla MJ. Taller de Vacunología - Segunda Edición. CONICET-CCT. Presentación de póster. (2016)

4.1 Introducción

La influenza representa una problemática para todos los sistemas de salud, siendo la gripe estacional, la de origen zoonótica y la pandémica, amenazas globales constantes (World Health Organization, 2014). Los síntomas más comunes de la gripe incluyen escalofríos, fiebre, dolor muscular, dolor de cabeza, fatiga, rinitis y tos. La progresión de la infección puede generar complicaciones más severas como bronquitis, neumonía, infecciones bacterianas secundarias, distrés agudo respiratorio y complicaciones cardiovasculares que pueden llevar a la muerte si no son tratadas. Los individuos con un sistema inmune débil como los pacientes inmunocomprometidos, los ancianos y los niños, son particularmente vulnerables a la infección con influenza (Soema et al., 2015). De acuerdo con los datos de la Organización Mundial de la Salud, se estima que mundialmente cada año se manifiestan alrededor de 3-5 millones de casos severos de esta enfermedad con muerte en 250.000 a 500.000 pacientes, número que aumenta significativamente durante los períodos de pandemia (World Health Organization, 2014). La remergencia de la cepa pandémica H1N1 en 2009 y la emergencia de la cepa aviar altamente patogénica H5N1 y H7N9 (Writing Committee of the World Health Organization, 2005; Chen et al., 2013) han reafirmado que la influenza es aún una amenaza global.

Los virus de la influenza son los únicos miembros de la familia Orthomyxoviridae y están clasificados en tres serotipos diferentes, A, B y C, según su expresión de la proteína de matriz (M1), la proteína de membrana (M2) y la nucleoproteína (NP). Los tres serotipos infectan a los humanos, aunque A y B son los tipos circulantes más comunes. El virus de la influenza (Figura 4.1) contiene un ARN lineal monocatenario (ssARN) antisentido, con un genoma segmentado en 7 u 8 fragmentos (género C y géneros A y B, respectivamente). Esta característica del genoma permite que se manifiesten cambios genómicos por deriva genética y/o cambio genético. La deriva genética implica cambios menores debidos a la mutación en los genes que codifican las glicoproteínas de superficie hemaglutinina (HA) y neuraminidasa (NA), lo que altera la antigenicidad viral. Ambas proteínas reconocen la misma molécula de la célula huésped, el ácido siálico ubicado en la membrana celular. La HA reconoce al receptor celular (residuos de ácido siálico), permitiendo la entrada del virus y, por

lo tanto, es la responsable de su patogenicidad. La hemaglutinina HA es una glicoproteína muy inmunogénica, los anticuerpos específicos que se generan en el hospedador neutralizan el reconocimiento de los receptores a nivel celular. La NA es una enzima que degrada residuos de ácido siálico y por ende es indispensable para la liberación del virus de las células infectadas, los anticuerpos contra NA jugarían un papel importante en el control de la infección (Wagner et al., 2002).

Los cambios genómicos son suficientes para permitir infecciones en individuos con inmunidad a virus similares y explica los brotes regulares de la influenza estacional. Los cambios genéticos son cambios importantes como resultado de la redistribución de segmentos genómicos de diferentes cepas humanas y/o animales. En este contexto, se puede encontrar poca inmunidad preexistente al virus en las poblaciones humanas, lo que podría dar lugar a pandemias graves (Jalilian et al., 2013).

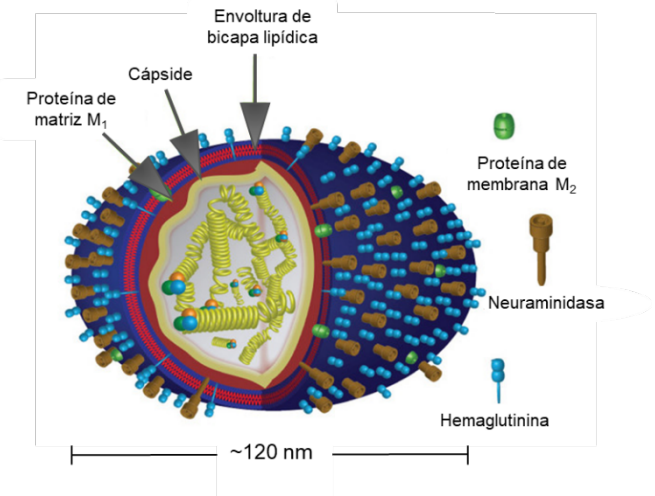


Figura 4.1 Arquitectura del virus de influenza (Arnold, 2017). El diámetro aproximado del virión es de 120 nm, influenciado por la organización del ARN por los complejos de ribonucleoproteínas múltiples ubicados en el centro, rodeados por la cápside y la capa de proteína de la matriz M1 (Harris et al., 2006)

4.1.1 Vacunas contra influenza

La vacunación es el método con la mejor relación costo-eficiencia para prevenir la infección con influenza. La disponibilidad rápida de vacunas para la población mundial es un factor clave para proteger a la población contra la enfermedad estacional y pandémica (Monto et al., 2000). Sin embargo, debido a

la variación antigénica en las glicoproteínas virales y la duración limitada de la inmunidad, se requiere una vacunación anual para mantener la inmunidad protectora. Adicionalmente, en poblaciones en riesgo como niños pequeños, adultos mayores y pacientes inmunocomprometidos, la eficacia de la vacunación es muy limitada (Fiore et al., 2010), ya que en los niños la respuesta inmune montada es reducida y los adultos mayores presentan una baja inmunogenicidad debido a la inmunosenescencia (Pearton et al., 2010).

La inmunidad específica a la influenza se asocia con una respuesta inmune sistémica (anticuerpos de inhibición de la hemaglutinación sérica), con una respuesta inmune local respiratoria (anticuerpos IgA e IgG específicos en el lavado nasal) y con la respuesta inmune mediada por células. Las vacunas trivalentes actuales (dos cepas de la influenza A y una cepa de la influenza B) administradas contra la influenza estacional son de tres tipos. Por un lado, se encuentran las vacunas inactivadas, preparadas a partir de un virus inactivado completo (VIC), de un virus fraccionado que conserva HA y NA (vacuna *Split*), de subunidades virales o de virosomas, todas ellas diferentes en su organización estructural o en sus componentes virales (Soema et al., 2015) (Figura 4.2). Las vacunas VIC fueron las primeras en usarse en campañas anuales de vacunación contra influenza, pero fueron rápidamente reemplazadas por las vacunas *Split,* debido a los efectos adversos locales y sistémicos generados por la presencia de impurezas tales como proteína de huevo (al-Mazrou et al., 1991). Las vacunas *Split* se preparan a partir de virus desensamblados utilizando éter dietílico o detergentes (Soema et al., 2015). Si bien la vacuna aún contiene todas las proteínas virales, la organización original de las partículas virales y el ssARN se pierden, eliminándose también parte de la inmunogenicidad inherente del virus (Geeraedts et al., 2008). Actualmente, las vacunas *Split* se utilizan en las formulaciones de vacunas trivalentes, debido a su relativa facilidad de producción. Las vacunas de subunidades se preparan con los antígenos HA y NA, separados de la nucleocápside viral. Estas vacunas requieren la administración conjunta de un adyuvante para alcanzar una inmunogenicidad adecuada. Los virosomas (ensamblado controlado de partículas tipo virales en liposomas a partir de HA y NA) son vesículas compuestas por una bicapa de fosfolípidos con HA y NA incorporados, de modo tal que pueden unirse a las células huésped del virus e inducir una respuesta inmune (Jalilian et al., 2013).

Actualmente, la vacuna comercial Inflexal® contra la influenza a base de virosomas, está aprobada como vacuna para la inmunización contra la influenza en 38 países con licencia para todas las edades (Herzog et al., 2009). Se ha demostrado que esta vacuna es eficaz con propiedades adyuvantes únicas (Immordino et al., 2006).

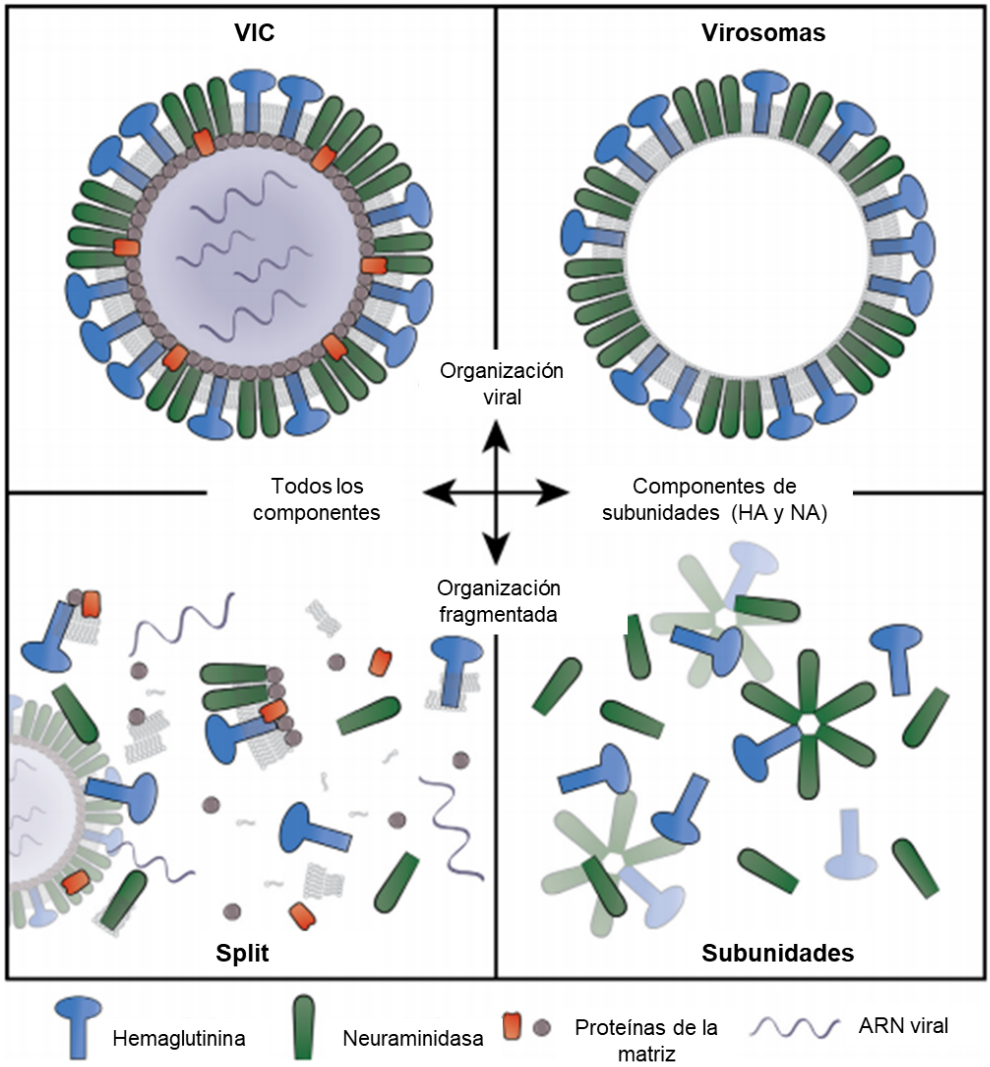


Figura 4.2 Composición de las vacunas antigripales inactivadas. Las cuatro composiciones de la vacuna contra la influenza difieren en los componentes del antígeno y la organización estructural. Estas diferencias también tienen un impacto en la inmunogenicidad de la vacuna (Imagen adaptada de Soema et al, 2015)

Además de las vacunas inactivadas contra influenza, también hay vacunas de virus atenuado (VA). Su administración intranasal imita la vía natural de infección de la gripe, lo que da como resultado una respuesta inmune localizada de la mucosa en el lugar de la infección (Barría et al., 2012). A diferencia de las vacunas inactivadas, VA induce fuertes respuestas de IgA en la

mucosa y respuestas inmunitarias mediadas por células, que son efectivas para prevenir la infección por influenza (Carter & Curran, 2011). Sin embargo, dos preocupaciones están relacionadas con este tipo de vacunas: por un lado, el virus puede teóricamente experimentar una reversión genética en una cepa de influenza patógena y transmisible, aunque este evento aún no se ha probado. Por otro lado, causó sibilancias en bebés menores de 2 años. Por éste motivo, VA sólo está aprobada para su uso en niños y adultos entre 2 y 49 años de edad, no considerados pacientes de riesgo (Soema et al., 2015).

En los últimos años, se ha puesto más énfasis en la inclusión de una segunda cepa de influenza B en la vacuna contra la influenza de temporada. Dos linajes distintos de influenza B han estado circulando desde 1985, disminuyendo así la eficacia de las vacunas trivalentes, que solo incluyen una cepa de influenza B (Ambrose & Levin, 2012). La primera vacuna tetravalente (una fórmula VA) entró en el mercado en 2012, y varias otras formulaciones tetravalentes basadas en formulaciones de VIC han sido autorizadas desde entonces (Soema et al., 2015).

En los últimos años, se estudiaron diferentes estrategias para mejorar la inmunogenicidad frente a la influenza estacional en los grupos poblacionales en los que se manifiesta un número reducido de células de Langerhans, disminución de la capacidad de presentar antígenos de las células dendríticas, y una expresión reducida de TLR y moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (Panda et al., 2010; Song et al., 2010; Van Damme et al., 2009). Por un lado, dichas estrategias consisten en la adición de adyuvantes y, por otro lado, la utilización de una ruta de administración alternativa, como la tópica.

4.1.2. Adyuvantes utilizados en vacunas contra influenza

Muchas de las vacunas contra influenza están formuladas con adyuvantes que son capaces de mejorar las respuestas inmunes humorales y celulares simultáneamente (Vogel, et al., 2000). Varios enfoques experimentales respaldan claramente que la mejora de la eficacia del adyuvante puede ser una vía importante para obtener una mejor protección de las vacunas contra la

influenza o reducir la dosis necesaria para obtener una protección suficiente (Jalilian et al., 2013).

Entre los adyuvantes que han obtenido licencia en la Unión Europea (Tabla 4.1), las sales de aluminio, las emulsiones de aceite en agua (como MF59), los agonistas de TLR4 adsorbidos en alumbre (como, el sistema de adyuvantes AS04) y liposomas (como Inflexal®), son los más utilizados en vacunas contra la influenza (Mbow et al., 2010). La lista de adyuvantes con licencia en los Estados Unidos es aún más restringida e incluye solo sales de aluminio y AS04 (Rappuoli et al., 2011) (Tabla 4.1).

Las sales de aluminio se usan ampliamente como adyuvantes y se incluyen en las vacunas contra virus de influenza, entre otros. La mayoría de las sales de aluminio utilizadas en seres humanos son insolubles en agua y forman partículas dispersas en tamaño (Tabla 4.1). Ciertos estudios han demostrado la superioridad de las vacunas adsorbidas con hidróxido de aluminio en comparación con adyuvantes solubles (Gupta & Siber, 1994). Sin embargo, las sales de aluminio son ineficaces para proporcionar inmunidad contra patógenos que requieren inmunidad mediada por Th1 (Didierlaurent et al., 2009; Kuroda et al., 2013). Con respecto a la seguridad, las sales de aluminio han estado disponibles comercialmente durante varias décadas (Brewer, 2006), y en general se consideran bien toleradas (Edelman, 1980). Sin embargo, la evidencia experimental sugiere que la formación de complejos de iones Al^{3+} con glucosa-6-fosfato puede interferir con el metabolismo energético de manera que se podrían producir trastornos neuronales o síndromes inflamatorios debido a las altas concentraciones de aluminio resultantes (Shoenfeld & Agmon-Levin, 2011).

Las emulsiones de aceite en agua basadas en escualeno, como MF59, están autorizadas en la mayor parte de Europa para ser utilizadas en vacunas contra la influenza estacional, principalmente en personas mayores (Jalilian et al., 2013). MF59 presumiblemente actúa induciendo un entorno inmunoestimulador local en el lugar de la inyección. Esto se caracteriza por una mayor persistencia del antígeno, una mayor captación de antígeno por CDs y el reclutamiento de CPA (Dupuis et al., 1998; O'Hagan et al., 2012). Estas emulsiones inducen respuestas de anticuerpos más fuertes, lo que reduce la necesidad de dosis múltiples y conduce a una respuesta combinada de memoria

Th1 y Th2 (O'Hagan et al., 1995). Sin embargo, la administración de escualeno se ha asociado con el desarrollo de artritis en ratas (Carlson et al., 2000). Además, se sugirió que la aplicación de la vacuna contra la influenza H1N1 Pandemrix, que contiene escualeno, indujo el desarrollo de narcolepsia en niños (Nohynek et al., 2012; Partinen et al., 2012), un trastorno que afecta al sistema inmunitario (Mahlios et al., 2013).

Tabla 4.1 Diámetros aproximados y constituyentes químicos de los adyuvantes utilizados en humanos para la vacunación profiláctica contra infecciones virales.

Nombre adyuvante (Proveedor; año de licencia)	Tamaño de partícula (nm)	Tipo de adyuvante	Componentes químicos	Vacunas (virus)
Sal de aluminio (Varios; 1924)	1000-20000	Sal mineral	Hidroxifosfato de aluminio, hidroxisulfato de aluminio o hidróxido de aluminio	Varias
MF59 (Novartis; 1997)	160	Emulsión aceite en agua	Escualeno, polisorbato 80, trioleato de sorbitán	Fluad (influenza estacional), Focetria (influenza pandémica), Aflunov (influenza pre-pandémica)
AS03 (GlaxoSmithKline; 2005)	< 200	Emulsión aceite en agua	Escualeno, polisorbato 80, α-tocoferol	Pandemrix (influenza pandémica), Prepandrix (influenza pre-pandémica)
Virosomas (Berna Biotech; 2000)	100-200	Liposomas	Envoltura lipídica del virus de influenza	Inflexal (influenza estacional),
AS04 (GlaxoSmithKline; 2005)	1000-20000	Agonista de TLR4 adsorbido en alumbre	Oxihidróxido de aluminio	Fendrix (hepatitis A), Cervarix (virus del papiloma humano)

Otras vacunas utilizan una nueva clase de adyuvantes (AS04), que combinan hidróxido de aluminio y una forma patentada de monofosforil lípido A (MPL). MPL deriva de la bacteria Gram negativa *Salmonella minnesota* R595, y es un agonista específico de TLR4, comparable al lipopolisacárido (Evans et al., 2003; Hirschfeld et al., 2000; Martin et al., 2003; Tapping et al., 2000). AS04 dirige una respuesta Th1 polarizada, a diferencia de la respuesta Th2 de la sal de aluminio sola. Si bien la actividad adyuvante de esta formulación puede atribuirse principalmente al MPL, se sugirió que el "efecto de depósito" del aluminio prolonga el efecto del MPL (Coffman et al., 2010; Didierlaurent et al.,

2009). Sin embargo, estudios llevados a cabo por Yang, et al. demostraron que adyuvantes basados en aluminio, resultaron efectivos en adultos saludables, pero poco eficientes en ancianos (Yang et al., 2013).

Finalmente, los virosomas también poseen actividad adyuvante. Como se mencionó antes, están formados por las proteínas HA y NA que se encuentran incluidas tanto en la membrana como en el interior acuoso de liposomas. Los antígenos anclados a la superficie se degradan dentro del endosoma y, por consiguiente, son presentados al sistema inmunitario mediante el complejo MHC II para generar celular T *helpers*. En contraste, los antígenos encapsulados dentro de los virosomas se transportan al citosol durante el evento de fusión del virosoma con el lisosoma, desencadenado por la actividad fusogénica pH-dependiente de HA, lo que les permite ingresar a la ruta de presentación de antígenos del complejo MHC I para la inducción de linfocitos T citotóxicos (Jalilian et al., 2013). Por lo tanto, los virosomas poseen la capacidad de mediar tanto las respuestas inmunes humorales como celulares (Chen & Huang, 2005; Daemen et al., 2005).

4.1.3 Nueva generación vacunas contra influenza: nuevos adyuvantes y administración tópica

A pesar de las ventajas mencionadas, las vacunas que incluyen los adyuvantes descriptos tienen una eficacia general de alrededor del 70% (Osterholm et al., 2012). Recientemente, se han empleado estrategias para mejorar la inmunogenicidad de las vacunas tales como la administración de nuevos adyuvantes capaces de interactuar con los receptores de patrones (PRR) en el sistema inmunitario innato. Estos PRR incluyen los receptores tipo Toll (TLR), los receptores tipo I inducibles por el ácido retinoico y los receptores tipo NOD (Demento et al., 2009; Kasturi et al., 2011; Pashine et al., 2005). El reconocimiento de patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs) promueve la activación de las respuestas inmunes innatas contra el patógeno invasor (Melchjorsen, 2013), proceso crítico para la inducción posterior de una respuesta inmune adaptativa más efectiva (Heer et al., 2007; Iwasaki & Medzhitov, 2004; Randhawa et al., 2011).

Existen al menos 10 tipos de TLR presentes en los seres humanos (Lim & Staudt, 2013; Lund et al., 2004; Welte et al., 2009). Su ligando natural es una molécula de ssARN presente en el genoma viral o producida durante la replicación del virus (Lim & Staudt, 2013; Lund et al., 2004; Welte et al., 2009). En particular la activación de TLR7 induce la maduración de células presentadoras de antígenos como las CDs y la expresión de moléculas coestimuladoras (Kaminski et al., 2012; Mouries et al., 2008; Rajagopal et al., 2010) y de citoquinas proinflamatorias (Koyama et al., 2007; Welte et al., 2009). El papel de TLR7 en la inducción de la respuesta inmune adaptativa también se ha demostrado al mejorar la diferenciación de células B productoras de anticuerpos (Boeglin et al., 2011), facilitar el tipo de respuesta según su perfil de isotipos (Heer et al., 2007) y aumentar la memoria de células B a largo plazo (Kasturi et al., 2011). TLR7 también juega un papel importante tanto en la infección del virus de la gripe como en la vacunación (Kaminski et al., 2012; Koyama et al., 2007; Schmitz et al., 2012). Geeraedts et al., demostró que la vacuna contra la influenza VIC tuvo mejor inmunogenicidad que la vacuna *Split* debido a la activación de TLR7 por el genoma viral presente en la vacuna (Geeraedts et al., 2008). El aumento de la inmunogenicidad de la vacuna mediante la incorporación de un agonista TLR7 sintético también se ha demostrado en los estudios de vacunas con virus de inmunodeficiencia humana (VIH) (Wille-Reece et al., 2005), virus del papiloma humano (VPH) (Stern et al., 2012) y malaria (Othoro et al., 2009). La razón para usar un agonista de TLR7 como un adyuvante de vacuna es desencadenar la activación y maduración de las células dendríticas (Gibson et al., 2002; Russo et al., 2011), que efectivamente unen las respuestas inmunes innatas y adaptativas.

