



UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

Trabajo de Tesis Doctoral:

"Desarrollo de una vacuna a base de nanopartículas"

Tesista: Lic. Rizzo Gastón Pascual

Director/a: Dr. Docena Guillermo Horacio

Codirector/a: Dra. Smaldini Paola Lorena

Año: 2023

El presente trabajo de tesis para optar por el grado de Doctor de la Facultad de Ciencias Exactas (Área Ciencias Biológicas) de la Universidad Nacional de La Plata ha sido realizado bajo la dirección del Dr. Guillermo Horacio Docena y la codirección de la Dra. Paola Lorena Smaldini en el Instituto de Estudios Inmunológicos y Fisiopatológicos (IIFP) – UNLP – CONICET - asociado CIC PBA, Facultad de Ciencias Exactas, UNLP, La Plata, Argentina.

La Plata, 27 de octubre de 2023

A mi abuela Tota y a
mis padres Judith y Matías

Trabajos publicados

- João P.B. Oliveira; Angela María Candreva; **Gastón Rizzo**; Márcio V. Ramos; Jefferson S. Oliveira; Hermógenes D. Oliveira, Maria B. Ary, Guillermo Docena; Cleverton D.T. Freitas. "Allergenicity reduction of cow's milk proteins using latex peptidases." *Food Chemistry. Food Chem.* 2019 Jun 30;284:245-253. doi: 10.1016/j.foodchem.2019.01.123.

- Maria Lucía Orsini Delgado, **Gastón Pascual Rizzo**, Carlos Alberto Fossati, Karina Alejandra Pasquevich, Juliana Cassataro, Paola Lorena Smaldini, Guillermo Horacio Docena. "Sublingual Omp16-driven redirection of the allergic intestinal response in a pre-clinical model of food allergy". *Clin Exp Allergy.* 2020;00:1–10. <https://doi.org/10.1111/cea.13676>

- Paola L. Smaldini, Fernando M. Trejo, **Gastón P. Rizzo**, Diego J. Comerci, Jaap Kampinga, Guillermo H. Docena. "Mucosal Immunoregulatory Properties of *Tsukamurella inchonensis* to Reverse Experimental Food Allergy" *Front. Immunol.* 12:641597. doi:10.3389/fimmu.2021.641597.

-Albeiro Marrugo Padilla*, **Gastón Rizzo***, Paola L. Smaldini, Julián Vaccaro, Darío Méndez Cuadro, Erika Rodríguez Cavallo, Guillermo H. Docena. "Carbonylation induced by antibiotic and pesticide residues on casein increases its IgE binding and allergenicity" *Free Radical Research* 10.1080/10715762.2022.2032020.

-Erra L., Uriarte I., Colado A., Paolini MV., Seminario G., Fernández JB., Tau L., Bernatowicz J., Moreira I., Vishnopolka S., Rumbo M., Cassarino C., Vijoditz G., López AL., Curciarello R., Rodríguez D., **Rizzo G.**, Ferreyra M, Ferreyra Mufarregue LR., Badano MN., Pérez Millán MI., Quiroga MF., Baré P., Ibañez I., Pozner R., Borge M., Docena G., Bezrodnik L., Almejun MB. "COVID-19 Vaccination Responses with Different Vaccine Platforms in Patients with Inborn Errors of Immunity" *J Clin Immunol* 43, 271–285 (2023). 10.1007/s10875-022-01382-7

- Eugenia Apuzzo, Maximiliano Agazzi, Santiago Herrera, Agustín S. Picco, **Gastón Rizzo**, Camila Chavero, Daiana Bianchi, Paola Smaldini, Lorena Cortez, Waldemar Marmisollé, Gisel Padula, Analía Seoane, Maria Lis Alomar, M. Paula Denofrio, Guillermo Docena, Omar Azzaroni. "Poly(allylamine)-tripolyphosphate ionic assemblies as nanocarriers: friend or foe?" *ACS Applied Bio Materials*, DOI: 10.1021/acsabm.3c00489.

- **Gastón P. Rizzo**, Rodrigo C. Sanches, Camila Chavero, Daiana Bianchi, Eugenia Apuzzo, Santiago E. Herrera, Maximiliano L. Agazzi, Sergio C. Oliveira, Omar Azzaroni, Paola L. Smaldini*, Guillermo H. Docena*. "Poly(allylamine)-tripolyphosphate Polymeric Nanoparticles as a NLRP-3-dependent Systemic Adjuvant for the Vaccine Development". En revision.

Patentes

Con respecto a las nanopartículas, se realizó la presentación de solicitud de patente de invención ante la oficina de propiedad industrial de Argentina en fecha 24 de octubre de 2022, acta solicitud número 20220102879, a nombre de UNLP/CONICET y bajo el nombre de “Nanopartículas, composiciones de vacunas, procedimientos, usos y métodos de administración”.

Con respecto al antígeno γ RBD, se ha hecho una solicitud de patente de invención presentada el 16/09/2021 en el INPI con Nro P21010257 cuyos propietarios son UBA y CONICET (Título: Vacuna contra coronavirus, cepas de levadura, métodos de detección, métodos de tratamiento y usos). Se ha solicitado patente PCT reivindicando prioridad AR No. P210102579 a nombre de UBA/CONICET/ INIS BIOTECH. Patente Nro PCT/US22/43578 con fecha 15/9/2022.

En este trabajo se realizaron las siguientes colaboraciones:

Con Soft Matter Laboratory del Instituto de Investigaciones Físicoquímicas y Teóricas Aplicadas (INIFTA-UNLP-CONICET), con la dirección del Dr. Omar Azzaroni.

Con el Instituto de Ciencias Biológicas (ICB) de la Universidad Federal de Minas Gerais (UFMG) con la dirección del Dr. Sergio Costas Oliveira.

Con el Centro de Medicina Comparada de la Universidad Nacional del Litoral (CMP-ICIVET-UNL) con la dirección del Dr. Hugo Ortega.

Con el Instituto de Biociencias, Biotecnología y Biología Traslacional (IB3) de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales de la Universidad Nacional de Buenos Aires (UBA-CONICET) con la dirección del Dr. Javier Santos y la Dr. Cecilia D’Alessio.

Con el Instituto de Estudios de la Inmunidad Humoral (IDEHU-UBA-CONICET), bajo la dirección del Dr. Pablo Baldi y la Dr. Mariana Ferrero.

Agradecimientos

Sufro del síndrome del impostor, que es esa sensación recurrente de que todos tus logros son inmerecidos y que en cualquier momento alguien se va a dar cuenta de que sos un fraude. No es broma, no me pasa solo a mí, y estoy seguro de que a más de uno le ha pasado alguna vez. Hace 6 años ingresé al laboratorio sin saber nada o sabiendo muy poco de lo que se hacía en un instituto de investigación. Me imagino la alegría de Pao cuando me pararon al lado suyo y le dijeron: “Este chico no sabe hacer nada, te lo dejo”. Este síndrome no me deja olvidar que ocupé un espacio que probablemente lo tendría que haber ocupado alguien con más mérito o más experiencia. Pero hay un lado bueno en no saber nada, y es que puedes aprenderlo todo, aunque nunca se aprende todo. Durante esta etapa de formación, junto a todas las personas que integran el Instituto de Estudios Inmunológicos y Fisiopatológicos, familia y amigos he crecido tanto en el ámbito laboral como en el personal. Por ello, quiero expresar mi agradecimiento a todos ellos.

Me gustaría comenzar agradeciendo a la Facultad de Ciencias