Como se mencionó en el **Capítulo 3**, IMQ es un agonista de TLR7. Estudios previos han respaldado fuertemente el efecto inmunoestimulante local del IMQ en modelos animales contra influenza (Schön & Schön, 2007). Se ha demostrado que el suministro de IMQ en microagujas junto con subunidades de influenza mejora la inmunogenicidad de la vacuna contra el virus de la gripe en un modelo murino (Schön & Schön, 2007; Weldon et al., 2012; Zhang et al., 2014) y de otras infecciones incluyendo el VIH (Zuber et al., 2004), el VPH (Chen et al., 2010) y la malaria (Othoro et al., 2009). Adicionalmente, se ha demostrado que el tratamiento con Aldara (IMQ tópico) previo a una administración

intradérmica de una vacuna de influenza trivalente en adultos mayores promueve una respuesta significativamente acelerada, con inmunogenicidad aumentada y prolongada (Hung et al., 2012). Weldon et al demostró que la administración tópica de IMQ con una vacuna de subunidad H1N1 de influenza monovalente utilizando microagujas indujo aumentos significativos en la secreción de IgG2a y anticuerpos funcionales. Además, la vacuna dio lugar a una mayor liberación de IFN-γ en comparación con ratones inmunizados con la vacuna de la subunidad sin el inmunomodulador. Finalmente investigaciones adicionales del grupo de Weldon sobre las respuestas inmunitarias protectoras indicaron que la vacuna de subunidad utilizando microagujas con IMQ mejoró la resistencia al desafío letal en comparación con la vacuna sin IMQ (Weldon et al., 2012).

Debido a los frecuentes cambios genéticos en el virus de la influenza y la amenaza continua de una pandemia el desarrollo de una vacuna efectiva, masiva y compatible con el antígeno es una tarea difícil (Carrat & Flahault, 2007; Cheng et al., 2012; To et al., 2013). El virus A (H1N1) se propagó globalmente en 2 meses debido a la falta de inmunidad en la población general (Hancock et al., 2009).

En este contexto, el objetivo de este capítulo fue evaluar la actividad adyuvante de los arqueosomas ultradeformables con IMQ (AUD_2) aplicado tópicamente combinados con una vacuna comercial trivalente contra influenza.

4.2 Materiales y Métodos

4.2.1 Materiales

Los reactivos fueron los mismos descriptos en el **Capítulo 3**. En particular, la vacuna comercial *Split* NILGRIP® (marca registrada en la República Argentina del producto FLUVAX® elaborado por CSL LIMITED) se adquirió en Soy Farmacia.

4.2.2 Crecimiento de arquebacterias, extracción y caracterización de lípidos polares totales

Arqueobacterias *H. tebenquichense* fueron crecidas en un biorreactor casero de acero inoxidable y cosechadas luego de 96 h de crecimiento de acuerdo con lo descripto en el **Capítulo 2, sección 2.2.2**. Los APT se extrajeron de la biomasa y su composición se caracterizó rutinariamente tal como se describió en ese capítulo.

4.2.3 Preparación y caracterización de nanovesículas ultradeformables

AUD*, AUD_1 y AUD_2 fueron preparadas mediante el método de hidratación de la película lipídica tal como se describió en los **Capítulo 3, sección 3.3.2.2.** La cuantificación de fosfolípidos se realizó mediante el microensayo colorimétrico de fosfato, tal como se describe en el **Capítulo 2, sección 2.3.2.1.1 c.** La cuantificación de IMQ se realizó por medición de absorbancia a 305 nm, como se describió en el **Capítulo 3, sección 3.3.2.3.1.** Finalmente, el tamaño y el potencial de Zeta se determinaron mediante DLS y PALS, tal como se describió en el **Capítulo 2, sección 2.3.2.1.1 b**

4.2.4 Inmunización

4.2.4.1 Animales y esquema de inmunización

Ratones Balb/c machos de 4-6 semanas de edad se obtuvieron de la Facultad de Ciencias Veterinarias (UNLP). Se alojaron 5 ratones por jaula y se mantuvieron en una habitación ventilada en condiciones controladas a temperatura ambiente constante de 22 ºC, con un ciclo de luz-oscuridad de 12/12 horas y acceso libre a comida y agua. Todos los procedimientos se llevaron a cabo de acuerdo con los lineamientos institucionales y fueron aprobados por CICUAL.

5 grupos de ratones fueron inmunizados con 3 µg de hemaglutinina (HA) presentes en 34 µl de la vacuna comercial Nilgrip® sin adyuvantes (Season 2011 Southern hemisphere) (0,5 ml contienen: 15 µg HA de la cepa

A/California/7/2009 (H1N1); 15 μg HA de la cepa A/Victoria/210/2009 (A/Perth/16/2009 (H3N2)) y 15 μg HA de la cepa B/Brisbane/60/2008) de la siguiente manera: i. AUD* mezclado con HA, ii. AUD+IMQ mezclado con HA, iii. AUD_1 mezclado con HA, iv. AUD_2 mezclado con HA y v. IMQ mezclado con HA. La forma de administración coincidió con la descripta en capítulos anteriores. Brevemente, a los ratones se les recortó el cabello manualmente y se aplicaron las nanovesículas sobre la superficie de la piel posterior intacta de cada ratón, en un área de 2 cm^2. Para estudiar el efecto sobre el sito de aplicación de la vacuna, un grupo fue inmunizado con AUD_2 mezclado con HA en la axila previamente desprovista de pelo. Los ratones se mantuvieron en jaulas individuales durante 30 minutos hasta que las gotas se secaron. Las aplicaciones se realizaron una vez a la semana durante cuatro semanas (*prime*), luego los animales recibieron un refuerzo el día 42 (*boost*). Cada dosis consistió en 600 µg de fosfolípidos y 150-200 µg de IMQ por ratón. Un grupo de animales fue administrado subcutáneamente con 34 µl de la vacuna comercial los días 0 y 21.

4.2.5 Determinación de la repuesta inmunológica

4.2.5.1 Determinación de IgG totales e isotipos IgG1 e IgG2a

Se colectaron muestras de sangre el día 35 (post-*prime*) y el día 56 (post-*boost*) a partir de la vena de la cola y se analizaron los anticuerpos IgG total y los isotipos IgG1 e IgG2a mediante ELISA, como se describió en el **Capítulo 2, sección 2.2.11.2**

4.2.5.2 Respuesta celular

El día 35 y el día 56, los ratones se sacrificaron y se obtuvieron los esplenocitos empleando un gradiente de Ficoll-Hypaque como se describió en el **Capítulo 3, sección 3.2.9.2**. Las células sembradas en la placa de 96 wells se re-estimularon con HA (10 µg/ml) o con concanavalina A (5 µg/ml) como control positivo. Después de 48 h de incubación, la placa se centrifugó a 350 x g durante 4 min, el sobrenadante se recogió cuidadosamente y se almacenó a -20 °C para el posterior ensayo de citoquinas. Luego, se realizó el ensayo de MTT y se calculó el índice de estimulación (IE) como se describió en el **Capítulo 3, sección 3.2.9.2** .

La liberación de IFN-γ en el sobrenadante de las células se midió por ELISA siguiendo las instrucciones del fabricante. Las medidas de absorbancia se realizaron a 450 nm en un lector de microplacas. Los títulos INF-γ se normalizaron según el IE de los esplenocitos, de acuerdo con la ecuación descripta en la misma sección mencionada arriba.

4.2.5.3 Determinación de la reacción de hipersensibilidad retardada (DTH)

La respuesta de hipersensibilidad retardada (DTH, *Delayed Type Hypersensibility reaction*) generada en los animales inmunizados se analizó 60 días después del *boost* en 2 ratones por grupo de acuerdo a Luo and Dorf, 2003. Brevemente, se inyectaron 3 µg de HA (30 µl) intradérmicamente en una de las extremidades traseras de los ratones. Como control basal de inflamación, la otra extremidad trasera fue inyectada con 30 µl de PBS. El grosor de las almohadillas inyectadas se midió a las 72 h, utilizando un calibre. Las respuestas DTH específicas a HA en cada animal se determinaron como el grosor de la almohadilla inyectada menos la hinchazón basal promedio.

4.2.6 Análisis estadístico

Los resultados se analizaron usando t-test independiente de dos muestras, análisis de varianza de 2 factores (ANOVA) seguido del test de Sidak, o análisis de varianza de un factor seguido del test de Dunnet, usando el software GraphPad Prism 4.01. Las diferencias se consideraron significativas para un valor de $*p < 0.05$; $**p < 0.001$; $***p < 0.001$; $****p < 0.0001$.

4.3 Resultados

4.3.1 Determinación de IgG total e isotipos

En este capítulo medimos el efecto del IMQ sobre la respuesta inmune sistémica tras la aplicación tópica de AUD*, AUD_1 y AUD_2 mezclado con una vacuna estacional comercial trivalente (HA). Se buscó evaluar dos aspectos diferentes: i) la actividad del inmunomodulador IMQ como adyuvante, para lo que se observó si hay inducción de variaciones en el tipo y/o magnitud de la respuesta obtenida y ii) la *performance* de la administración tópica con respecto a la administración parenteral de la vacuna comercial.

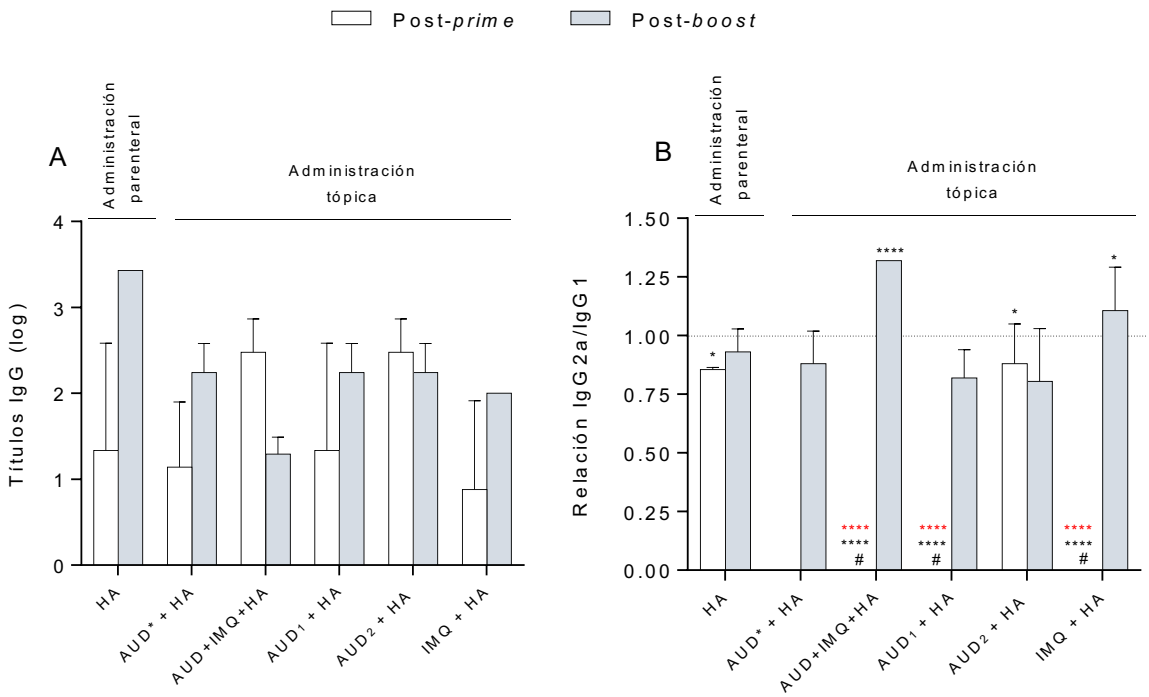


Figura 4.3 Respuesta inmune sistémica tras la aplicación tópica de nanovesículas mezcladas con HA y la aplicación subcutánea de la vacuna comercial. (A) Títulos de IgG en suero post-*prime* y post-*boost*. (B) Relación isotipo IgG2a/IgG1. Los asteriscos negros (*) indican diferencias significativas respecto a AUD*, mientras que los rojos (*) indican diferencias significativas con la vacuna comercial subcutánea # IgG2a: por debajo del límite de detección.

En primer lugar, se midió la producción de IgG totales, y el perfil de isotipos IgG1 e IgG2a. Los resultados no mostraron diferencias significativas en los títulos de IgG totales entre los diferentes grupos. AUD_2 + HA, sin embargo, generó títulos IgG totales post-*prime* y post-*boost* más parejos que el resto de las combinaciones (Figura 4.3.A). En cuanto al perfil de isotipos, los resultados mostraron que AUD_2 + HA tópico produjeron una relación IgG2a/IgG1 ~1 tanto

post-*prime* como post-*boost*, similar a las obtenidas por la vacuna subcutánea, lo que indicaría la generación de una respuesta mixta humoral/celular. En contraste, para IMQ libre, AUD*, AUD* mezclado con IMQ y AUD_1, no se detectó respuesta de tipo IgG2a en el post-*prime* (Figura 4.3 B).

La respuesta celular generada tras las administraciones se estimó midiendo la producción de IFN-γ y el IE en esplenocitos estimulados con HA y concanavalina A. Post-*prime*, no se observó proliferación de esplenocitos tras la estimulación con HA para ningún grupo, en contraste sí se observó proliferación de los esplenocitos estimulados con concanavalina A. Post-*boost*, solo los esplenocitos de los grupos inmunizados con IMQ + HA y AUD_2 + HA mostraron niveles levemente superiores de proliferación tras la estimulación con HA (Figura 4.4). AUD_2 + HA indujo la producción significativamente superior al resto de los grupos de INF-γ tanto post-*prime* como post-*boost* tras la estimulación con concanavalina; mientras que la estimulación con HA produjo títulos de INF-γ más bajos (Figura 4.5).

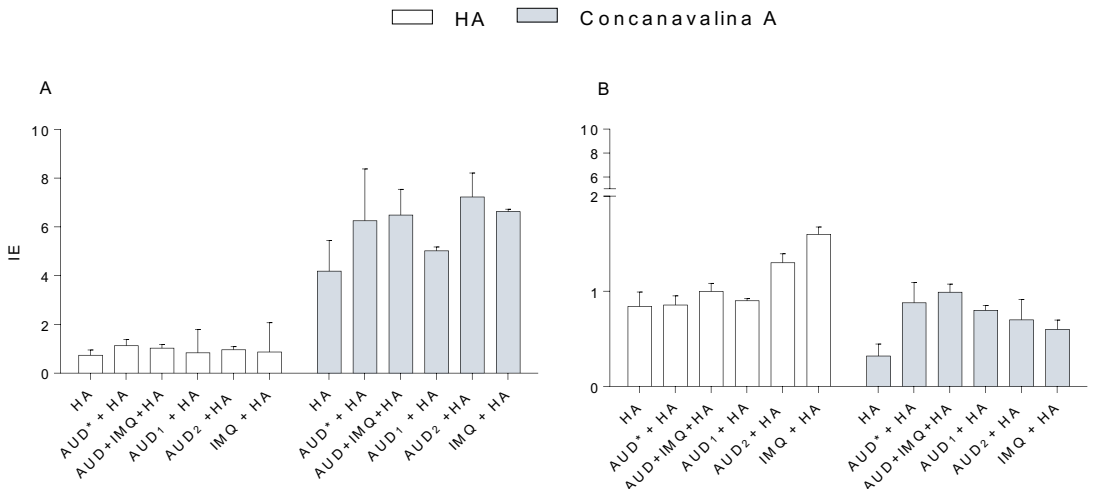


Figura 4.4 Indice de estimulación de esplenocitos estimulados con el antígeno HA y Concanavalina A (A) post-*prime* y (B) post-*boost*

Al normalizar la producción de INF-γ por el IE en esplenocitos estimulados con HA, no se observó respuesta diferente al control con medio de cultivo para ningún grupo (Figura 4.4). Tras la estimulación con Concanavalina A, sin embargo, tanto AUD_1 + HA como AUD_2 + HA indujeron la mayor relación INF-γ/SI post-*prime*. En éste último caso, la relación fue significativamente mayor

al inducido por HA parenteral. Estos resultados sugieren que solo AUD_2 + HA induciría una respuesta del tipo celular, superior al de la vacuna comercial subcutánea.

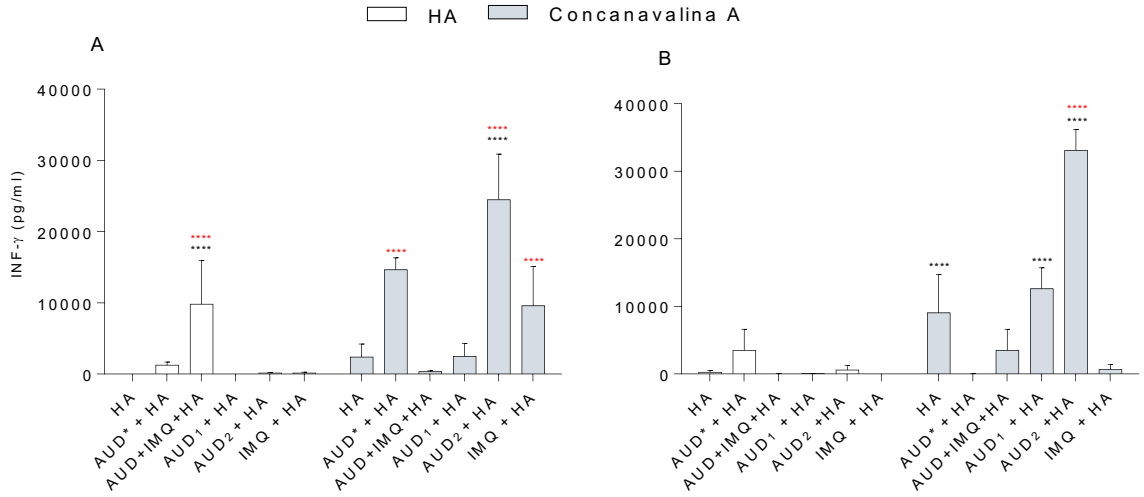


Figura 4.5 Producción de INF-γ de esplenocitos estimulados con HA y Concanavalina A (A) post-*prime* y (B) post-*boost.*

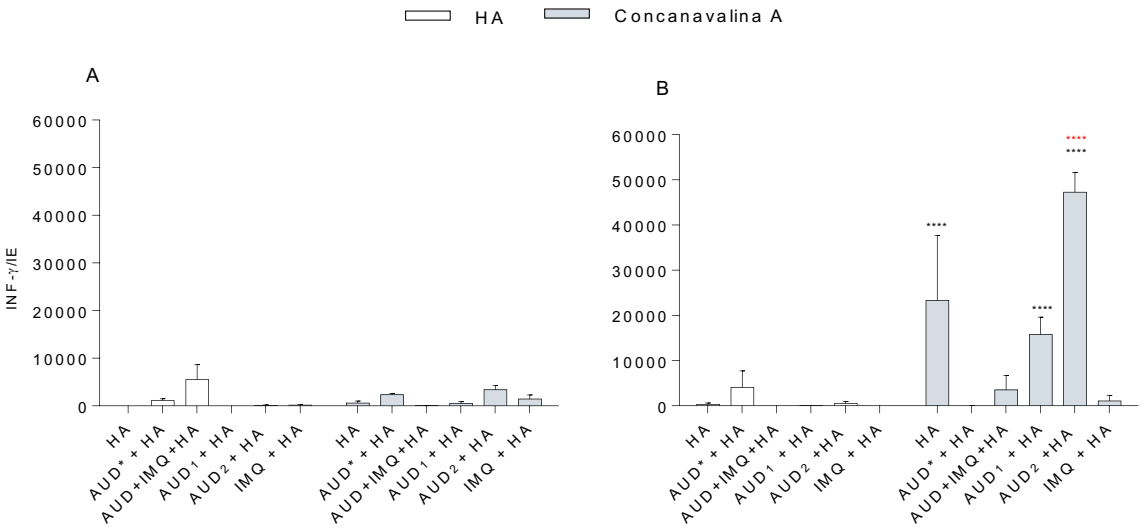


Figura 4.6. Producción de IFN-γ normalizada por el índice de estimulación (IE) de esplenocitos de ratones inmunizados, tras la estimulación con HA y Concanavalina A (A) post-*prime* y (B) post-*boost*. Los valores representan la producción media ± DE (n = 6). Los asteriscos negros (*) indican diferencias significativas respecto al grupo AUD*, mientras que los rojos (*) indican diferencias significativas con vacuna comercial subcutánea

4.3.2 Efecto del sitio de administración sobre la respuesta inmune

A continuación, estudiamos si es posible incrementar la respuesta modificando el sitio de aplicación. Para esto, AUD_2 se administró tópicamente a un grupo de ratones en el lomo y a otro en la axila, donde se encuentra una gran población de ganglios linfáticos axilares. Pudimos comprobar que el sitio de administración tópico no indujo diferencias en cuanto a la producción de IgG totales (Figura 4.7). En relación con la respuesta celular, comprobamos que, aunque se observó una relación de IgG2a/IgG1>1 post-*boost* cuando AUD_2 se aplicó en axila, la liberación de IFN-γ fue significativamente menor que cuando se aplicó en el lomo.

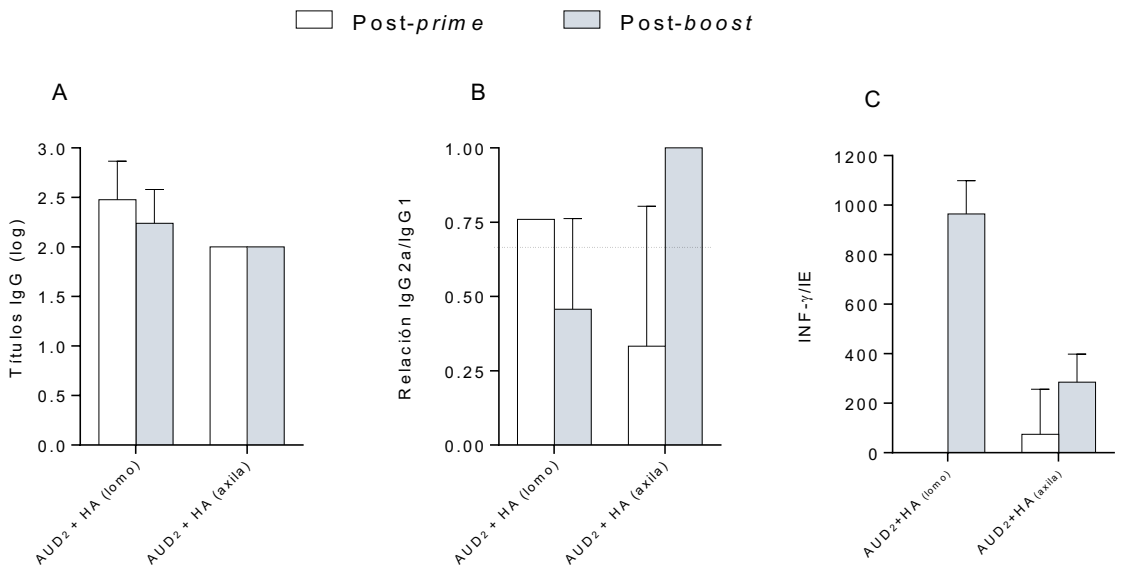


Figura 4.7 Evaluación del sitio de aplicación de AUD_2 y su efecto sobre (A) los títulos de IgG totales post-*prime* y post-*boost*; (B) la relación isotipos IgG2a/IgG1 y (C) producción de IFN-γ normalizada por el índice de estimulación (IE) de esplenocitos re-estimulados con concanavalina.

4.3.3 Reacción de hipersensibilidad retardada (DTH)

A continuación, medimos la inducción de reacción de hipersensibilidad retardada en los animales inmunizados tópicamente en respuesta a HA con el fin de determinar por otro medio, la generación de inmunidad celular. Si bien no se encontraron diferencias significativas entre las diferentes formulaciones y las respuestas fueron muy variables (Figura 4.8), AUD_1 y AUD_2 (ya sea en lomo o

axila), generaron una inflamación leve que no se observó con AUD vacíos (AUD*).

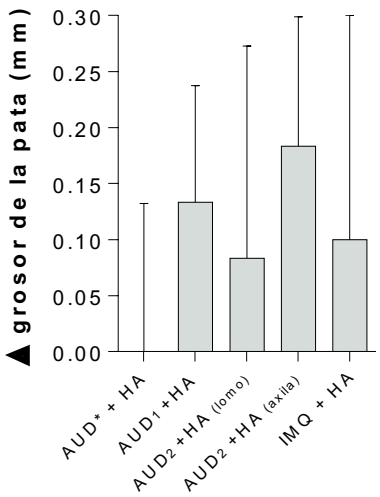


Figura 4.8 Determinación de DTH en ratones inmunizados tras la administración intradérmica de HA en una de sus extremidades traseras. Δ grosor de la pata se determinó como la inflamación de la pata inyectada con el antígeno - inflamación de la pata inyectada con PBS

4.4 Discusión

El virus de la influenza continúa devastando vidas humanas cada año. Induce una enfermedad respiratoria grave y tiene el potencial de producir pandemias, como las originadas antiguamente en 1918, 1957 y 1968, y la más reciente de 2009. Los nuevos enfoques para una vacunación exitosa contra la influenza masiva requieren una optimización sinérgica entre las dosis administradas, la logística del transporte y la facilidad de administración. Estudios recientes han demostrado que la administración de la vacuna contra la influenza en la piel no solo conduce a una reducción de la dosis, sino que el uso de tecnologías innovadoras también puede permitir una vacunación indolora y autoadministrada.

Una vacuna contra influenza efectiva requiere del montaje de una respuesta inmune sistémica mediada por anticuerpos anti-HA, una respuesta local en el sistema respiratorio y una respuesta mediada por células. En este Capítulo, en una prueba de concepto, testeamos la capacidad de AUD_2 de

inducir una respuesta inmune sistémica contra la influenza aplicado tópicamente mezclado con una vacuna comercial *Split*.

En primer lugar, comprobamos que fue posible inducir una respuesta inmune sistémica tras la aplicación tópica de AUD combinado con un antígeno diferente al antígeno modelo utilizado en los capítulos anteriores. Más en profundidad se estudiaron dos aspectos diferentes: por un lado, el efecto del inmunomodulador IMQ sobre la magnitud y el tipo de respuesta inmunológica, y por otro lado la *performance* de la aplicación tópica de las nanovesículas mezcladas con HA, con respecto a la vacuna subcutánea comercial. Si bien la presencia de IMQ no indujo diferencias significativas en cuanto a los títulos de IgG séricos antígeno-específicos respecto de vesículas sin IMQ, su presencia moduló el tipo de respuesta, lo que se puso de manifiesto tras la administración de AUD_2, la formulación que más cantidad del inmunomodulador posee. Encontramos que su administración tópica indujo la generación de una relación de isotipos IgG2a/IgG1~1 y, además, la liberación de cantidades de INF-γ significativamente altas. Estos resultados, sugieren que AUD_2 induce una respuesta de tipo celular que no se manifiesta con la aplicación tópica de AUD sin IMQ. Por otro lado, los ratones inmunizados tópicamente con AUD_2 + HA generaron mayor índice de estimulación esplénica y niveles de INF-γ comparado con los ratones vacunados subcutáneamente con HA. Sin embargo, y en concordancia con los resultados mostrados en el Capítulo 3, solo los esplenocitos estimulados con concanavalina A mostraron mayores valores de estimulación esplénica y niveles INF-γ que los estimulados con medio de cultivo.

La aplicación tópica de IMQ (Aldara) ha mostrado modular la respuesta inmunológica generada por la administración intraperitoneal de una vacuna de influenza en un modelo murino de influenza (Zhang et al., 2014). Recientemente, Gogoll et al., 2016 mostró que la aplicación tópica de una nanoemulsión sólida de IMQ acompañada a la administración intraperitoneal de una vacuna estacional de influenza, no produjo diferencias en los niveles de IgG1, pero incrementó los de IgG2a en comparación con la vacuna sola (Gogoll et al., 2016). Remarcablemente, nuestros resultados se obtuvieron tras la aplicación tópica de la vacuna de influenza sin el empleo de agujas, y administrando ≈ 13-veces menores dosis de IMQ (200 μg IMQ/ratón) que las empleadas como Aldara o la

nanoemulsión (2,5 mg IMQ/ratón). La reducción de la dosis empleada de IMQ es relevante ya que IMQ induce placas psoriásicas en modelos murinos (van der Fits et al., 2009) tras la aplicación tópica de Aldara en dosis de 62,5 mg/día durante 6 días.

En cuanto al sitio de administración, encontramos respuestas similares cuando AUD_2 se aplicó en la axila o en el lomo. La transferencia de antígenos a los órganos linfoides es crítica para la inducción de respuestas inmunes (Zinkernagel et al., 1997). Estas respuestas inmunitarias se inician en estos tejidos linfoides, donde las CDs cargadas con antígeno se encuentran y activan a las células T, dando como resultado la generación tanto de células efectoras como de memoria (Mackay, 2000; Masopust et al., 2001; Reinhardt et al., 2001). En las axilas, se encuentran los ganglios linfáticos axilares. Nuestra hipótesis era que una administración tópica en esa zona simplificaría la transferencia de los antígenos y el inmunomodulador debido a la proximidad con las CDs, por lo que la respuesta inmune sería más eficiente. Sin embargo, los resultados mostraron que no fue posible inducir una respuesta inmune de mayor magnitud, ni una polarización hacia Th1 relacionada con una respuesta de tipo celular.

A pesar de que no en todos los inmunógenos que inducen DTH, la respuesta se halla asociada a una respuesta celular protectora (Nichols et al., 2002), la reacción clásica de DTH se considera indicativa de una respuesta celular mediada por células T *helpers* o células T CD4+ activadas (Cher & Mosmann, 1987) y células TCD8+ citotóxicas (Kalish & Askenase 1999). Si bien la respuesta inflamatoria generada en los animales tras la inducción con HA fue muy variable, la mayor penetración tópica, la mayor captura por parte de macrófagos y la mayor capacidad de generación de TNF-α e IL-6 de AUD_2 puede haber generado una mayor respuesta DTH.

En conclusión, AUD_2 tópico podría ser una alternativa a la administración intramuscular de la vacuna para la influenza. Estudios posteriores serán necesarios para evaluar la generación de inmunidad mucosa, la capacidad de inhibición de los anticuerpos generados y el montaje eficiente de una respuesta inmune ante un desafío en un modelo animal adecuado.

4.6 Referencias

Al-Mazrou, A., Scheifele, D. W., Soong, T. et al., (1991). Comparison of adverse reactions to whole-virion and split-virion influenza vaccines in hospital personnel. *CMAJ: Canadian Medical Association Journal, 145*(3), 213.

Ambrose, C. S., & Levin, M. J. (2012). The rationale for quadrivalent influenza vaccines. *Human vaccines & immunotherapeutics, 8*(1), 81-88.

Arnold, R. (2017). Microbial Control. *Microreviews in Cell and Molecular Biology, 1*(2).

Aucouturier, J., Dupuis, L., & Ganne, V. (2001). Adjuvants designed for veterinary and human vaccines. *Vaccine, 19*(17-19), 2666-2672.

Barrett, P. N., & Ehrlich, H. J. (2011). Adjuvanted or whole-virion vaccine for 2009 influenza A (H1N1). *The Lancet infectious diseases, 11*(7), 496-497.

Barría, M. I., Garrido, J. L., Stein, C. et al., (2012). Localized mucosal response to intranasal live attenuated influenza vaccine in adults. *The Journal of infectious diseases, 207*(1), 115-124.

Boeglin, E., Smulski, C. R., Brun, S. et al., (2011). Toll-like receptor agonists synergize with CD40L to induce either proliferation or plasma cell differentiation of mouse B cells. *PloS one, 6*(10), e25542.

Brewer, J. M. (2006). (How) do aluminium adjuvants work? *Immunology letters, 102*(1), 10-15.

Carlson, B. C., Jansson, Å. M., Larsson, A. et al., (2000). The endogenous adjuvant squalene can induce a chronic T-cell-mediated arthritis in rats. *The American journal of pathology, 156*(6), 2057-2065.

Carrat, F., & Flahault, A. (2007). Influenza vaccine: the challenge of antigenic drift. *Vaccine, 25*(39-40), 6852-6862.

Carter, N. J., & Curran, M. P. (2011). Live attenuated influenza vaccine (FluMist®; Fluenz™). *Drugs, 71*(12), 1591-1622.

Cibulski, S. P., Mourglia-Ettlin, G., Teixeira H. et al., (2016). Novel ISCOMs from Quillaja brasiliensis saponins induce mucosal and systemic antibody production, T-cell responses and improved antigen uptake. *Vaccine, 34*(9), 1162-1171.

Coffman, R. L., Sher, A., & Seder, R. A. (2010). Vaccine adjuvants: putting innate immunity to work. *Immunity, 33*(4), 492-503.

Chen, W. C., & Huang, L. (2005). Non-viral vector as vaccine carrier. *Advances in genetics, 54*, 315-337.

Chen, X.-Z., Mao, X.-H., Zhu, K.-J et al., (2010). Toll like receptor agonists augment HPV 11 E7-specific T cell responses by modulating monocyte-derived dendritic cells. *Archives of dermatological research, 302*(1), 57-65.

Chen, Y., Liang, W., Yang, S et al., (2013). Human infections with the emerging avian influenza A H7N9 virus from wet market poultry: clinical analysis and characterisation of viral genome. *The Lancet, 381*(9881), 1916-1925.

Cheng, V. C., To, K. K., Tse, H. et al., (2012). Two years after pandemic influenza A/2009/H1N1: what have we learned? *Clinical microbiology reviews, 25*(2), 223-263.

Cher, D. J., & Mosmann, T. (1987). Two types of murine helper T cell clone. II. Delayed-type hypersensitivity is mediated by TH1 clones. The Journal of Immunology, 138(11), 3688-3694.

Daemen, T., de Mare, A., Bungener, L. et al., (2005). Virosomes for antigen and DNA delivery. *Advanced drug delivery reviews, 57*(3), 451-463.

Demento, S. L., Eisenbarth, S. C., Foellmer S. et al., (2009). Inflammasome-activating nanoparticles as modular systems for optimizing vaccine efficacy. *Vaccine, 27*(23), 3013-3021.

Desmet, C. J., & Ishii, K. J. (2012). Nucleic acid sensing at the interface between innate and adaptive immunity in vaccination. *Nature Reviews Immunology, 12*(7), 479.

Didierlaurent, A. M., Morel, S., Lockman, L. et al., (2009). AS04, an aluminum salt-and TLR-4 agonist-based adjuvant system, induces a transient localized innate immune response leading to enhanced adaptive immunity. *The Journal of Immunology*, jimmunol. 0901474.

Dupuis, M., Murphy, T. J., Higgins. . et al., (1998). Dendritic cells internalize vaccine adjuvant after intramuscular injection. *Cellular immunology, 186*(1), 18-27.

Edelman, R. (1980). Vaccine adjuvants. *Reviews of infectious diseases, 2*(3), 370-383.

Evans, J. T., Cluff, C. W., Johnson, D. A. et al., (2003). Enhancement of antigen-specific immunity via the TLR4 ligands MPL™ adjuvant and Ribi. 529. *Expert review of vaccines, 2*(2), 219-229.

Fiore, A. E., Uyeki, T. M., Broder, K. et al., (2010). *Prevention and control of influenza with vaccines: recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP), 2010*: Department of Health and Human Services, Centers for Disease Control and Prevention.

Geeraedts, F., Goutagny, N., Hornung, V. et al., (2008). Superior immunogenicity of inactivated whole virus H5N1 influenza vaccine is primarily controlled by Toll-like receptor signalling. *PLoS pathogens, 4*(8), e1000138.

Gibson, S. J., Lindh, J. M., Riter, T. R. et al., (2002). Plasmacytoid dendritic cells produce cytokines and mature in response to the TLR7 agonists, imiquimod and resiquimod. *Cellular immunology, 218*(1-2), 74-86.

Gill, H. S., Denson, D. D., Burris, B. A. et al., (2008). Effect of microneedle design on pain in human subjects. *The Clinical journal of pain, 24*(7), 585.

Gonzalez, R. O., Higa, L. H., Cutrullis, R. A. et al., (2009). Archaeosomes made of Halorubrum tebenquichense total polar lipids: a new source of adjuvancy. *BMC biotechnology, 9*(1), 71.

Gupta, R. K., & Siber, G. R. (1994). Comparison of adjuvant activities of aluminium phosphate, calcium phosphate and stearyl tyrosine for tetanus toxoid. *Biologicals, 22*(1), 53-63.

Hancock, K., Veguilla, V., Lu. et al., (2009). Cross-reactive antibody responses to the 2009 pandemic H1N1 influenza virus. *New England Journal of Medicine, 361*(20), 1945-1952.

Harris, A., Cardone, G., Winkler, D. C. et al., (2006). Influenza virus pleiomorphy characterized by cryoelectron tomography. *Proceedings of the National Academy of Sciences, 103*(50), 19123-19127.

Heer, A. K., Shamshiev, A., Donda, A. et al., (2007). TLR signaling fine-tunes anti-influenza B cell responses without regulating effector T cell responses. *The Journal of Immunology, 178*(4), 2182-2191.

Hem, S. L., & HogenEsch, H. (2007). Relationship between physical and chemical properties of aluminum-containing adjuvants and immunopotentiation. *Expert review of vaccines, 6*(5), 685-698.

Herzog, C., Hartmann, K., Künzi, V. et al., (2009). Eleven years of Inflexal® V—a virosomal adjuvanted influenza vaccine. *Vaccine, 27*(33), 4381-4387.

Higa, L. H., Schilrreff, P., Perez, A. P. et al., (2012). Ultradeformable archaeosomes as new topical adjuvants. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine, 8*(8), 1319-1328.

Hirschfeld, M., Ma, Y., Weis, J. H. et al., (2000). Cutting edge: repurification of lipopolysaccharide eliminates signaling through both human and murine toll-like receptor 2. *The Journal of Immunology, 165*(2), 618-622.

Hung, I. F., Levin, Y., To, K. K. et al., (2012). Dose sparing intradermal trivalent influenza (2010/2011) vaccination overcomes reduced immunogenicity of the 2009 H1N1 strain. *Vaccine, 30*(45), 6427-6435.

Immordino, M. L., Dosio, F., & Cattel, L. (2006). Stealth liposomes: review of the basic science, rationale, and clinical applications, existing and potential. *International journal of nanomedicine, 1*(3), 297.

Iwasaki, A., & Medzhitov, R. (2004). Toll-like receptor control of the adaptive immune responses. *Nature immunology, 5*(10), 987.

Jalilian, B., Christiansen, S. H., Einarsson, H. B. et al., (2013). Properties and prospects of adjuvants in influenza vaccination-messy precipitates or blessed opportunities? *Molecular and cellular therapies, 1*(1), 2.

Janeway, C. A. (1989). *Approaching the asymptote? Evolution and revolution in immunology.* Paper presented at the Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology.

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), 192-199.

Kaminski, M. M., Ohnemus, A., Cornitescu, M. et al., (2012). Plasmacytoid dendritic cells and Toll-like receptor 7-dependent signalling promote efficient protection of mice against highly virulent influenza A virus. *Journal of General Virology, 93*(3), 555-559.

Kasturi, S. P., Skountzou, I., Albrecht, R. A. et al., (2011). Programming the magnitude and persistence of antibody responses with innate immunity. *Nature, 470*(7335), 543.

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

Koyama, S., Ishii, K. J., Kumar, H. et al., (2007). Differential role of TLR-and RLR-signaling in the immune responses to influenza A virus infection and vaccination. *The Journal of Immunology, 179*(7), 4711-4720.

Kuroda, E., Coban, C., & Ishii, K. J. (2013). Particulate adjuvant and innate immunity: past achievements, present findings, and future prospects. *International reviews of immunology, 32*(2), 209-220.

Launay, O., Desaint, C., Durier, C. et al., (2011). Safety and immunogenicity of a monovalent 2009 influenza A/H1N1v vaccine adjuvanted with AS03A or unadjuvanted in HIV-infected adults: a randomized, controlled trial. *Journal of Infectious Diseases, 204*(1), 124-134.

Lillehoj, H. S., Ding, X., Dalloul, R. A. et al., (2005). Embryo vaccination against Eimeria tenella and E. acervulina infections using recombinant proteins and cytokine adjuvants. *Journal of Parasitology, 91*(3), 666-673.

Lim, K.-H., & Staudt, L. M. (2013). Toll-like receptor signaling. *Cold Spring Harbor perspectives in biology, 5*(1), a011247.

Lund, J. M., Alexopoulou, L., Sato, A. et al., (2004). Recognition of single-stranded RNA viruses by Toll-like receptor 7. *Proceedings of the National Academy of Sciences, 101*(15), 5598-5603.

Luo, Y., & Dorf, M. E. (2003). Delayed-type hypersensitivity. Current protocols in immunology, 55(1), 4.5. 1-4.5. 5.

Mackay, C. (2000). T-cell function and migration. Two sides of the same coin. *The New England journal of medicine, 343*(14), 1020-1034.

Mahlios, J., De la Herrán-Arita, A. K., & Mignot, E. (2013). The autoimmune basis of narcolepsy. *Current opinion in neurobiology, 23*(5), 767-773.

Marrack, P., McKee, A. S., & Munks, M. W. (2009). Towards an understanding of the adjuvant action of aluminium. *Nature Reviews Immunology, 9*(4), 287.

Martin, M., Michalek, S. M., & Katz, J. (2003). Role of innate immune factors in the adjuvant activity of monophosphoryl lipid A. *Infection and immunity, 71*(5), 2498-2507.

Masopust, D., Vezys, V., Marzo, A. L. et al., (2001). Preferential localization of effector memory cells in nonlymphoid tissue. *Science, 291*(5512), 2413-2417.

Mbow, M. L., De Gregorio, E., Valiante, N. M. et al., (2010). New adjuvants for human vaccines. *Current opinion in immunology, 22*(3), 411-416.

McCartney, S., Vermi, W., Gilfillan, S. et al., (2009). Distinct and complementary functions of MDA5 and TLR3 in poly (I: C)-mediated activation of mouse NK cells. *Journal of Experimental Medicine, 206*(13), 2967-2976.

Melchjorsen, J. (2013). Learning from the messengers: innate sensing of viruses and cytokine regulation of immunity—clues for treatments and vaccines. *Viruses, 5*(2), 470-527.

Mitnaul, L. J., Matrosovich, M. N., Castrucci, M. R. et al., (2000). Balanced hemagglutinin and neuraminidase activities are critical for efficient replication of influenza A virus. *Journal of virology, 74*(13), 6015-6020.

Monto, A. S., Gravenstein, S., Elliott, M. et al., (2000). Clinical signs and symptoms predicting influenza infection. *Archives of internal medicine, 160*(21), 3243-3247.

Mouries, J., Moron, G., Schlecht, G. et al., (2008). Plasmacytoid dendritic cells efficiently cross-prime naive T cells in vivo after TLR activation. *Blood, 112*(9), 3713-3722.

Nichols, K. L., Bauman, S. K., Schafer, F. B. et al., (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.

Nohynek, H., Jokinen, J., Partinen, M. et al., (2012). AS03 adjuvanted AH1N1 vaccine associated with an abrupt increase in the incidence of childhood narcolepsy in Finland. *PloS one, 7*(3), e33536.

O'Hagan, D., Ott, G. S., De Gregorio, E. et al., (2012). The mechanism of action of MF59–an innately attractive adjuvant formulation. *Vaccine, 30*(29), 4341-4348.

Osterholm, M. T., Kelley, N. S., Sommer, A. et al., (2012). Efficacy and effectiveness of influenza vaccines: a systematic review and meta-analysis. *The Lancet infectious diseases, 12*(1), 36-44.

Othoro, C., Johnston, D., Lee, R. et al., (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.

Ott, G., Barchfeld, G. L., Chernoff, D. et al., (1995). MF59 design and evaluation of a safe and potent adjuvant for human vaccines *Vaccine Design* (pp. 277-296): Springer.

Panda, A., Qian, F., Mohanty, S. et al., (2010). Age-associated decrease in TLR function in primary human dendritic cells predicts influenza vaccine response. *The Journal of Immunology*, ji_0901022.

Partinen, M., Saarenpää-Heikkilä, O., Ilveskoski, I. et al., (2012). Increased incidence and clinical picture of childhood narcolepsy following the 2009 H1N1 pandemic vaccination campaign in Finland. *PloS one, 7*(3), e33723.

Pashine, A., Valiante, N. M., & Ulmer, J. B. (2005). Targeting the innate immune response with improved vaccine adjuvants. *Nature medicine, 11*(4s), S63.

Pearton, M., Kang, S.-M., Song, J.-M. et al., (2010). Changes in human Langerhans cells following intradermal injection of influenza virus-like particle vaccines. *PLoS One, 5*(8), e12410.

Rajagopal, D., Paturel, C., Morel, Y. et al., (2010). Plasmacytoid dendritic cell-derived type I interferon is crucial for the adjuvant activity of Toll-like receptor 7 agonists. *Blood*, blood-2009-2008-238543.

Randhawa, A., Shey, M., Keyser, A. et al., (2011). South African Tuberculosis Vaccine Initiative Team. Association of human TLR1 and TLR6 deficiency

with altered immune responses to BCG vaccination in South African infants. *PLoS Pathog, 7*(8), e1002174.

Rappuoli, R., Mandl, C. W., Black. et al.,. (2011). Vaccines for the twenty-first century society. *Nature Reviews Immunology, 11*(12), 865.

Reinhardt, R. L., Khoruts, A., Merica, R. et al., (2001). Visualizing the generation of memory CD4 T cells in the whole body. *Nature, 410*(6824), 101.

Russo, C., Cornella-Taracido, I., Galli-Stampino. et al., (2011). Small molecule Toll-like receptor 7 agonists localize to the MHC class II loading compartment of human plasmacytoid dendritic cells. *Blood*, blood-2010-2012-328138.

Schmitz, N., Beerli, R. R., Bauer, M. et al., (2012). Universal vaccine against influenza virus: linking TLR signaling to anti-viral protection. *European journal of immunology, 42*(4), 863-869.

Schneider-Ohrum, K., Giles, B. M., Weirback, H. K. et al., (2011). Adjuvants that stimulate TLR3 or NLPR3 pathways enhance the efficiency of influenza virus-like particle vaccines in aged mice. *Vaccine, 29*(48), 9081-9092.

Schön, M., & Schön, M. (2007). Imiquimod: mode of action. *British Journal of Dermatology, 157*, 8-13.

Shoenfeld, Y., & Agmon-Levin, N. (2011). 'ASIA'–autoimmune/inflammatory syndrome induced by adjuvants. *Journal of autoimmunity, 36*(1), 4-8.

Soema, P. C., Kompier, R., Amorij, J.-P. et al., (2015). Current and next generation influenza vaccines: formulation and production strategies. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, 94*, 251-263.

Song, J.-M., Kim, Y.-C., Lipatov, A. S. et al., (2010). Microneedle delivery of H5N1 influenza virus-like particles to the skin induces long-lasting B-and T-cell responses in mice. *Clinical and Vaccine Immunology, 17*(9), 1381-1389.

Stern, P. L., van der Burg, S. H., Hampson, I. et al., (2012). Therapy of human papillomavirus-related disease. *Vaccine, 30*, F71-F82.

Tapping, R. I., Akashi, S., Miyake, K. et al., (2000). Toll-like receptor 4, but not toll-like receptor 2, is a signaling receptor for Escherichia and Salmonella lipopolysaccharides. *The Journal of Immunology, 165*(10), 5780-5787.

To, K. K., Chan, J. F., Chen, H., Li, L. et al., (2013). The emergence of influenza A H7N9 in human beings 16 years after influenza A H5N1: a tale of two cities. *The Lancet infectious diseases, 13*(9), 809-821.

Tong, S., Li, Y., Rivailler, P. et al., (2012). A distinct lineage of influenza A virus from bats. *Proceedings of the National Academy of Sciences, 109*(11), 4269-4274.

Van Damme, P., Oosterhuis-Kafeja, F., Van der Wielen, M. et al., (2009). Safety and efficacy of a novel microneedle device for dose sparing intradermal influenza vaccination in healthy adults. *Vaccine, 27*(3), 454-459.

Van der Fits, L., Mourits, S., Voerman, J. S. et al,. (2009). Imiquimod-induced psoriasis-like skin inflammation in mice is mediated via the IL-23/IL-17 axis. The Journal of Immunology, 182(9), 5836-5845.

Vesikari, T., Knuf, M., Wutzler, P. et al., . (2011). Oil-in-water emulsion adjuvant with influenza vaccine in young children. *New England Journal of Medicine, 365*(15), 1406-1416.

Vogel, F. R. (2000). Improving vaccine performance with adjuvants. *Clinical Infectious Diseases, 30*(Supplement_3), S266-S270.

Wang, N., Wang, T., Zhang, M. et al., (2014). Mannose derivative and lipid A dually decorated cationic liposomes as an effective cold chain free oral mucosal vaccine adjuvant-delivery system. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, 88*(1), 194-206.

Webster, R. G., Bean, W. J., Gorman, O. T. et al., (1992). Evolution and ecology of influenza A viruses. *Microbiological reviews, 56*(1), 152-179.

Weldon, W. C., Zarnitsyn, V. G., Esser, E. et al, . (2012). Effect of adjuvants on responses to skin immunization by microneedles coated with influenza subunit vaccine. *PloS one, 7*(7), e41501.

Welte, T., Reagan, K., Fang, H. et al., (2009). Toll-like receptor 7-induced immune response to cutaneous West Nile virus infection. *Journal of General Virology, 90*(11), 2660-2668.

Wille-Reece, U., Flynn, B. J., Loré, K. et al., (2005). HIV Gag protein conjugated to a Toll-like receptor 7/8 agonist improves the magnitude and quality of Th1 and CD8+ T cell responses in nonhuman primates. *Proceedings of the National Academy of Sciences, 102*(42), 15190-15194.

World Health Organization Influenza (Seasonal). (2014). Fact Sheet No. 211

Writing Committee of the World Health Organization (WHO) (2005). Avian influenza A (H5N1) infection in humans. *New England Journal of Medicine, 353*(13), 1374-1385.

Yang, W. H., Dionne, M., Kyle, M. et al., (2013). Long-term immunogenicity of an AS03-adjuvanted influenza A (H1N1) pdm09 vaccine in young and elderly adults: an observer-blind, randomized trial. *Vaccine, 31*(40), 4389-4397.

Zhang, A. J., Li, C., To, K. et al., (2014). TLR7 agonist imiquimod in combination with influenza vaccine expedite and augment humoral immune responses against influenza A (H1N1) pdm09 infection in BALB/c mice. *Clinical and Vaccine Immunology*, CVI. 00816-00813.

Zhang, Y., Lin, X., Wang, G. et al., (2010). Neuraminidase and hemagglutinin matching patterns of a highly pathogenic avian and two pandemic H1N1 influenza A viruses. *PloS one, 5*(2), e9167.

Zinkernagel, R. M., Ehl, S., Aichele, P. et al., (1997). Antigen localisation regulates immune responses in a dose-and time-dependent fashion: a geographical view of immune reactivity. *Immunological reviews, 156*(1), 199-209.

Zuber, A. K., Bråve, A., Engström, G. et al., (2004). Topical delivery of imiquimod to a mouse model as a novel adjuvant for human

CAPITULO 5

ACTIVIDAD ANTI-MELANOMA *IN VITRO* DE ARQUEOSOMAS ULTRADEFORMABLES CON IMIQUIMOD

5.1 Introducción

La piel es el órgano más grande del cuerpo humano. Tal como se describió en el Capítulo 1, su principal función es actuar como barrera protectora contra la entrada de material extraño y posible invasión de patógenos. Sin embargo, su función, sensibilidad y ubicación hacen de la piel un órgano importante y vital en el que, cambios fisiológicos estructurales en algunas de sus capas llevan a la generación de anomalías o afecciones que pueden concluir en el desarrollo de cáncer (Akhtar & Khan, 2016). Existen 3 tipos diferentes de cáncer de piel: melanomas (originados en los melanocitos, células productoras del pigmento melanina, que residen en la región dermo-epidérmica), carcinomas de células basales (BCC, basal cell carcinoma) y carcinomas de células escamosas (SCC, squamous cell carcinoma). BCC y SCC se clasifican como cánceres de piel no melanoma (NMSC, non melanoma skin cancers) (Akhtar & Khan, 2016), el tipo de cáncer más común diagnosticado en humanos, con un incremento sustancial de su incidencia debido fundamentalmente al aumento en la exposición solar (Madan et al., 2010). BCC es el más común ya que constituye el 75% del total de casos notificados, mientras que SCC es la segunda aparición más frecuente, representando aproximadamente el 20% de los casos de NMSC (Akhtar & Khan, 2016). Tanto BCC como SCC se pueden extirpar quirúrgicamente en una etapa temprana con una tasa de supervivencia del 99% (Anthony, 2000; Tian & Lee, 2010). En general este tipo de cáncer no es fatal pero puede destruir órganos como la nariz, los labios y las orejas (Alam et al., 2011), por lo que las lesiones deben tratarse, preferentemente, con técnicas no invasivas de modo de no contribuir con el incremento del daño.

En contraste, los melanomas son los tipos de cáncer más agresivos con un alto índice de metastatización. Representan casi el 5% de todos los cánceres dermatológicos y causan más del 75% de todas las muertes por cáncer de piel y su incidencia ha crecido notablemente en los últimos 30 años (Martinez & Otley, 2001). Una combinación de factores de riesgo tanto extrínsecos (exposición a radiación UV), como intrínsecos, (características genéticas/fenotípicas e inmunosupresión), son responsables de la alta incidencia del melanoma (National Institute of Health (NIH), 2018)

En su estadio temprano, el melanoma se desarrolla radialmente sin penetrar la dermis, mientras que en la fase de crecimiento vertical el melanoma rompe la unión dermo-epidérmica y se presenta en la dermis (Elder, 1999; Guerry et al., 1993). Una vez allí, tiene la potencialidad de extenderse por toda la piel, causando metástasis cutáneas e ingresando al torrente sanguíneo o al sistema linfático para metastatizar en órganos distantes como los pulmones (Elder, 1999).

El melanoma es curable si se detecta tempranamente; sin embargo, la sobrevida se reduce significativamente una vez que se presentan metástasis (Garbe et al., 2007).

Los melanomas en estadio I o temprano se extirpan quirúrgicamente (Elder, 1999; Garbe et al., 2007). El tratamiento del melanoma en la fase de crecimiento vertical incluye la remoción quirúrgica y el mapeo de los ganglios centinelas seguido de quimioterapia con agentes alquilantes del ADN como dacarbazina y temozolamida, terapia radiante o terapia con agentes biológicos que estimulan el sistema inmune. (Elder, 1999; Garbe et al., 2007). Sin embargo, el melanoma en los estadios avanzados, invasivo y metastásico, es resistente a los tratamientos. A pesar del desarrollo de varias quimio- e inmuno-terapias, como los anticuerpos anti-PD-1 y anti-CTLA-4 (nivolumab o pembrolizumab, e ipilimumab, respectivamente), capaces de bloquear la regulación de la actividad de los linfocitos T permitiendo así que permanezcan activos contra el tumor (Seidel et al., 2018), ninguna estrategia logra curar el melanoma (la sobrevida media con tratamiento con ipilimumab es de 8-12 meses) (Kemper et al., 2015; Partl et al., 2015; Massi et al., 2015). Aunque las inmunoterapias combinadas con radiación alargaron la sobrevida algunos años (Filippi et al., 2016), solo un 20 % de los pacientes sobrevive 5 años (Ascierto et al., 2014).

La propensión del melanoma a generar metástasis cutáneas o subcutáneas accesibles desde el exterior del cuerpo ha impulsado el interés en la búsqueda de terapias basadas en la inyección directa de agentes activos sobre las metástasis. Por ejemplo, la aplicación intralesional de IL-2 y electroporación para el *delivery* de bleomicina (Randy, 2003; Mir, 1998). Las terapias intralesionales están generando bastante interés, no solo por su

capacidad de atacar específicamente las células tumorales, sino por su potencial capacidad de estimular al sistema inmune local y sistémico (Heppt et al., 2017).

Aldara (IMQ crema al 5%) está aprobado por la FDA (Food and Drug Administration de USA) para el tratamiento tópico de la queratosis actínica, BCC superficial y neoplasmas de piel inducidos por virus (Stanley, 2002; Gaspari, 2007). Estudios clínicos muestra la potencialidad del IMQ para tratar otros tipos de lesiones tópicas precancerosas como lentigo maligno (primer estadio de melanoma inducido por exposición al sol) (Hyde et al., 2012), hemangiomas (McCuaig et al., 2009) y metástasis cutáneas de cáncer de mama (Adams et al., 2012). En particular, IMQ ha demostrado buena eficacia en el tratamiento de metástasis de melanoma maligno (Steinmann et al., 2000; Bong et al., 2002; Schön et al., 2004). Aldara mostró inhibir la invasión y reprimir la aparición de metástasis en pacientes con melanomas metastásicos (Hesling et al., 2004). IMQ también se ha utilizado en el tratamiento de melanoma in situ, el primer estadio reconocido del melanoma, y en pacientes que no son candidatos a cirugía (Cotter et al., 2008; Woodmansee, 2009; Fan et al., 2015). Recientemente se reportó que IMQ administrado 5 días por semana durante 6 meses, luego de un episodio inicial de inflamación, retrasó el desarrollo de metástasis cutáneas en un paciente durante los 6 meses de seguimiento, con la desaparición visible de todas las lesiones (Aspord et al., 2014).

El mecanismo antitumoral del IMQ proviene de su acción sobre las células inmunes infiltradas, a través de la generación de una fuerte respuesta celular, sobre las células tumorales y sobre el microambiente tumoral. IMQ inhibe el desarrollo del melanoma a través de la movilización rápida de las células dendríticas plasmacitoides, la activación de sus funciones citotóxicas y la upregulación de la expresión de IFN-γ (Drobits et al., 2012). IMQ induce apoptosis de forma independiente de los receptores de muerte de la membrana plasmática *in vitro* e *in vivo* a través de la activación de proteína Bcl-2 y la familia de las caspasas (Schön et al, 2004). Además, recientemente se halló que IMQ posee actividad anti-angiogénica (Aspord et al., 2014; Rehman, 2017). IMQ reduce la vascularización tumoral induciendo la downregulación del factor de crecimiento endotelial vascular, angiogenina, IL-8 y el factor de crecimiento fibroblástico (Aspord et al., 2014).

Este amplio espectro de actividades antitumorales hace del IMQ un buen candidato para para su aplicación como adyuvante de otras terapias, particularmente para incrementar la inmunoterapia (Smits et al., 2008). Por ejemplo, la coadministración de IMQ y terapia fotodinámica en pacientes indujo la regresión de las metástasis distales y desencadenó una respuesta inmune beneficiosa (Naylor et al., 2006). IMQ coadministrado con IL-2 intralesional indujo efectos sistémicos inmunológicos, revertiendo el balance Th1/Th2 en pacientes con melanoma metastásico (Green et al., 2008).

A pesar de las ventajas del uso tópico del IMQ, las que incluyen la facilidad de aplicación, el menor dolor y la reducción de costos comparado con administraciones parenterales, existen limitaciones para su implementación (Dias et al., 2018). Los efectos adversos y la baja permeabilidad cutánea se encuentran entre las principales limitaciones de IMQ y pueden perjudicar el cumplimiento del tratamiento por parte del paciente y dificultar que el fármaco alcance las células epidérmicas y alcance su actividad antitumoral, respectivamente (Karve et al. 2008; Telò et al., 2016; Lee et al., 2011). Durante el tratamiento con IMQ, las reacciones cutáneas como el eritema, la hipopigmentación y la quemazón se informan con frecuencia (Venturini et al., 2015; Stockfleth et al., 2002; Frank et al., 2017; Geisse et al., 2004), lo que puede provocar la interrupción del tratamiento. En un estudio realizado por Karve y sus colegas (Karve et al. 2008), más del 50% de los pacientes informaron al menos un efecto adverso. Dentro de estos efectos se encuentran erosiones, pústulas, edema, endurecimiento y descamación de la piel.

En este contexto, y teniendo en cuenta que AUD2 incrementa la penetración de IMQ en el SC, induce la liberación de citoquinas pro-inflamatorias en macrófagos y queratinocitos y modula la respuesta inmune tras in vivo tras su aplicación tópica, en este Capítulo, evaluamos la actividad antitumoral in vitro de las nanovesículas conteniendo IMQ (AUD_2 y LUD_2) sobre la línea celular de melanoma humano Sk-Mel-28.

5.2 Materiales y Métodos

5.2.1 Materiales

Los reactivos utilizados fueron los mencionados en capítulos anteriores. En este capítulo en particular se agregaron los siguientes materiales: LDH-Glo™ *Cytotoxicity Assay* (Ensayo de determinación de citotoxicidad por LDH) fue de Promega, ioduro de propidio (IP) fue adquirido en Sigma-Aldrich (MO, EE.UU.), YO-PRO-1® fue de Molecular Probes, Invitrogen, Oregon, USA y Hoechst 33342 fue de Thermo Fisher Scientific

5.2.2 Preparación y caracterización de nanovesículas ultradeformables

5.2.2.1 Nanovesículas vacías y con IMQ

AUD*, AUD_1, AUD_2, LUD*, LUD_1 y LUD_2 fueron preparadas mediante el método de hidratación de la película lipídica y fueron caracterizadas tal como se describió en el **Capítulo 3, secciones 3.2.3.1 y 3.2.4.1-3**

Para determinar captura intracelular se prepararon nanovesículas AUD*, AUD_1, AUD_2, LUD*, LUD_1, LUD_2 marcadas con el lípido fluorescente RhPE, el cual se incorporó en la membrana lipídica, como se describió en el Capítulo **3, sección 3.2.3.2**. RhPE se cuantificó de acuerdo con lo descripto en el **Capítulo 3, sección 3.2.4.2**

5.2.3 Cultivo celular de células de melanoma humano

Las células de melanoma humano Sk-Mel-28, aisladas de melanoma de un ganglio linfático metastásico de un paciente oncológico masculino de 51 años de edad de origen étnico desconocido (ATCC® HTB-72™) se obtuvieron de la Asociación Banco Argentino de Células. Estas células crecen en monocapa y su morfología es poligonal.

5.2.4 Viabilidad celular

5.2.4.1 MTT

La viabilidad celular se determinó por el método de MTT descripto en el **Capítulo 3, sección 3.3.2.5.** A tal fin, células Sk-Mel-28 se cultivaron en MEM suplementado con 10% de SFB, 1% de antibiótico-antimicótico y 2 mM de glutamina a 37 °C en 5% de CO_2 y 95% de humedad. La viabilidad celular se determinó tras la incubación con diferentes concentraciones de IMQ, AUD*, AUD_1, AUD_2, LUD*, LUD_1 y LUD_2 durante 24 o 48 h. Brevemente, las células se sembraron en placas de 96 pocillos a una densidad de $2x10^4$ células por pocillo. Luego de 24 h de crecimiento en condiciones estándares, el sobrenadante se retiró y se reemplazó por 200 µl de diferentes concentraciones de las formulaciones diluidas en MEM suplementado con 5% SFB. Las concentraciones ensayadas fueron 50, 100, 250 y 500 µg/ml de fosfolípidos (PL) para AUD* y LUD*. En el caso AUD_1 y LUD_1, la concentración de IMQ estuvo entre 4 y 25 µg/ml de IMQ mientras que para AUD_2 y LUD_2 fue de entre 25 y 175 µg/ml de IMQ. IMQ libre (2 mg/ml disuelto en ácido láctico 10 mM) se incubó en concentraciones de 10, 25, 50 y 100 µg/ml. Células incubadas con MEM 5% se tomaron como control negativo de viabilidad celular, mientras que células tratadas con buffer de lisis (Buffer de lisis 1X, Kit de LDH, Promega) se consideraron como control positivo. La viabilidad se evaluó a las 24 y 48 h. Una hora antes de cumplido el tiempo, se agregó a los pocillos correspondientes al control de lisis 10 µl del buffer de lisis y se incubó por 1 h. A continuación, los sobrenadantes se recogieron y almacenaron a -20 °C para el posterior análisis de liberación de LDH. Las células se lavaron con PBS y se añadieron 100 µl de MTT 5 mg/ml a cada pocillo. Tras de 3 h de incubación en estufa a 37°C se eliminó la solución de MTT, los cristales de formazán insolubles se disolvieron en dimetilsulfóxido y se midió la absorbancia a 570 nm en un lector de microplacas (Cytation 5 BioTeck, Winooski, VT, EE. UU.). La viabilidad celular se expresó como % de viabilidad con respecto a las células cultivadas en medio de cultivo.

5.2.4.2 LDH

Lactato deshidrogenasa (LDH) es una enzima citosólica soluble que se libera al medio extracelular cuando se produce un daño en la membrana plasmática. El método de LDH consiste en la cuantificación de la cantidad de dicha enzima liberada, para determinar el grado de lisis en las células.

La cantidad de LDH liberada al medio extracelular se determinó mediante un ensayo enzimático: en una primera etapa, NAD^+ se reduce a NADH + H^+ mediante la conversión de lactato a piruvato catalizada por LDH. En el segundo paso el catalizador (diaforasa) transfiere $2H^+$ de NADH + H^+ a la sal de tetrazolio (2- [4-yodofenil] -3- [4-nitrofenil] -5-feniltetrazoluro cloruro) que se reduce a formazán (Figura 5.1). Un aumento en el daño de la membrana plasmática da como resultado un aumento de la actividad de la enzima citosólica LDH en el sobrenadante del cultivo (Hillegass et al., 2010) que se correlaciona directamente con la cantidad de formazán formado durante un período de tiempo limitado. El colorante de formazán formado es soluble en agua y muestra un pico de absorción a 500 nm, mientras que la sal de tetrazolio no muestra una absorción significativa en estas longitudes de onda. La liberación de LDH al medio extracelular se determinó mediante el empleo del kit comercial LDH-Glo™ *Cytotoxicity Assay.*

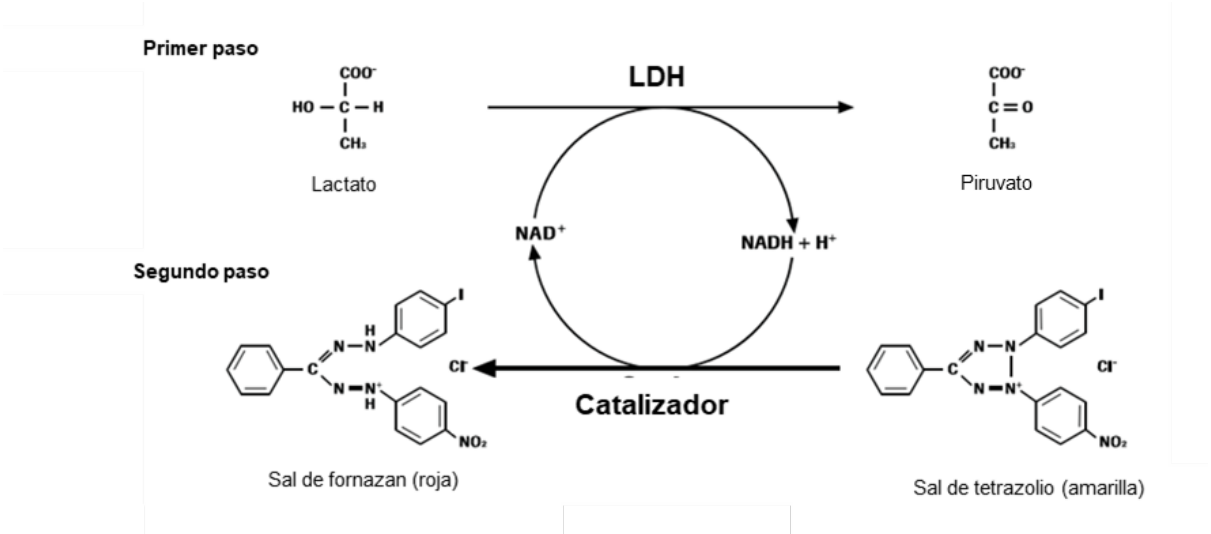


Figura 5.1 En el primer paso, LDH reduce NAD^+ a NADH + H^+ por oxidación de lactato a piruvato. En la segunda reacción enzimática, 2 H^+ se transfieren de NADH + H^+ a la sal de trazolio mediante un catalizador.

Los sobrenadantes obtenidos en el ensayo de viabilidad celular fueron centrifugados durante 4 minutos a 250 g para precipitar los restos celulares. A

continuación, 50 µl del sobrenadante fue traspasado a otra placa limpia, e incubados durante 30 min a T° ambiente, protegidos de la luz, con 50 µl de la mezcla de sustrato (kit de LDH). Luego se agregaron 50 µl de solución stop (kit de LDH) a cada well y se midió la absorbancia a 490 nm en un lector de microplacas (Cytation 5 BioTeck, Winooski, VT, EE. UU.). El grado de daño en la membrana se expresó como porcentaje de liberación de LDH con respecto al control positivo de lisis. Se consideró una liberación significativa de LDH cuando se encontró al menos 10% de liberación de LDH al medio (Fisher et al., 1998).

5.2.5 Captura Celular

La captura de las nanovesículas AUD*, AUD_1, AUD_2, LUD*, LUD_1 y LUD_2 en concentraciones de 500 µg/ml PL marcadas con RhPE por parte de las células Sk-Mel-28 se determinó mediante citometría de flujo según se describe en Higa et al, 2012.

Brevemente, en una placa de cultivo de 24 pocillos se sembraron $1x10^5$ células Sk-Mel-28 por pocillo con MEM completo suplementado al 10% SFB. Luego de 24 h, el medio de cultivo fue reemplazado por 300 µl de las formulaciones marcadas con RhPE e incubadas durante 3 horas. Luego, las células se lavaron con PBS, se levantaron con tratamiento con tripsina y se resuspendieron en PBS. Se analizaron un total de $1x10^4$ células mediante citometría de flujo. Las intensidades de fluorescencia obtenidas fueron normalizadas en función de la relación RhPE/PL como se describió en **el Capítulo 3**.

5.2.6 Determinación de apoptosis/necrosis

5.2.6.1 Análisis de la luz dispersada en citometría de flujo

Los datos obtenidos tras el ensayo de captura celular por citometría de flujo se utilizaron para analizar la variación de la luz dispersada frontal y lateralmente por las células (FSC y SCC, respectivamente). FSC es proporcional al tamaño celular, mientras que SCC está asociada con la complejidad de las

células. Variantes en uno o ambos parámetros, indican muerte celular por necrosis o apoptosis (Darzynkiewicz et al., 1997).

Para poder analizar la forma en la que las muestras indujeron variaciones en FSC y/o SCC, en primer lugar, se localizó la nube correspondiente a la máxima población celular en el *dot plot* de las células control sin tratar (Figura 5.2). Como parámetro de localización de las células, se establecieron cuatro cuadrantes, de modo tal que la mayor población quedó ubicada en el cuadrante inferior izquierdo. A continuación, se calcularon los porcentajes de células en cada uno de los cuadrantes delimitados. Las variaciones en dichos porcentajes indicaron modificaciones en la luz dispersada frontal y/o lateralmente y por lo tanto señalaron la presencia de procesos de necrosis y/o apoptosis

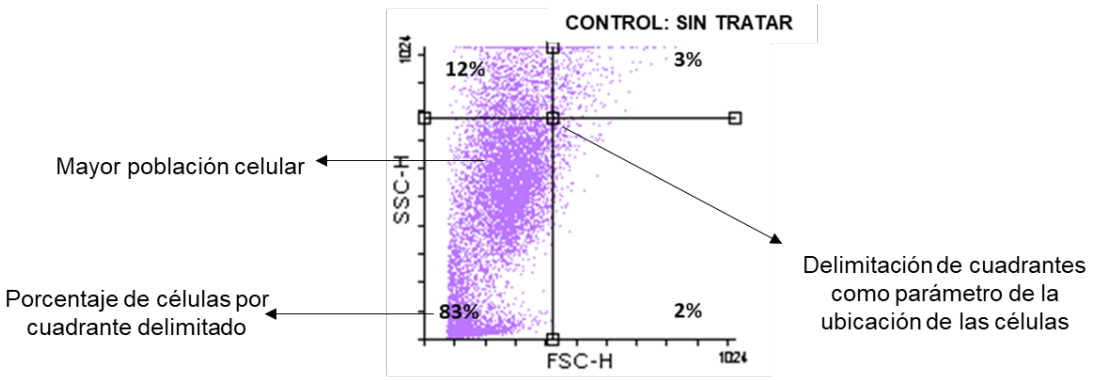


Figura 5.2 Delimitación de cuadrantes, como parámetro de la ubicación de las células para estudiar variaciones en FSC y SCC

5.2.6.2 Tinción con Yo-Pro, ioduro de propidio (IP) y Hoechst

La inducción de apoptosis o necrosis sobre células Sk-Mel-28 luego del tratamiento con AUD_2, LUD_2 e IMQ se determinó mediante microscopía de fluorescencia tras una doble tinción con el marcador fluorescente de apoptosis YO-PRO-1® y el marcador de necrosis Ioduro de Propidio (IP). Para localizar los núcleos celulares, las células fueron también teñidas con Hoechst.

Se sembraron 7,5 x10^4 células Sk-Mel-28 por pocillo en placa de 48 pocillos. Luego de 24 h, el medio de cultivo se reemplazó por 300 µl de AUD_2, LUD_2 e IMQ diluidos en MEM con 5% SFB en concentraciones de 50, 100, 250 y 500 µg/ml PL para AUD_2, LUD_2 y 10, 50 y 100 µg/ml de IMQ. Las células se incubaron en presencia de las muestras durante 24 h. Como control positivo de

necrosis las células se incubaron con peróxido de hidrogeno 6,4 mM durante 2 h y como control positivo de apoptosis fueron expuestas a luz UVC (254 nm) durante 20 min. Una vez que transcurrió el tiempo de incubación, el sobrenadante fue descartado, y las células fueron lavadas con PBS. A continuación, se agregó 1 µl de solución de YO-PRO-1 100 µM. Luego de 15 min de incubación y 3 lavados con PBS se agregó 1 µl de solución de IP 0,1 mg/ml y 20 µl de solución de Hoechst 0,1 mg/ml. Inmediatamente, luego de lavar con PBS, las células se observaron utilizando el equipo Cytation™ 5 Cell Imaging Multi-Mode Reader BioTek Instruments, Inc, Winooski, VT, USA. Se almacenaron 4 fotografías de cada campo: 1) campo claro, permite visualizar las células sin fluorescencia; 2) excitando con el cubo de DAPI, que permite visualizar núcleos de células tanto vivas como muertas teñidas con Hoechst; 3) excitando con el cubo de RFP, que permite identificar células en apoptosis tardía o necrosis teñidas con IP y 4) excitando con el cubo YFP, que permite identificar células apoptóticas teñidas con YO-PRO-1. Las fotografías se tomaron con un aumento de 10X. Las imágenes se analizaron utilizando el software ImageJ.

5.2.6.3 Análisis cuantitativo de la intensidad de fluorescencia

Con el fin de realizar un análisis cuantitativo de las imágenes obtenidas por microscopia, se determinó la intensidad de fluorescencia de cada célula por separado, para IP y YO-PRO, utilizando el software ImageJ. La tinción con Hoechst se utilizó para determinar la presencia de las células mediante la localización de sus núcleos celulares. Por fotografía se analizaron entre 150 y 200 células.

En primer lugar, se analizaron las cuatro fotografías correspondientes a las células control (células teñidas con los tres fluoróforos, incubadas con MEM 5%): la imagen en campo claro, para poder ver la morfología de las células; la imagen obtenida cuando fueron excitadas con DAPI, para visualizar los núcleos celulares teñidos con Hoechst y las imágenes de las células excitadas con RFP y YFP, para ver la fluorescencia de IP y YO-PRO-1, respectivamente.

En la fotografía de DAPI se identificaron todas las células presentes, obteniéndose el número total de células. Estas mismas células se identificaron luego en las imágenes de RFP y YFP, pudiéndose medir la intensidad de fluorescencia (IF) de IP y YO-PRO para cada una de ellas, respectivamente. Se

realizó un promedio de dichas IF, y el valor obtenido se consideró un umbral por encima del cual IF sugieren que la célula incorporó YO-PRO-1 o IP. En el caso de RFP, se tomaron como valores positivos aquellos en los que IF >700.000 u.a. y en el caso de YFP, IF >300.000 u.a. De acuerdo a lo resumido en la tabla 5.1, las células con IF negativas para ambos fluoróforos se consideraron viables; si incorporaron YO-PRO pero no IP se consideró que se encontraban en un proceso de apoptosis temprana; mientras que, si incorporaron ambos fluoróforos, se consideraron en un proceso de apoptosis tardía/ necrosis.

Tabla 5.1 Condición de las células según su capacidad incorporar YO-PRO y/o IP

YO-PRO	IP	Condición
-	-	Célula viable
+	-	Apoptosis temprana
+	+	Apoptosis tardía/ Necrosis

5.2.7 Análisis estadísticos

Los análisis estadísticos se realizaron mediante ANOVA de una entrada, seguido del test de Dunnett utilizando el software Prisma 6,00 (Graphpad Software Corporation, San Diego, California, EE.UU.). Las diferencias se consideraron significativas para un valor de *$p < 0.05$; **$p < 0.001$; ***$p < 0.001$; ****$p < 0.0001$.

5.3 Resultados

5.3.1 Viabilidad celular

Básicamente existen 3 procesos de muerte celular: necrosis, apoptosis y autofagia. La necrosis, un proceso de muerte celular independiente del ATP, se caracteriza por una hinchazón de las células y las organelas, la pérdida de gradientes iónicos, el aumento de la permeabilidad con la pérdida de la integridad de la membrana celular y la liberación de contenidos intracelulares (Figura 5.3) (Cummings y Schnellmann, 2001). Durante mucho tiempo se consideró a la necrosis como un mecanismo de muerte celular meramente accidental definida

por la ausencia de rasgos morfológicos de apoptosis o autofagia. Ciertos trabajos (Cho et al., 2009; Degterev et al., 2005; He et al., 2009; Kroemer & Martin, 2005; Zhang et al., 2009) dejaron en evidencia que puede ocurrir necrosis de manera regulada, y que la muerte celular necrótica tiene un papel prominente en múltiples entornos fisiológicos y patológicos (Vandenabeele et al., 2010). Este proceso se origina como una consecuencia del estrés fisicoquímico extremo, como el calor, el choque osmótico, el estrés mecánico, la congelación y descongelación y la alta concentración de H_2O_2. Sin embargo, muchos estímulos como toxinas, hipoxia severa o cualquier otra condición que genere caída de ATP pueden inducir un proceso necrótico que sigue pasos definidos y eventos de señalización que establecen un verdadero programa de muerte celular (Berghe et al., 2013). Además, la necrosis siempre afecta a grupos de células, mientras que la apoptosis se observa principalmente en células individuales aisladas (Kulms & Schwarz, 2000).

En contraste, la apoptosis es un proceso de muerte celular dependiente de ATP y se caracteriza por la contracción celular, el mantenimiento de la integridad de la membrana plasmática, la condensación de la cromatina, la fragmentación nuclear y la activación de una familia de proteasas dirigidas por aspartato que contienen cisteína llamadas caspasas (Lemasters 1999). La apoptosis está caracterizada por una serie de alteraciones bioquímicas, que incluyen cambios en la cinética de exposición a fosfatidilserina en la capa externa de la membrana plasmática, modificaciones en la permeabilidad de la membrana mitocondrial, liberación de proteínas mitocondriales, activación dependiente de caspasas y translocación nuclear de DNAasa activada por caspasas, que resulta en la escisión del ADN internucleosomal. Durante el proceso de apoptosis se manifiestan cambios morfológicos en la célula que incluyen la formación de vacuolas, contracción celular, fragmentación nuclear, condensación de la cromatina y fragmentación del ADN cromosómico. Como consecuencia de estas alteraciones, una célula apoptótica tiene un menor tamaño, un citoplasma más denso, y las organelas más empaquetadas (Elmore, 2007). Básicamente, no hay reacción inflamatoria asociada con el proceso de apoptosis ni con la eliminación de células apoptóticas debido a que: (1) las células apoptóticas no liberan sus constituyentes celulares en el tejido intersticial circundante; (2) son fagocitadas rápidamente por las células circundantes; y, (3) las células circundantes no

producen citoquinas antiinflamatorias (Kurosaka et al. 2003) (Figura 5.3). *In vivo*, la muerte celular necrótica típicamente induce inflamación, mientras que la muerte celular apoptótica no lo hace (Proskuryakov y Gabai, 2010).

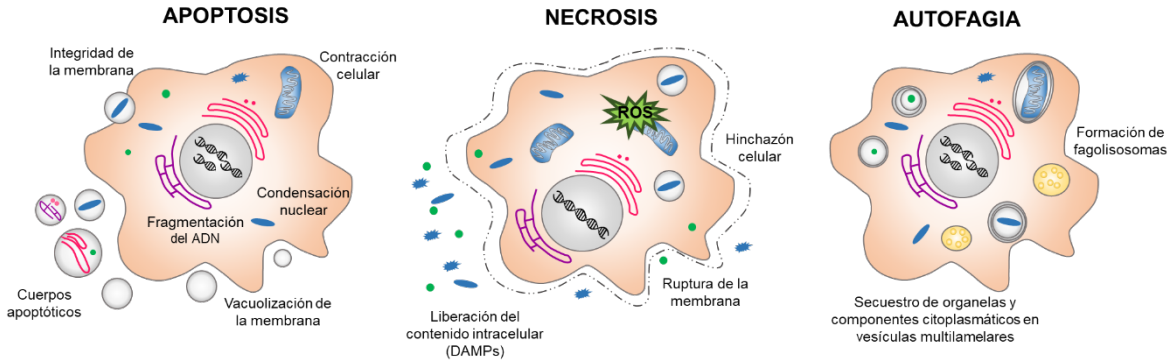


Figura 5.3 Características morfológicas de la muerte celular por apoptosis, necrosis y autofagia. Modificado a partir de Guo, 2014 (Guo, Liu, & Bartlett, 2014).

Finalmente, la muerte celular por autofagia se caracteriza por el secuestro de porciones del citoplasma y organelas en vesículas dobles o multilamelares que tras su fusión con los lisosomas forman un autofagosoma para su posterior degradación (Noda et al., 2002). En cierto sentido, la célula se "canibaliza" a sí misma mediante un proceso dependiente tanto de la síntesis continua de proteínas como de la presencia de ATP. La autofagia se considera la principal vía inducible para el recambio general de componentes citoplasmáticos y como mecanismo de supervivencia en ambientes deficientes de nutrientes u O_2 (Elmore, 2007). Cuando se inhibe la apoptosis, la autofagia prolongada puede inducir necrosis (Walsh y Edinger, 2010). La muerte celular autofágica se caracteriza por la vacuolización del citoplasma sin condensación de cromatina. Las células que mueren por autofagia pueden no atraer fagocitos, a diferencia de las células apoptóticas que se eliminan mediante la degradación lisosomal (Orrenius et al, 2011).

La viabilidad de las células Sk-Mel-28 expuestas a IMQ libre y nanovesículas vacías y con IMQ se evaluó mediante dos ensayos complementarios: el ensayo de MTT y la liberación extracelular de la enzima citoplasmática soluble LDH. Mientras que el ensayo de MTT mide cambios en la actividad de la enzima mitocondrial succinato-deshidrogenasa, la liberación al medio extracelular de LDH revela un incremento en la permeabilidad de la

membrana plasmática y sirve como indicador de muerte celular lítica. El método de MTT es un ensayo de actividad metabólica, por lo que células en apoptosis temprana pueden dar valores de viabilidad altos similares a las células control. El método de LDH, por otro lado, es más indicativo de un proceso de necrosis o apoptosis tardía, donde las células se hinchan y pierden la integridad de la membrana antes de estar metabólicamente inactivas o de morir, liberando el contenido intracelular al medio externo (Lekshmi et al, 2017).

Los resultados mostraron que, tras 24 h de incubación, IMQ no redujo la viabilidad por MTT, pero se observó 30 % liberación de LDH a 100 μg/ml IMQ (Figuras 5.4.A y B), mostrando un proceso temprano de permeabilización de la membrana plasmática. Tras 48 h de incubación, IMQ redujo la viabilidad determinada por MTT en forma dosis dependiente; disminuyendo un 50% la viabilidad celular (Figura 5.4.C), y produciendo la liberación del 100 % de LDH (Figura 5.4.D) a 100 μg/ml IMQ.

Tras 24 h de incubación, mientras que LUD vacío (LUD*) no disminuyó significativamente la viabilidad celular por MTT ni produjo la liberación de cantidades significativas de LDH, LUD_1 y LUD_2 lo hicieron de forma dosis dependiente, reduciendo ~ 50 % la viabilidad y liberando 80-90 % de LDH a 250 μg/ml PL -13 μg/ml IMQ para LUD_1 y 500 μg/ml PL-123 μg/ml IMQ para LUD_2 (Figuras 5.4.A y B). Tras 48 h de incubación, tanto LUD* como LUD_1 y LUD_2 independientemente de la concentración redujeron 50-60 % la viabilidad celular por MTT y liberaron 75-100 % LDH. Estos resultados indican que, tras 24 h, la incorporación de IMQ en LUD_1 incrementó la toxicidad del IMQ, mientras que la asociación externa del IMQ a la matriz no indujo mayor toxicidad.

Tras 24 h de incubación, tanto AUD vacíos (AUD*) como AUD conteniendo IMQ (AUD_1) disminuyeron ~ 40 % la viabilidad determinada por MTT a 500 μg/ml PL - 17 μg/ml IMQ y produjeron la liberación de 40-80 % de LDH en todas las concentraciones; sorprendentemente AUD_2 no redujo la viabilidad por MTT, pero indujo la liberación de 40-60 % de LDH (Figuras 5.4.A y B). Tras 48 h de incubación, sin embargo, todas las muestras, independientemente de la

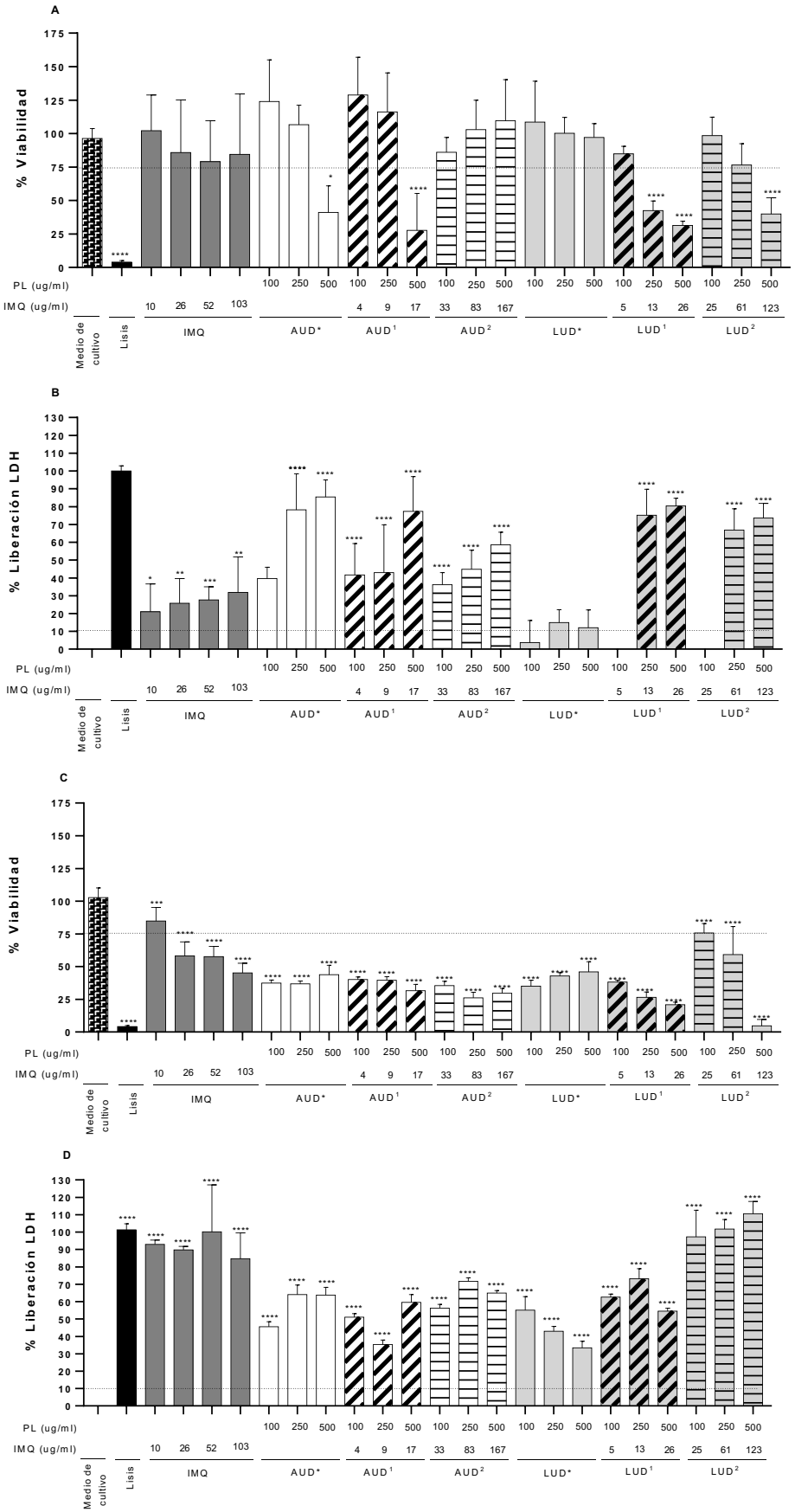


Figura 5.4. Viabilidad de células Sk-Mel-28 tras 24 h (A y B) y 48 h (C y D) de incubación, con nanovesículas vacías, IMQ, AUD*, AUD_1, AUD_2, LUD*, LUD_1 y LUD_2, determinada por ensayos de MTT (A y C) y LDH (B y D). Los valores se expresan como media ± DE (n = 2).

concentración, redujeron en igual magnitud (40-50 %) la viabilidad y produjeron la liberación de 50-70 % LDH (Figura 5.4.C y D). Estos resultados indican, por un lado, que las matrices lipídicas *per se* serían las responsables de la toxicidad y no el IMQ incorporado o asociado; y, por otro lado, que la asociación externa del IMQ retrasaría el efecto citotóxico de AUD_2.

Tras 24 h observamos los siguientes ordenes generales de toxicidad: AUD* > LUD* (MTT y LDH); LUD_1 ~ LUD_2 > LUD > IMQ (MTT y LDH); AUD ~ AUD_1 > AUD_2 > IMQ (MTT y LDH)

5.3.2 Captura celular

A continuación, evaluamos la captura de las nanovesículas por parte de las células Sk-Mel-28 por citometría de flujo tras 3 h de incubación. Para ello, en primer lugar, las formulaciones se marcaron en la membrana con el análogo lipídico RhPE. En la tabla 5.2 se muestra que la incorporación de RhPE no produjo cambios significativos en los parámetros estructurales respecto de las nanovesículas sin RhPE. La Tabla 5.3 muestra las relaciones RhPE/PL de todas las formulaciones. Las células Sk-Mel-28 no poseen el receptor endosomal TLR7, por lo que en este caso no fue necesario estudiar la disrupción de las vesículas mediante el agregado del par fluoróforo-*quencher* HPTS-DPX

Tabla 5.2. Características estructurales de las nanovesículas marcadas con RhPE.

Formulación	Tamaño medio (nm ± DE)	PdI ± DE	Potencial Z (mV ± DE)	Concentración PL (mg/ml)	Concentración IMQ (mg/ml)
AUD*-RhPE	207	0,294	-32	27,06	-
AUD_1-RhPE	277	0,312	-31	35,2	1,2
AUD_2-RhPE	-	-	-	6	1,9
LUD*-RhPE	245	0,305	-29	29,2	-
LUD_1-RhPE	226	0,252	-18	35,3	0,7
LUD_2-RhPE	-	-	-	6	1,5

Tabla 5.3 Concentración de PL y RhPE de las nanovesículas marcadas con las sondas fluorescentes.

Formulación	PL (mg/ml)	RhPE µg/ml	Rho /PL (µg/mg)
AUD*-RhPE	27,06	11,77	0,43
AUD_1-RhPE	35,2	12,22	0,35
AUD_2-RhPE	6	2,24	0,37
LUD*-RhPE	29,2	10,25	0,35
LUD_1-RhPE	35,3	15,21	0,43
LUD_2-RhPE	6	3,21	0,54

Los resultados mostraron en primer lugar que los arqueosomas ultradeformables (AUD*, AUD_1 y AUD_2) fueron más capturados que los liposomas ultradeformables (LUD*, LUD_1 y LUD_2). La captura de AUD*, AUD_1 y AUD_2 fue 9, 5 y 3 veces mayor que la correspondiente a LUD*, LUD_1 y LUD_2, respectivamente. Por otro lado, la incorporación de IMQ indujo un incremento en la captura tanto de AUD como de LUD; mientras que la asociación externa de IMQ no modifico significativamente la captura (Figura 5.5).

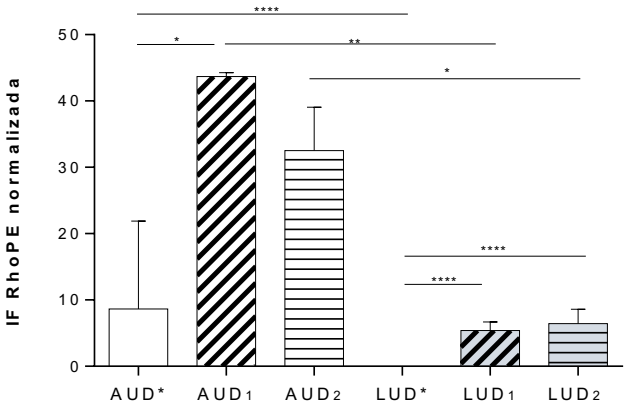


Figura 5.5 Captura celular en células Sk-Mel-28 luego de 3 h de incubación.

Por otro lado, se observó una relación directa entre captura y toxicidad de las nanovesículas vacías AUD* y LUD*, siendo mayores ambos parámetros para AUD* que para LUD*. Del mismo modo, la mayor captura de LUD_1 y LUD_2 en comparación con LUD*, se correlacionó con una mayor toxicidad de estas

nanovesículas respecto de LUD* vacíos. Para AUD, no se observó una relación directa.

5.3.3 Determinación de apoptosis/necrosis

A continuación, evaluamos la capacidad de IMQ, LUD_2 y AUD_2 de inducir apoptosis y necrosis en las células Sk-Mel-28. En principio utilizamos los datos de captura celular obtenidos anteriormente y evaluamos cambios en el *forward y side scatter* (FSC y SSC, respectivamente) obtenidos de citometría de flujo como indicativo de inducción de dichos mecanismos de muerte. La luz dispersada por las células cuando son interceptadas por un haz de láser en el citómetro de flujo proporciona información sobre el tamaño y la complejidad celular. La dispersión frontal de la luz (detectada en línea con el haz incidente, *Forward Scatter*, FSC), se correlaciona proporcionalmente con el volumen celular, mientras que la dispersión lateral (detectada perpendicularmente al haz incidente, *Side Scatter*, SSC) se correlaciona proporcionalmente con la complejidad estructural, la que está relacionada con la forma del núcleo, la cantidad y tipo de gránulos citoplasmáticos, o la rugosidad de la membrana (Salzman, 1990). La muerte celular por necrosis se asocia con un aumento inicial y luego una rápida disminución de la capacidad de las células para dispersar la luz en ambas direcciones (FSC y SSC). Esta variación en FSC y SSC refleja un aumento inicial en el volumen celular seguido luego de la pérdida de la integridad de la membrana y de los componentes de la célula. En cambio, durante la apoptosis, la reducción del volumen celular, la condensación de la cromatina y la fragmentación del núcleo se correlacionan con una disminución del FSC y un aumento del SSC (Darzynkiewicz et al., 1997).

Los resultados mostraron que las nanovesículas vacías (LUD* y AUD*) no produjeron variaciones del SSC ni del FSC (Figura 5.6). Sin embargo, la incubación con las nanovesículas con IMQ produjo algunas variaciones. LUD_1 produjo un aumento tanto del SSC como del FSC, mientras que LUD_2 sólo incrementó el % de células en SSC, ya que FSC no varió significativamente respecto a las células control. A pesar de que no se observó una disminución en FSC, podría considerarse que la incubación con LUD_2 produciría un proceso de apoptosis.

Por otro lado, AUD_1 y AUD_2 produjeron un aumento en el % de células tanto en SSC como en FSC lo que refleja un aumento tanto de la complejidad como del volumen celular. Esto podría relacionarse con un inicio de muerte por necrosis.

A continuación, determinamos el grado de apoptosis/necrosis inducido por IMQ, LUD_2 y AUD_2 mediante una triple tincion de las células con YO-PRO,

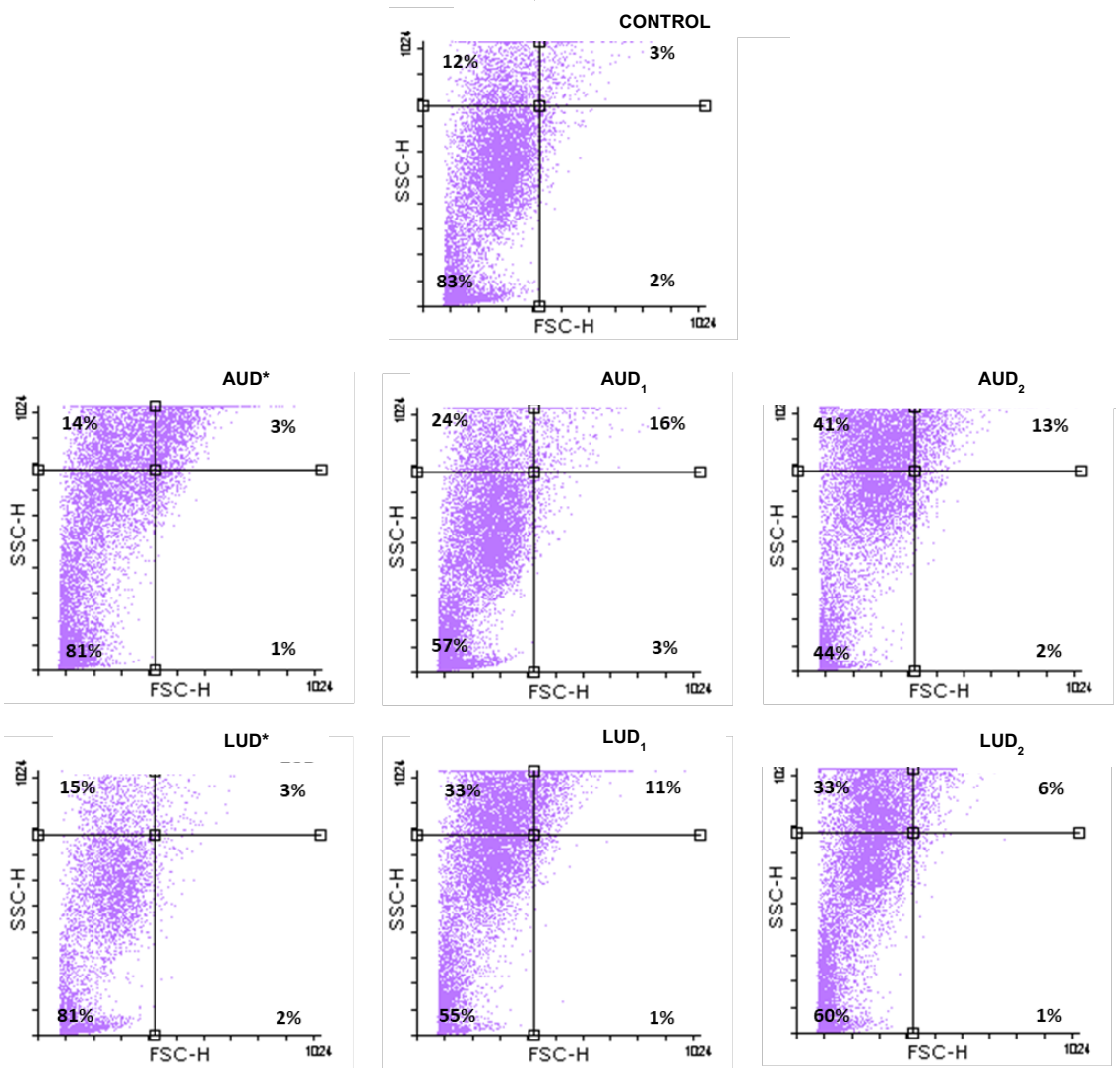


Figura 5.6 Estudio de las variaciones de tamaño y granularidad de las muestras a partir de la observación de cambios en FSC y SSC en células sin tratar Y células tratadas con AUD*, AUD_1 , AUD_2 y LUD*, LUD_1 y LUD_2

IP y Hoechst tras 24 h de incubaciòn. Seleccionamos 24 h, ya que los niveles de toxicidad revelados tras 48 h de incubaciòn no permitirían ver la inducción temprana de estos procesos. Por otro lado, solo seleccionamos las muestras

LUD_2 y AUD_2, ya que estas fueron las que mostraron mayor actividad inmunomoduladora en comparación con LUD_1 y AUD_1 (**Capitulo 3 y 4**)

Durante la apoptosis temprana la membrana citoplasmática se vuelve levemente permeable. Ciertos colorantes como el fluoróforo YO-PRO pueden entrar en las células apoptóticas, mientras que otros colorantes como el IP no pueden. Por otro lado, cuando la membrana se encuentra totalmente dañada y las células están en un proceso de necrosis o de apoptosis tardía, IP puede ingresar y ser retenido por la célula (Boffa et al., 2005). Por otra parte, el colorante Hoechst puede permear a través de la membrana plasmática y unirse al surco menor de la doble hebra de ADN. Sin embargo, en procesos de apoptosis el ADN se condensa y Hoechst tiñe la cromatina de manera más brillante que como tiñe a la cromatina de células no-apoptóticas.

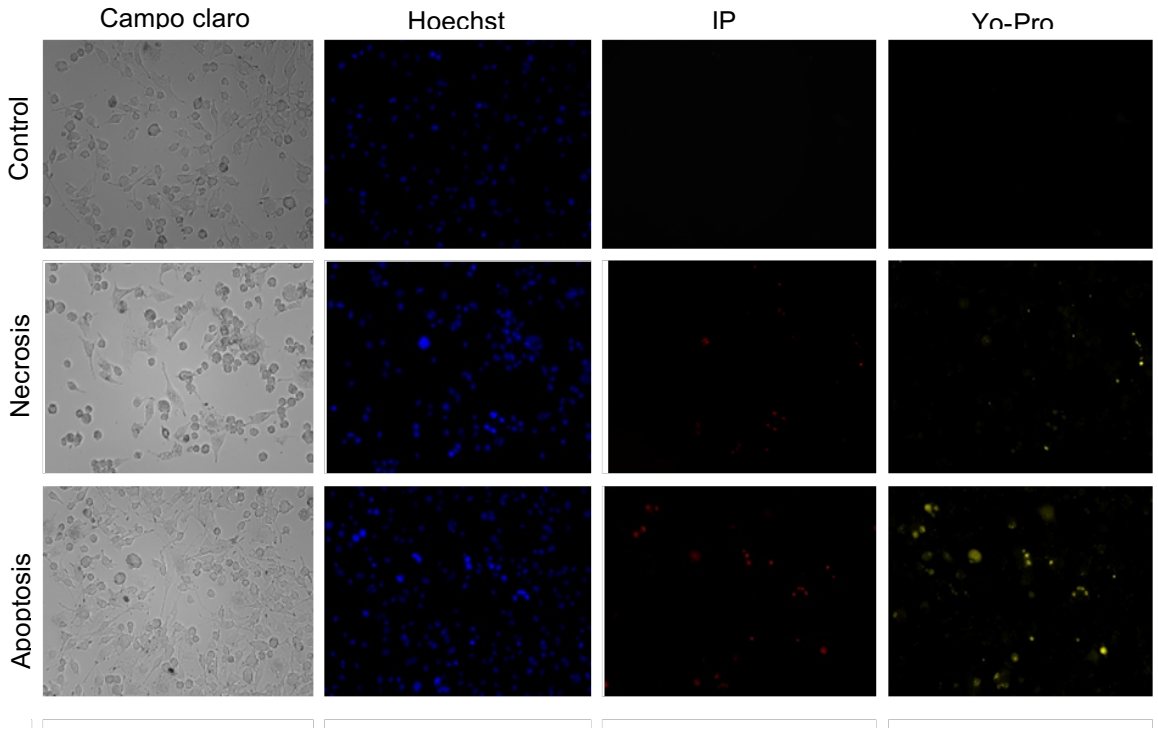


Figura 5.7 Imágenes de microscopia de fluorescencia de células SK-Mel-28 teñidas con YO-PRO, IP y Hoechst luego de haber sido incubadas con H_2O_2 durante 2 h, con luz UV con una potencia de 44 mJ/cm^2 o sin tratamiento (Control).

Las células control, incubadas con medio de cultivo por 24 h mostraron su núcleo marcado únicamente con Hoechst, de un azul no muy brillante (Figura 5.7). El H_2O_2 es un agente oxidante fuerte que induce muerte celular por necrosis (Tochigi et al., 2013). Tras 2 h de incubación de las células Sk-Mel-28 con 6,4 mM H_2O_2 observamos un incremento en la permeabilidad de la membrana

plasmática permitiendo el paso de IP y YO-PRO, por lo que las células se vieron marcadas con los 3 colorantes (Figura 5.7). El análisis de las intensidades de fluorescencia mostró que el 64 % de células estaban necróticas mientras que el resto (36 %) estaba en apoptosis (Figura 5.11). Por otra parte, Saladi et al., 2013 indujeron apoptosis en células SK-Mel-5 (provenientes de un ganglio axilar metastásico) luego de la irradiación con UVB con una potencia de 50 mJ/cm^2. Tras la irradiación de las células Sk-Mel-28 con una potencia de 44 mJ/cm^2 (Lampara Philips TL-D Actinic BL) observaron células marcadas tanto con YO-PRO como con IP (Figura 5.7). El análisis de la fluorescencia mostró un 14 % de células en apoptosis temprana, mientras que el 83% restante se halló en apoptosis tardía/necrosis.

En las Figuras 5.8, 5.9 y 5.10 se muestran las microscopías de fluorescencias de las células incubadas con IMQ, LUD_2 y AUD_2, respectivamente.

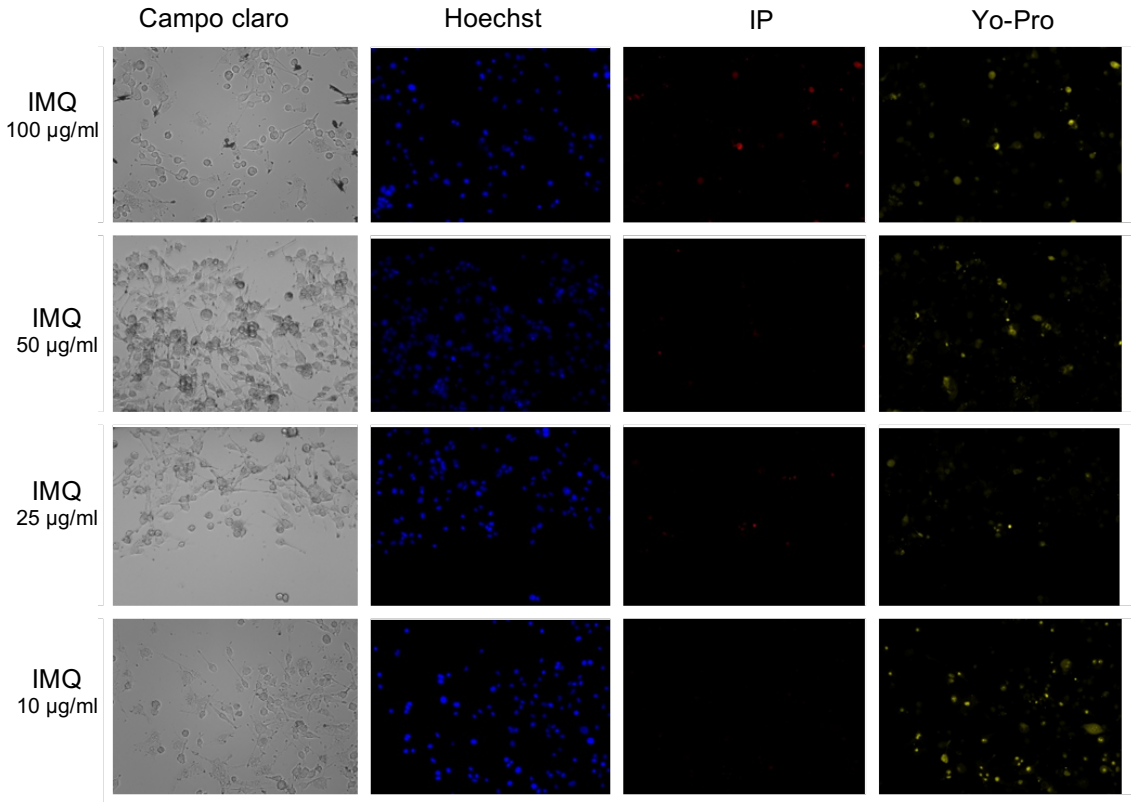


Figura 5.8 Imágenes de microscopia de fluorescencia de células SK-Mel-28 teñidas con YO-PRO, IP y Hoechst luego de haber sido incubadas con IMQ durante 24 h a 100, 50, 25 o 10 µg/mL. Aumento 10 X

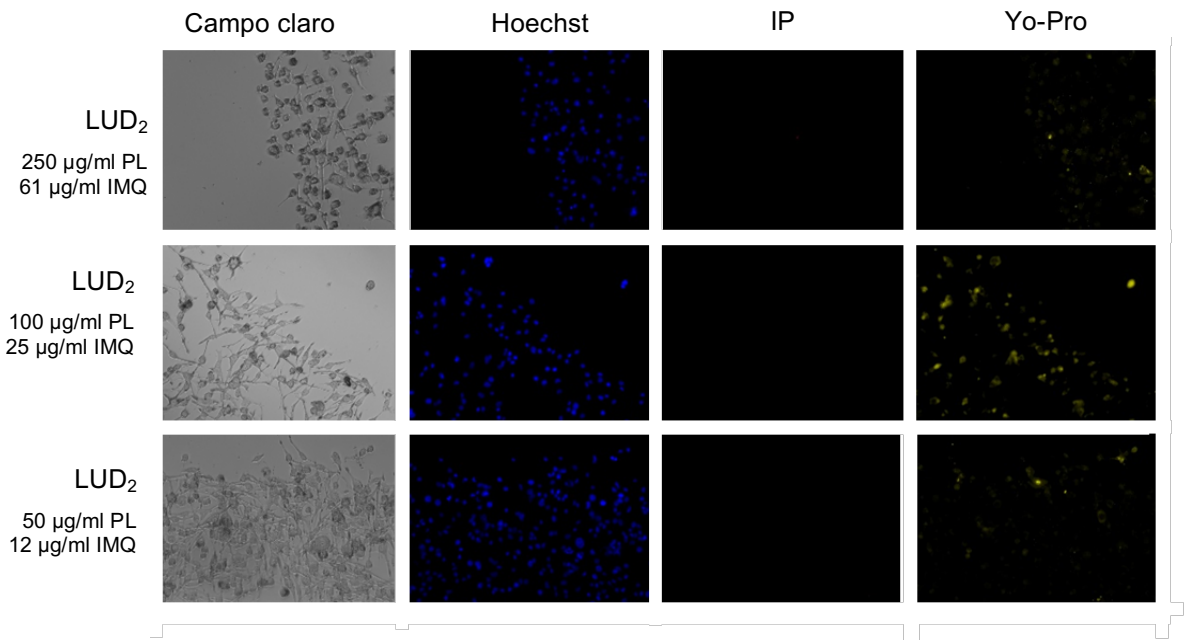


Figura 5.9 Imágenes de microscopia de fluorescencia de células SK-Mel-28 teñidas con YO-PRO, IP y Hoechst luego de haber sido incubadas con LUD_2 durante 24 h. Aumento 10X

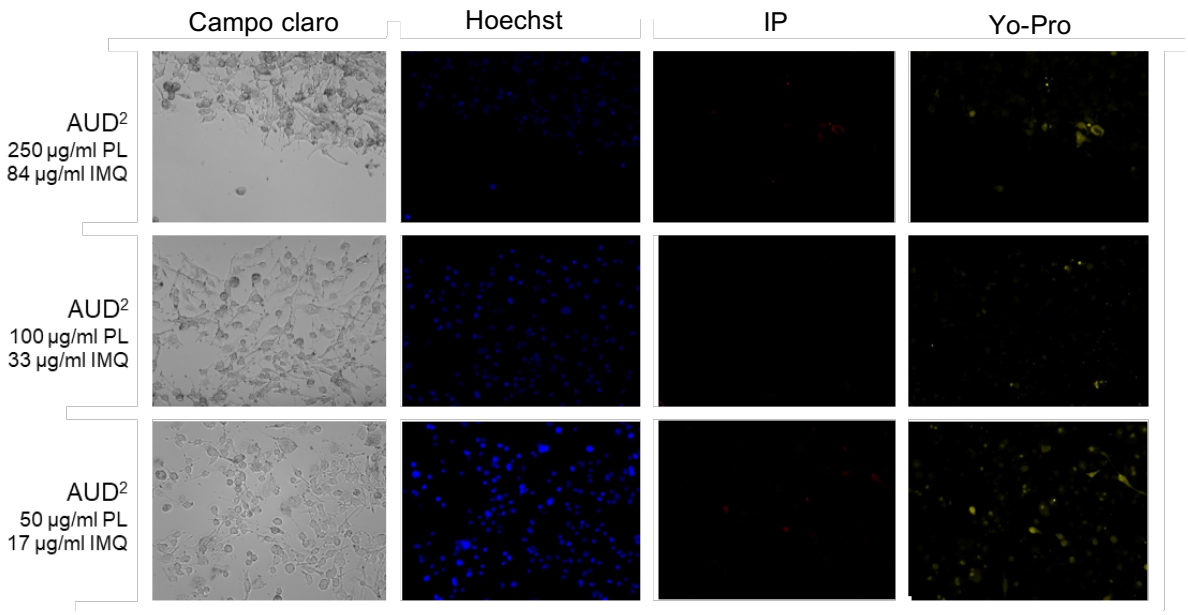


Figura 5.10 Imágenes de microscopia de fluorescencia de células SK-Mel-28 teñidas con YO-PRO, IP y Hoechst luego de haber sido incubadas con AUD_2 durante 24 h. Aumento 10X

IMQ indujo mayormente apoptosis independientemente de la concentración, con un incremento de células necróticas concentración dependiente. El porcentaje de células apoptóticas fue 69 y 74 %, mientras que el de necróticas ascendió de 7 a 24 % y el número de células de viables descendió de 24 a 2 % a 10 y 100 µg/ml IMQ, respectivamente. Las células en

apoptosis/necrosis inducido por IMQ, LUD_2 y AUD_2 mediante una triple tinción de las células con YO-PRO, IP y Hoechst tras 24 h de incubación. Seleccionamos 24 h, ya que los niveles de toxicidad revelados tras 48 h de incubación no permitirían ver la inducción

apoptosis temprana detectadas aquí estarían metabólicamente activas reduciendo el MTT (tras 24 h de incubación) y por lo tanto generando señal de viabilidad. En concordancia, una respuesta citotóxica rápida suele indicar necrosis mientras que una respuesta tardía (citotoxicidad revelada tras 48 h) se halla relacionada con apoptosis.

Tras la incubación con AUD_2 y LUD_2 a 500 µg/ml PL prácticamente no se observaron células en los pocillos. La disminución de la viabilidad celular registrada por MTT y LDH en dichas condiciones, dejó un pequeño número de células en los pocillos que seguramente fueron eliminadas en los sucesivos lavados con PBS.

LUD_2 indujo también mayormente apoptosis. El porcentaje de células apoptóticas fue de 70 y 75 %, el de necróticas 11 y 15 %, mientras que el número de células viables fue de 19 y 10 % a 50 y 250 µg/ml PL - 12 y 60 µg/ml IMQ, respectivamente.

AUD_2, en contraste indujo apoptosis y necrosis en proporciones relativamente similares. El porcentaje de células apoptóticas ascendió de 46 a 56 %, el de necróticas fue de 37 y 42 %, mientras que el número de células viables descendió de 16 a 2 % a 50 y 250 µg/ml PL - 17 y 84 µg/ml IMQ, respectivamente.

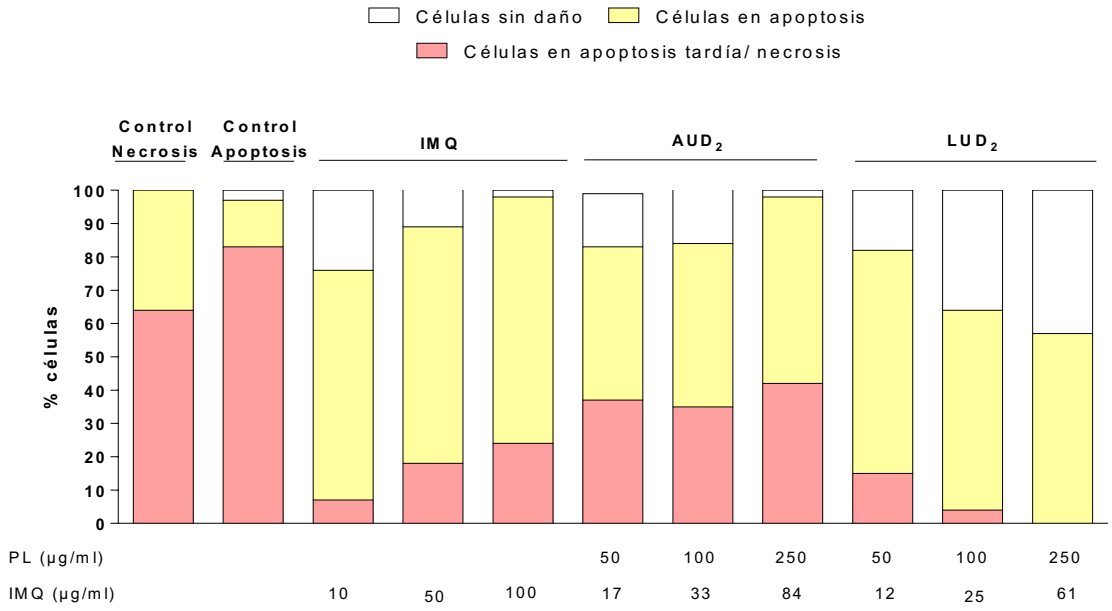


Figura 5.11 Porcentaje de células viables, apoptóticas o necróticas luego de una incubación de 24 h con IMQ 10, 50 y 100 µg/ml y AUD_2 y LUD_2 50, 100 y 250 µg/ml PL

5.4 Discusión

Existe la necesidad de contar con nuevas herramientas terapéuticas para el tratamiento del melanoma. La aplicación tópica localizada permitiría el uso de altas concentraciones de agentes terapéuticos con mínima toxicidad sistémica y podría ser útil para el tratamiento de lesiones no quirúrgicas, lesiones tempranas o bordes de lesiones postcirugía.

La acción de IMQ sobre el melanoma incluye al menos 3 procesos: inducción de una respuesta inmunológica antitumoral medida por células inflamatorias; la actividad pro-apoptotica directa y actividad antiangiogénica.

Varios trabajos han reportado la actividad directa del IMQ sobre células de melanoma *in vitro*. Schon et al 2004, hallaron que tras 24 h de incubación con IMQ 50 µg/ml sobre 4 líneas de melanoma humano, Mel-HO, Mel-2A, A375 y MeWo, no se produce liberación significativa de LDH al medio de cultivo; pero

se reduce el número de células de las líneas A375 y Mel-HO, alcanzando 54 y 75 % de reducción respectivamente tras 48 h de incubación (Schön et al., 2004). Asimismo, observaron que IMQ genera efectos pro-apoptóticos directos en las dos líneas celulares sensibles (Mel-HO y A375) de forma concentración dependiente a través de la ruta de las caspasas. En contraste, en melanocitos normales o en las líneas celulares de melanoma Mel-2A o MeWo, la inducción de la apoptosis con IMQ es notablemente más débil, lo que sugiere una resistencia a la inducción de apoptosis por IMQ en estas líneas celulares.

Por otro lado, Jung et al., 2014, determinaron la viabilidad celular utilizando el reactivo WST-1 (similar al MTT) sobre las líneas celulares de melanoma Sk-Mel-28 y Sk-Mel-24 (melanoma proveniente también de ganglio linfático metastásico). Hallaron una IC50 (concentración de IMQ que disminuye la viabilidad celular al 50%) de 56,32 µg/ml y 62,36 µg/ml para células Sk-Mel-28 y Sk-Mel-24, respectivamente tras 24 h de incubación (Jung et al., 2014).

El Khauttouti et al., 2016 determinaron la viabilidad celular por el método de MTT sobre la línea de melanoma humano MV3 (aislado de ganglio linfático metastásico). Hallaron que 50 µg/ml de IMQ disuelto en HCl 25% induce 25 % y 40 % de reducción de la viabilidad celular tras 24 y 48 h de incubación, respectivamente. Utilizando los marcadores de apoptosis/necrosis Anexina/IP, hallaron 17% de las células en apoptosis temprana (El-Khattouti et al., 2016).

Recientemente, Cho et al., 2017 mostraron que el tratamiento con IMQ induce la muerte de células de melanoma murino B16F1 y B16F10 vía autofagia. 24 h tras el tratamiento con IMQ, se observó una reducción significativa en la numero de células viables medido con el reactivo con WST-1 (Cho et al., 2017).

En su conjunto estos resultados sugieren que las líneas celulares de melanoma poseen diferente sensibilidad al IMQ, probablemente debido a su diferente origen y expresión génica (por ejemplo Bcl-2 está involucrado en la susceptibilidad, las líneas de melanoma resistentes a IMQ exhibieron una expresión constitutiva de Bcl-2 notablemente más alta) y que el IMQ induce apoptosis, aunque la muerte por autofagia solo recientemente se exploró hallándose esta forma de muerte involucrada en el mecanismo de acción del IMQ.

En este trabajo, mostramos que IMQ redujo 50 % viabilidad, produjo un 100 % liberación LDH a 100 μg/ml tras 48 h de incubación y generó apoptosis sobre células de melanoma humano Sk-Mel-28. La incorporación de IMQ en LUD* y AUD* modificó su farmacodinamia de dos modos diferentes. Por un lado, la incorporación de IMQ en LUD* incrementó la toxicidad del IMQ (< 50 % viabilidad y 80 % liberación LDH tras 24 h a 13 μg/ml IMQ) conservando la capacidad de inducción de apoptosis del IMQ. Esto podría deberse a la mayor cantidad de IMQ que accedería al interior celular cuando es incorporado en estas nanovesículas respecto de su difusión pasiva a través de la membrana plasmática del IMQ en su forma libre.

Por otro lado, la incorporación de IMQ en AUD* no incrementó la toxicidad del IMQ, sin embargo, produjo una toxicidad intrínseca de las matrices lipídicas (mayor a la generada por LUD_1 y LUD_2) con un incremento de la proporción de células necróticas.

La mayor captura de AUD* en comparación con LUD*, sumado al contenido de ácido linoleico y arqueolípidos podrían estar relacionados con esta mayor toxicidad y disrupción de la integridad de la membrana plasmática. Las formulaciones de arqueosomas ultradeformables (AUD*, AUD_1 y AUD_2) se preparan con 30 μg/ml de ácido linoleico. Concentraciones de 200 μM de ácido linoleico es tóxico para las células Sk-Mel-28 debido a la pérdida de integridad de la membrana luego de 24 h de incubación (de Sousa et al., 2005). Adicionalmente, se ha hallado que altas concentraciones de ácidos grasos inducen muerte celular por apoptosis, y, en concentraciones aún mayores, promueven necrosis (Finstad et al., 1998). Si bien la concentración de ácido linoleico incubado con las células como AUD* es significativamente menor que la reportada en los trabajos mencionados (0,36; 0,72; 1,8; y 3,6 μM para 50, 100, 250 y 500 μg/ml de PL, respectivamente), es posible que la presencia del ácido graso esté afectando la integridad de la membrana celular, permitiendo la rápida salida de LDH. Si bien será necesario realizar estudios sobre melanocitos normales, y ampliar el rango de concentraciones ensayadas en queratinocitos, en principio podemos decir que la toxicidad de AUD* y AUD_2 sobre las células de melanoma Sk-Mel-28 fue mayor a la hallada sobre queratinocitos (Capítulo 3): tras 48 h de incubación con 100 μg/ml PL de AUD* y AUD_2 redujeron 60%

viabilidad de las células Sk-Mel-28, mientras que redujeron 0-25 % AUD* y AUD_2, respectivamente, la viabilidad de células HaCaT.

El mecanismo o forma de ingreso celular influye sobre la actividad biológica del IMQ y su análogo resiquimod (Schön et al, 2004), mientras IMQ genera apoptosis, resiquimod no tiene actividad sobre células de melanoma A375 y Mel-HO. La modificación de la forma de ingreso del IMQ asociado a AUD* podría contribuir al cambio en su actividad antitumoral respecto de IMQ libre.

La baja inducción de apoptosis de los melanomas malignos, mediante receptores de muerte de la membrana plasmática, se halla asociada a la resistencia a drogas de este tipo de tumores (Helmbach et al, 2003), por lo que inducir la muerte de estas células, por mecanismos alternativos podría resultar en una mejora de los tratamientos.

En este trabajo no analizamos los efectos del IMQ incorporado en AUD* o LUD* sobre el sistema inmune ni la angiogénesis en el contexto del melanoma. Sin embargo, previamente observamos que AUD_2 produce la liberación de IL-6 y TNF-α por parte de macrófagos e induce la producción de INF-γ por esplenocitos. Tanto IL-6 como TNF-α cumplen roles controversiales en el desarrollo del melanoma. TNF-α, identificada originalmente como una molécula citotóxica para las células tumorales (de allí su nombre), cumple diversos roles en la biología del cáncer, y ha sido asociado tanto a la inhibición como promoción del crecimiento tumoral, la inflamación y la inmunidad (Donia et al. 2016). En modelos preclínicos de melanoma, TNF-α induce invasión y angiogénesis, incrementando la diseminación tumoral y la dediferenciación lo que disminuye la sensibilidad de las células a la respuesta inmune medida por linfocitos CD8+ citotóxicos. Sin embargo, TNF-α administrado localmente en combinación con melfalan (un fármaco quimioterapéutico) es un tratamiento establecido con buenos resultados en pacientes con melanoma metastásico en tránsito (Van Horssen et al., 2006). Por otro lado, en el microentorno tumoral, IL-6 es considerada una mala señal que induce la progresión tumoral (Fisher et al., 2014). Sin embargo, recientemente emergió un rol opuesto del IL-6; se halló que IL-6 moviliza la respuesta de células T antitumorales. IL-6 cumple un rol especial en la activación, proliferación y sobrevida de los linfocitos durante la respuesta inmune antitumoral (Fisher et al., 2014).

Por otro lado, INF-γ ha mostrado estar asociado a la restauración/incremento de la inmunogenicidad antitumoral por ejemplo upregulando la expresión de moléculas del MHC (Donia et al., 2013).

En conclusión, los efectos citotóxicos directos y en cierto punto relativamente tipo celular específicos sobre las células de melanoma Sk-Mel-28, sumado a la mayor acumulación de IMQ en el *SC* y la capacidad de inducir la producción de INF-γ y citoquinas proinflamatorias localmente (IL-6 y TNF-α), postulan a los AUD_2 como posible candidato para futuras investigaciones como terapia *adyuvante* tópica de la terapia anti-melanoma.

5.5 Referencias

Adams, S., Kozhaya, L., Martiniuk, F. et al., (2012). Topical TLR7 agonist imiquimod can induce immune-mediated rejection of skin metastases in patients with breast cancer. Clinical Cancer Research, 18(24), 6748-6757.

Akhtar, N., & Khan, R. A. (2016). Liposomal systems as viable drug delivery technology for skin cancer sites with an outlook on lipid-based delivery vehicles and diagnostic imaging inputs for skin conditions'. Progress in lipid research, 64, 192-230.

Akhtar, N., Ahad, A., Khar, R. K. et al., (2011). The emerging role of P-glycoprotein inhibitors in drug delivery: a patent review. Expert opinion on therapeutic patents, 21(4), 561-576.

Alam, M., Goldberg, L. H., Silapunt, S. et al., (2011). Delayed treatment and continued growth of nonmelanoma skin cancer. Journal of the American Academy of Dermatology, 64(5), 839-848.

Ananthaswamy, H. N., & Pierceall, W. E. (1990). Molecular mechanisms of ultraviolet radiation carcinogenesis. Photochemistry and photobiology, 52(6), 1119-1136.

Anthony, M. L. (2000). Surgical treatment of nonmelanoma skin cancer. AORN journal, 71(3), 550-564.

Ascierto, P. A., Grimaldi, A. M., Anderson, A. C. et al., (2014). Future perspectives in melanoma research: meeting report from the" Melanoma Bridge", Napoli, December 5th-8th 2013: BioMed Central.

Aspord, C., Tramcourt, L., Leloup, C. et al., (2014). Imiquimod inhibits melanoma development by promoting pDC cytotoxic functions and impeding tumor vascularization. Journal of investigative dermatology, 134(10), 2551-2561.

Barenholz, Y. (2001). Liposome application: problems and prospects. Current opinion in colloid & interface science, 6(1), 66-77.

Berghe, T. V., Grootjans, S., Goossens, V. et al., (2013). Determination of apoptotic and necrotic cell death in vitro and in vivo. Methods, 61(2), 117-129.

Boffa, D. J., Waka, J., Thomas, D. et al., (2005). Measurement of Apoptosis of Intact Human Islets by Confocal Optical Sectioning and Stereologic Analysis of YO-PRO-1–Stained Islets. Transplantation, 79(7), 842-845.

Bong, A. B., Bonnekoh, B., Franke, I. et al., (2002). Imiquimod, a topical immune response modifier, in the treatment of cutaneous metastases of malignant melanoma. Dermatology, 205(2), 135-138.

Cho, J. H., Lee, H.-J., Ko, H.-J. et al., (2017). The TLR7 agonist imiquimod induces anti-cancer effects via autophagic cell death and enhances anti-tumoral and systemic immunity during radiotherapy for melanoma. Oncotarget, 8(15), 24932.

Cho, Y., Challa, S., Moquin, D. et al., (2009). Phosphorylation-driven assembly of the RIP1-RIP3 complex regulates programmed necrosis and virus-induced inflammation. Cell, 137(6), 1112-1123.

Cnop, M., Hannaert, J. C., Hoorens, A. et al., (2001). Inverse relationship between cytotoxicity of free fatty acids in pancreatic islet cells and cellular triglyceride accumulation. Diabetes, 50(8), 1771-1777.

Cotter, M. A., McKenna, J. K., & Bowen, G. M. (2008). Treatment of lentigo maligna with imiquimod before staged excision. Dermatologic surgery, 34(2), 147-151.

Cummings, B. S., Wills, L. P., & Schnellmann, R. G. (2012). Measurement of cell death in Mammalian cells. Current protocols in pharmacology, 56(1), 12.18. 11-12.18. 24.

Darzynkiewicz, Z., Juan, G., Li, X. et al., (1997). Cytometry in cell necrobiology: analysis of apoptosis and accidental cell death (necrosis). Cytometry: The Journal of the International Society for Analytical Cytology, 27(1), 1-20.

Davids, L., & Kleemann, B. (2011). Combating melanoma: the use of photodynamic therapy as a novel, adjuvant therapeutic tool. Cancer treatment reviews, 37(6), 465-475.

de Sousa Andrade, L. N., De Lima, T. M., Curi, R. et al., (2005). Toxicity of fatty acids on murine and human melanoma cell lines. Toxicology in vitro, 19(4), 553-560.

Degterev, A., Huang, Z., Boyce, M., Li, Y. et al., (2005). Chemical inhibitor of nonapoptotic cell death with therapeutic potential for ischemic brain injury. Nature chemical biology, 1(2), 112.

Dias, M. F., de Figueiredo, B. C. P., Teixeira-Neto, J. . et al., (2018). In vivo evaluation of antitumoral and antiangiogenic effect of imiquimod-loaded polymeric nanoparticles. Biomedicine & Pharmacotherapy, 103, 1107-1114.

Donia, M., Hansen, M., Sendrup, S. L. et al., (2013). Methods to improve adoptive T-cell therapy for melanoma: IFN-γ enhances anticancer responses of cell products for infusion. Journal of Investigative Dermatology, 133(2), 545-552.

Donia, M., Kjeldsen, J. W., & Svane, I. M. (2016). The controversial role of TNF in melanoma. Oncoimmunology, 5(4), e1107699.

Drobits, B., Holcmann, M., Amberg, N. et al., (2012). Imiquimod clears tumors in mice independent of adaptive immunity by converting pDCs into tumor-killing effector cells. The Journal of clinical investigation, 122(2), 575-585.

Elder, D. (1999). Tumor progression, early diagnosis and prognosis of melanoma. Acta Oncologica, 38(5), 535-548.

El-Khattouti, A., Selimovic, D., Hannig, M. et al., (2016). Imiquimod-induced apoptosis of melanoma cells is mediated by ER stress-dependent Noxa induction and enhanced by NF-κB inhibition. Journal of cellular and molecular medicine, 20(2), 266-286.

Elmore, S. (2007). Apoptosis: a review of programmed cell death. Toxicologic pathology, 35(4), 495-516.

Fan, Q., Cohen, S., John, B., & Riker, A. I. (2015). Melanoma in situ treated with topical imiquimod for management of persistently positive margins: a review of treatment methods. The Ochsner Journal, 15(4), 443.

Filippi, A. R., Fava, P., Badellino, S. et al., (2016). Radiotherapy and immune checkpoints inhibitors for advanced melanoma. Radiotherapy and Oncology, 120(1), 1-12

Finstad, H., Myhrstad, M. W., Heimli, H. et al., (1998). Multiplication and death-type of leukemia cell lines exposed to very long-chain polyunsaturated fatty acids. Leukemia, 12(6), 921.

Fisher, D. T., Appenheimer, M. M., & Evans, S. S. (2014, February). The two faces of IL-6 in the tumor microenvironment. In Seminars in immunology (Vol. 26, No. 1, pp. 38-47). Academic Press.

Fisher, G. J., Talwar, H. S., Lin, J. et al.,. (1998). Retinoic acid inhibits induction of c-Jun protein by ultraviolet radiation that occurs subsequent to activation of mitogen-activated protein kinase pathways in human skin in vivo. The Journal of clinical investigation, 101(6), 1432-1440.

Frank, L. A., Chaves, P. S., D'amore, C. M. et al.,. (2017). The use of chitosan as cationic coating or gel vehicle for polymeric nanocapsules: Increasing penetration and adhesion of imiquimod in vaginal tissue. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, 114, 202-212.

Galluzzi, L., Bravo-San Pedro, J., Vitale, I. et al.,. (2015). Essential versus accessory aspects of cell death: recommendations of the NCCD 2015. Cell death and differentiation, 22(1), 58.

Garbe, C., & Eigentler, T. K. (2007). Diagnosis and treatment of cutaneous melanoma: state of the art 2006. Melanoma research, 17(2), 117-127.

Gaspari, A. A. (2007). Mechanism of action and other potential roles of an immune response modifier. Cutis, 79(4 Suppl), 36-45.

Geisse, J., Caro, I., Lindholm, J. et al.,. (2004). Imiquimod 5% cream for the treatment of superficial basal cell carcinoma: results from two phase III, randomized, vehicle-controlled studies. Journal of the American Academy of Dermatology, 50(5), 722-733.

Gorden, K. B., Gorski, K. S., Gibson, S. J. et al.,. (2005). Synthetic TLR agonists reveal functional differences between human TLR7 and TLR8. The Journal of Immunology, 174(3), 1259-1268.

Green, D., Dalgleish, A., Belonwu, N. et al.,. (2008). Topical imiquimod and intralesional interleukin-2 increase activated lymphocytes and restore the Th1/Th2 balance in patients with metastatic melanoma. British Journal of Dermatology, 159(3), 606-614.

Grossman, L., & Wei, Q. (1995). DNA repair and epidemiology of basal cell carcinoma. Clinical chemistry, 41(12), 1854-1863.

Guerry IV, D., Synnestvedt, M., Elder, D. E. et al.,. (1993). Lessons from tumor progression: the invasive radial growth phase of melanoma is common, incapable of metastasis, and indolent. Journal of investigative dermatology, 100(3), S342-S345.

Guo, Z. S., Liu, Z., & Bartlett, D. L. (2014). Oncolytic immunotherapy: dying the right way is a key to eliciting potent antitumor immunity. Frontiers in oncology, 4, 74.

He, S., Wang, L., Miao, L. et al.,. (2009). Receptor interacting protein kinase-3 determines cellular necrotic response to TNF-α. Cell, 137(6), 1100-1111.

Helmbach, H., Sinha, P., & Schadendorf, D. (2003). Human melanoma: drug resistance. In Chemosensitivity Testing in Oncology (pp. 93-110). Springer, Berlin, Heidelberg.

Heppt, M. V., Goldscheider, I., Tietze, J. K. et al.,. (2017). Intralesional interleukin-2 for unresectable mucosal melanoma refractory to nivolumab. Cancer Immunology, Immunotherapy, 66(10), 1377-1378.

Hesling, C., D'incan, M., Mansard, S. et al.,. (2004). In vivo and in situ modulation of the expression of genes involved in metastasis and angiogenesis in a patient treated with topical imiquimod for melanoa skin metastases. British Journal of Dermatology, 150(4), 761-767.

Hillegass, J. M., Shukla, A., Lathrop, S. A. et al.,. (2010). Assessing nanotoxicity in cells in vitro. Wiley Interdisciplinary Reviews: Nanomedicine and Nanobiotechnology, 2(3), 219-231.

Huang, S. W., Liu, K. T., Chang, C. C. et al.,. (2010). Imiquimod simultaneously induces autophagy and apoptosis in human basal cell carcinoma cells. British Journal of Dermatology, 163(2), 310-320.

Hyde, M. A., Hadley, M. L., Tristani-Firouzi, P. et al.,. (2012). A randomized trial of the off-label use of imiquimod, 5%, cream with vs without tazarotene, 0.1%, gel for the treatment of lentigo maligna, followed by conservative staged excisions. Archives of dermatology, 148(5), 592-596.

Jung, J. Y., Kim, H. S., Roh, M. R. et al.,. (2014). The effect of imiquimod on matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in malignant melanoma cell invasion. Annals of dermatology, 26(3), 363-373.

Karve, S. J., Feldman, S. R., Yentzer, B. A. et al.,. (2008). Imiquimod: a review of basal cell carcinoma treatments. 7(11):1044-1051

Kemper, K., Krijgsman, O., Cornelissen-Steijger, P. et al., (2015). Intra-and inter-tumor heterogeneity in a vemurafenib-resistant melanoma patient and derived xenografts. EMBO molecular medicine, 7(9), 1104-1118.

Kessler, D. A., Austin, R. H., & Levine, H. (2014). Resistance to chemotherapy: patient variability and cellular heterogeneity. Cancer research, 74(17), 4663-4670.

Krieger, M. L., Eckstein, N., Schneider, V. et al., (2010). Overcoming cisplatin resistance of ovarian cancer cells by targeted liposomes in vitro. International journal of pharmaceutics, 389(1-2), 10-17.

Kroemer, G., & Martin, S. J. (2005). Caspase-independent cell death. Nature medicine, 11(7), 725.

Kulms, D., & Schwarz, T. (2000). Molecular mechanisms of UV-induced apoptosis. Photodermatology, Photoimmunology & Photomedicine: Review article, 16(5), 195-201.

Kurosaka, K., Takahashi, M., Watanabe, N. et al.,. (2003). Silent cleanup of very early apoptotic cells by macrophages. The Journal of Immunology, 171(9), 4672-4679.

Lasic, D. D. (1999). Structure and Structure—Activity Relationships of Lipid-Based Gene Delivery Systems Nonviral vectors for gene therapy (pp. 69-89): Elsevier.

Lee, W.-R., Shen, S.-C., Al-Suwayeh, S. A. et al.,. (2011). Laser-assisted topical drug delivery by using a low-fluence fractional laser: imiquimod and macromolecules. Journal of Controlled Release, 153(3), 240-248.

Lemasters, J. J. (1999). V. Necrapoptosis and the mitochondrial permeability transition: shared pathways to necrosis and apoptosis. American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology, 276(1), G1-G6.

Lila, A. S. A., Doi, Y., Nakamura, K. et al.,. (2010). Sequential administration with oxaliplatin-containing PEG-coated cationic liposomes promotes a significant delivery of subsequent dose into murine solid tumor. Journal of Controlled Release, 142(2), 167-173.

Listenberger, L. L., Ory, D. S., & Schaffer, J. E. (2001). Palmitate-induced apoptosis can occur through a ceramide-independent pathway. Journal of Biological Chemistry, 276(18), 14890-14895.

Lopez, R. F. V., Lange, N., Guy, R. et al.,. (2004). Photodynamic therapy of skin cancer: controlled drug delivery of 5-ALA and its esters. Advanced drug delivery reviews, 56(1), 77-94.

Madan, V., Lear, J. T., & Szeimies, R.-M. (2010). Non-melanoma skin cancer. The Lancet, 375(9715), 673-685.

Martinez, J.-C., & Otley, C. C. (2001). The management of melanoma and nonmelanoma skin cancer: a review for the primary care physician. Paper presented at the Mayo Clinic Proceedings.

Massi, D., Brusa, D., Merelli, B., Falcone, C et al., (2015). The status of PD-L1 and tumor-infiltrating immune cells predict resistance and poor prognosis in BRAFi-treated melanoma patients harboring mutant BRAFV600. Annals of Oncology, 26(9), 1980-1987.

McCuaig, C. C., Dubois, J., Powell, J. et al.,. (2009). A phase II, open-label study of the efficacy and safety of imiquimod in the treatment of superficial and mixed infantile hemangioma. Pediatric dermatology, 26(2), 203-212.

Mir, L., Glass, L. F., Serša, G., Teissié, J. et al., (1998). Effective treatment of cutaneous and subcutaneous malignant tumours by electrochemotherapy. British journal of cancer, 77(12), 2336.

National Institutes of Health, N. (2018, Abril 2018). National Cancer Institute (NCI). Noda, T., Suzuki, K., & Ohsumi, Y. (2002). Yeast autophagosomes: de novo formation of a membrane structure. Trends in cell biology, 12(5), 231-235.

Naylor, M. F., Chen, W. R., Teague, T. K. et al.,. (2006). In situ photoimmunotherapy: a tumour-directed treatment for melanoma. British Journal of Dermatology, 155(6), 1287-1292.

Noda, T., Suzuki, K., & Ohsumi, Y. (2002). Yeast autophagosomes: de novo formation of a membrane structure. Trends in cell biology, 12(5), 231-235.

Novak, N., Yu, C.-F., Bieber, T. et al.,. (2008). Toll-like receptor 7 agonists and skin. Drug News Perspect, 21(3), 158-165.

Ostrander, D. B., Sparagna, G. C., Amoscato, A. A. et al.,. (2001). Decreased cardiolipin synthesis corresponds with cytochromec release in palmitate-induced cardiomyocyte apoptosis. Journal of Biological Chemistry, 276(41), 38061-38067.

Partl, R., Fastner, G., Kaiser, J. et al.,. (2016). KPS/LDH index: a simple tool for identifying patients with metastatic melanoma who are unlikely to benefit from palliative whole brain radiotherapy. Supportive Care in Cancer, 24(2), 523-528.

Paumen, M. B., Ishida, Y., Han, H. et al.,. (1997). Direct interaction of the mitochondrial membrane protein carnitine palmitoyltransferase I with Bcl-2. Biochemical and biophysical research communications, 231(3), 523-525.

Proskuryakov, S. Y., & Gabai, V. L. (2010). Mechanisms of tumor cell necrosis. Current pharmaceutical design, 16(1), 56-68.

Radny, P., Caroli, U., Bauer, J. et al. (2003). Phase II trial of intralesional therapy with interleukin-2 in soft-tissue melanoma metastases. British journal of cancer, 89(9), 1620.

Rehman, K., & Zulfakar, M. H. (2017). Novel fish oil-based bigel system for controlled drug delivery and its influence on immunomodulatory activity of imiquimod against skin cancer. Pharmaceutical research, 34(1), 36-48.

Saladi, S. V., Wong, P. G., Trivedi, A. R et al., (2013). BRG 1 promotes survival of UV-irradiated melanoma cells by cooperating with MITF to activate the melanoma inhibitor of apoptosis gene. Pigment cell & melanoma research, 26(3), 377-391.

Salzman, G. (1990). Light scattering and cytometry. Flow cytometry and sorting.

Sanz, A. B., Sanchez-Niño, M. D., Izquierdo, M. C. et al., (2014). Macrophages and recently identified forms of cell death. International reviews of immunology, 33(1), 9-22.

Savill, J., & Fadok, V. (2000). Corpse clearance defines the meaning of cell death. Nature, 407(6805), 784.

Schön, M. P., Wienrich, B. G., Drewniok, C. et al., (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.

Schön, M., Bong, A. B., Drewniok, C, C. et al., (2003). Tumor-selective induction of apoptosis and the small-molecule immune response modifier imiquimod. Journal of the National Cancer Institute, 95(15), 1138-1149.

Seidel, J. A., Otsuka, A., & Kabashima, K. (2018). Anti-PD-1 and Anti-CTLA-4 Therapies in Cancer: Mechanisms of Action, Efficacy, and Limitations. Frontiers in oncology, 8, 86.

Sparagna, G. C., Hickson-Bick, D. L., Buja, L. M , C. et al., (2000). A metabolic role for mitochondria in palmitate-induced cardiac myocyte apoptosis. American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology, 279(5), H2124-H2132.

Stanley, M. (2002). Imiquimod and the imidazoquinolones: mechanism of action and therapeutic potential. Clinical and experimental dermatology, 27(7), 571-577.

Steinmann, A., Funk, J. O., Schuler, G, C. et al., (2000). Topical imiquimod treatment of a cutaneous melanomametastasis. Journal of the American Academy of Dermatology, 43(3), 555-556.

Stockfleth, E., Meyer, T., Benninghoff, B, C. et al., (2002). A randomized, double-blind, vehicle-controlled study to assess 5% imiquimod cream for the treatment of multiple actinic keratoses. Archives of dermatology, 138(11), 1498-1502.

Stockfleth, E., Trefzer, U., Garcia-Bartels, C, C. et al., (2003). The use of Toll-like receptor-7 agonist in the treatment of basal cell carcinoma: an overview. British Journal of Dermatology, 149, 53-56.

Telò, I., Pescina, S., Padula, C, C. et al., (2016). Mechanisms of imiquimod skin penetration. International journal of pharmaceutics, 511(1), 516-523.

Tian, F., & Lee, S. W. (2010). X-linked inhibitor of apoptosis protein as a therapeutic target in metastatic melanoma. Journal of investigative dermatology, 130(9), 2169-2172.

Tochigi, M., Inoue, T., Suzuki-Karasaki, M, C. et al., (2013). Hydrogen peroxide induces cell death in human TRAIL-resistant melanoma through intracellular superoxide generation. International journal of oncology, 42(3), 863-872.

Tran, M. A., Watts, R. J., & Robertson, G. P. (2009). Use of liposomes as drug delivery vehicles for treatment of melanoma. Pigment cell & melanoma research, 22(4), 388-399.

Van Horssen, R., ten Hagen, T. L., & Eggermont, A. M. (2006). TNF-α in cancer treatment: molecular insights, antitumor effects, and clinical utility. The oncologist, 11(4), 397-408.

Vandenabeele, P., Galluzzi, L., Berghe, T. V, C. et al., (2010). Molecular mechanisms of necroptosis: an ordered cellular explosion. Nature reviews Molecular cell biology, 11(10), 700.

Venturini, C. G., Bruinsmann, F. A., Contri, R. V, C. et al., (2015). Co-encapsulation of imiquimod and copaiba oil in novel nanostructured systems: promising formulations against skin carcinoma. European journal of pharmaceutical sciences, 79, 36-43.

Walsh, C. M., & Edinger, A. L. (2010). The complex interplay between autophagy, apoptosis, and necrotic signals promotes T-cell homeostasis. Immunological reviews, 236(1), 95-109.

Watanabe, M., Kawano, K., Toma, K, C. et al., (2008). In vivo antitumor activity of camptothecin incorporated in liposomes formulated with an artificial lipid and human serum albumin. Journal of Controlled Release, 127(3), 231-238.

Woodmansee, C. S., & McCall, M. W. (2009). Recurrence of lentigo maligna and development of invasive melanoma after treatment of lentigo maligna with imiquimod. Dermatologic surgery, 35(8), 1286-1289.

Yi, J. Y., Jung, Y.-J., Choi, S. S, C. et al., (2009). Autophagy-mediated anti-tumoral activity of imiquimod in Caco-2 cells. Biochemical and biophysical research communications, 386(3), 455-458.

Zhang, D.-W., Shao, J., Lin, J., Zhang, N. et al., (2009). RIP3, an energy metabolism regulator that switches TNF-induced cell death from apoptosis to necrosis. Science, 325(5938), 332-33

CAPITULO 6

CONCLUSIONES FINALES

Los arqueosomas ultradeformables (AUD) son nanovesículas preparadas con arqueolípidos polares totales (APT) del arquebacteria *Halorubrum tebenquichense*, fosfatidilcolina de soja y colato de sodio en proporciones 3:3:1 p/p. Dispersiones de AUD con diferentes antígenos incorporados en su interior han mostrado generar una respuesta inmune sistémica tras su administración tópica en mayor magnitud a la producida por liposomas ultradeformables (LUD) carentes de APT. Las dispersiones de AUD, sin embargo, producidas para un uso farmacéutico, tienen que mantener la estabilidad coloidal luego de ser sometidas a procesos lipomicidas como la esterilización, la liofilización y el almacenamiento. En este aspecto, dos obstáculos mayores están asociados a la vacunación tópica con nanovesículas ultradeformables: i) su compleja manufactura y ii) su baja estabilidad durante el almacenamiento causados por la alta proporción de surfactantes que contienen, necesario para generar la ultradeformabilidad. El proceso de manufactura de vacunas liposomales consiste en la inclusión de los antígenos en el espacio acuoso interno de las vesículas o su partición en las bicapas lipídicas, la remoción del antígeno no incorporado y su cuantificación. Luego, las nanovesículas deben ser sometidas a procesos de reducción de tamaño, esterilización y deshidratación. Estos procesos inducen la desestabilización tanto de las vesículas como de los antígenos proteicos. La inclusión de los antígenos se realiza asumiendo que es necesaria para desencadenar una respuesta inmune, sin embargo, si se pudiera evitar, los procesos de manufactura serían mucho más simples. Sumado a eso, la mezcla *in situ* de las nanovesículas y antígenos, reduciría los costos de manufactura y ampliaría el uso de un mismo adyuvante para diferentes antígenos. Por otro lado, las nanovesículas deben mantener su estabilidad física, química y coloidal por largos periodos de tiempo, y de ser posible, resistir a la potencial perdida de cadena de frio, o mejor aún no necesitarla. Es por esto que, en este trabajo de tesis, en primer lugar (**Capitulo 2**), estudiamos la estabilidad de AUD sometidos a diferentes estreses ambientales, a la esterilización por calor y a la liofilización.

Los APT extraídos del arquebacteria hiperhalofila no alcalifilica *Halorubrum tebenquichense* son una mezcla de 5 estructuras, algunas de ellas

emparentadas: el análogo arqueol [2,3-di-O-fitanil-*sn*glicerol] de fosfatidilglicerol: PG, el metil ester de fosfatidilglicerofosfato PGP-Me, la cardiolipina BPG (fosfolípido dimérico con 4 cadenas hidrofóbicas análogo glicerol dieter del bisfosfatidilglicerol: *sn*-2,3-di-O-fitanil-1-fosfoglicerol -3-fosfo-*sn*-di-O-fitanilglicerol), los arqueoles diglicosil sulfatados (que derivarían del manosilglucosil-difitanilglicerol (DGD)): SDGD5 (1-O-[α-D-manosa-(2´-SO3H)-(1´α2´)-α-D-glucosa]-2,3-di-O-fitanil-*sn*-glicerol), precursor a su vez de una segunda cardiolipina, la SDGD5PA (2´-SO3H)-Man*p*-α1,2Glcpα-1-1-[*sn*-2,3-di-Ofitanilglicerol]-6-[fosfo-*sn*-2,3-di-O-fitanilglicerol]. Debido a la estereoisomeria *sn 2,3*, las cadenas fitanilicas sin insaturaciones y los enlaces éteres, las vesículas preparadas con APT o que contienen una parte de APT, son más resistentes a las enzimas lipolíticas, a la hidrólisis y a la oxidación y a estrés físicos como la nebulización, que aquellas vesículas carentes de APT.

Nuestra hipótesis fue que los APT les brindarían mayor estabilidad estructural a AUD ante la esterilización y liofilización por sobre los LUD. En parte nuestra hipótesis fue confirmada, ya que AUD fueron más resistentes a la esterilización por calor que los LUD, sin embargo, el contenido de APT no fue suficiente para protegerlos del proceso de congelación y deshidratación, ya que para lograr liofilizarlos se requirió de la adición de glucosa y glicerol. El contenido de APT también brindó mayor estabilidad al almacenamiento de AUD, los que permanecieron sin cambios hasta 5 meses a 40 °C, mientras que los LUD se agregaron en dichas condiciones. Los APT fueron responsables del mantenimiento del tamaño nanométrico de AUD sometido a esterilización, liofilización y reconstitución. Pero, mientras que un tamaño reducido es necesario para favorecer la penetración del estrato corneo, los mayores títulos de IgG obtenidos para AUD en comparación a los LUD, se deben al componente PGP-Me, mayoritario en los APT. PGP-Me es un ligando del receptor *scavenger* de clase A y es el responsable de la extensiva captura de los AUD por macrófagos.

Finalmente, el hallazgo de que para generar una respuesta antígeno específica no es necesaria la incorporación del antígeno en el interior de las vesículas simplificaría la manufactura y uso de los AUD. AUD esterilizados y liofilizados pueden considerarse como un adyuvante listo para usar.

La respuesta inmune generada por AUD es de tipo Th2, es decir de tipo humoral, sin embargo, la vacunación contra muchas patologías requiere no solo de inmunidad humoral, sino de la generación de una respuesta celular. Por lo tanto, en el **Capítulo 3** incorporamos el inmunomodulador imiquimod (IMQ) a la estructura de los AUD para incrementar la respuesta de tipo celular. Nuestra hipótesis fue que la combinación de la penetración en la piel y el direccionamiento específico a células presentadoras de antígenos (CPA) de AUD con la actividad inmunomoduladora de IMQ mejoraría la respuesta inmunogénica tras su aplicación tópica, comparada con la generada por AUD sin IMQ e IMQ libre.

Nuestra hipótesis fue confirmada, ya que hallamos que AUD_2 (AUD con IMQ incorporado y asociado externamente) indujo mayor acumulación de IMQ en la piel humana (*SC*), mayor *delivery* intralisosomal en los macrófagos de IMQ y mayor inducción de citoquinas proinflamatorias por parte de macrófagos y queratinocitos que IMQ libre y LUD_2 (LUD con IMQ incorporado y asociado externamente). Mezclado con ovoalbúmina, AUD_2 aplicado tópicamente fue más eficiente en generar una respuesta inmune celular, medida como un incremento del isotipo IgG2a y la producción de INF-γ por esplenocitos, en comparación con la aplicación tópica tanto de IMQ libre como de LUD_2. Adicionalmente estos AUD resultaron estables al almacenamiento al menos por 6 meses.

La superior capacidad de AUD combinado con IMQ de generar una respuesta inmune tras su aplicación cutánea, nos llevó a estudiar su actividad en el contexto de la vacunación contra una infección grave como la influenza. Por lo tanto, en el **Capítulo 4,** evaluamos la actividad adyuvante de AUD_2 aplicado tópicamente combinados con una vacuna comercial trivalente contra influenza. Los nuevos enfoques para una vacunación exitosa contra la influenza masiva requieren una optimización sinérgica entre las dosis administradas, la logística del transporte y la facilidad de administración. La administración de la vacuna contra la influenza en la piel con nanovesículas estables al almacenamiento, que no requieran cadena de frío y que se pueda mezclar con los antígenos o vacunas pre-existentes, no solo permitiría una vacunación indolora y autoadministrada sino la vacunación masiva en caso de pandemias.

Una vacuna contra influenza efectiva requiere del montaje de una respuesta inmune mediada por anticuerpos sistémicos contra el antígeno de superficie viral hemaglutinina (HA), una respuesta local en el sistema respiratorio y una respuesta mediada por células. Hallamos que la aplicación tópica de AUD_2 produjo similar perfil inmune, en términos de títulos de IgG totales y perfil de isotipos (IgG1 e IgG2a), que la aplicación subcutánea de la vacuna comercial. AUD_2, sin embargo, mostró una mayor respuesta de tipo celular, en términos de índice de estimulación y liberación de INF-γ por esplenocitos y una leve reacción de hipersensibilidad retardada. Este hallazgo es de suma importancia porque permite pensar en la posibilidad de cambiar la vía de administración convencional parenteral empleando agujas por la menos invasiva y dolorosa aplicación tópica de nanovesículas. Estudios posteriores serán necesarios para revelar si la respuesta montada genera protección en modelos de influenza.

Finalmente, en el **Capítulo 5** exploramos una potencial aplicación de AUD_2 diferente, su actividad anti-melanoma *in vitro*. Existe una necesidad de contar con nuevas herramientas terapéuticas para el tratamiento del melanoma. La aplicación tópica localizada permitiría el uso de altas concentraciones de agentes terapéuticos con mínima toxicidad sistémica y podría ser útil para el tratamiento de lesiones no quirúrgicas, lesiones tempranas o bordes de lesiones postcirugía. La acción de IMQ sobre el melanoma incluye al menos 3 procesos: inducción de una respuesta inmunológica antitumoral medida por células inflamatorias, actividad pro-apoptótica directa y actividad antiangiogénica. Nuestra hipótesis fue que la actividad pro-apoptótica TLR-7 independiente antitumoral del IMQ podría incrementarse o modificarse incorporado o asociado a AUD.

Hallamos que la incorporación y asociación de IMQ en AUD y LUD modificó su farmacodinamia de dos modos diferentes sobre células de melanoma humano Sk-Mel-28. La incorporación de IMQ en LUD incrementó su toxicidad (~ 10 veces) sobre células de melanoma conservando la actividad apoptótica. En contraste AUD no incrementó la toxicidad del IMQ, pero produjo una toxicidad intrínseca de las matrices lipídicas con un incremento de la proporción de células necróticas respecto de IMQ.

La mayor captura de AUD comparada con la de LUD por parte de las células Sk-Mel-28 sumado al contenido de ácido linoleico y arqueolípidos generan mayor disrupción de la integridad de la membrana plasmática y toxicidad. Esta toxicidad fue mayor sobre células de melanoma que sobre queratinocitos. Este resultado, sumado a la mayor acumulación de IMQ en el *SC* y su actividad inmunomoduladora con la cual se induce la liberación de INF-γ y citoquinas proinflamatorias localmente (IL-6 y TNF-α), postulan a los AUD con IMQ como posible candidato para futuras investigaciones como terapia *adyuvante* tópica de la terapia anti-melanoma.

En suma, los resultados obtenidos en este trabajo de tesis contribuyen al desarrollo de adyuvantes tópicos estables y listos para usar. Presentamos nanovesículas ultradeformables que son fáciles de preparar, no requieren de la incorporación de los antígenos a su estructura, merced a su deformabilidad penetran el *SC*, merced a su contenido de arqueolípidos pueden liofilizarse con pequeñas cantidades de glicerol y glucosa y son estables al almacenamiento aun sin cadena de frío. Son ávidamente capturados por macrófagos y merced al contenido del inmunomodulador IMQ producen la liberación de INF-γ en esplenocitos y citoquinas pro-inflamatorias en macrófagos y queratinocitos. Aplicados tópicamente son capaces de desencadenar una respuesta inmune antígeno especifica humoral y celular combinados con una vacuna comercial. En particular, este trabajo abre las puertas para el uso de AUD combinado con el inmunomodulador IMQ en el contexto de la vacunación tópica contra la influenza y la terapia adyuvante del melanoma.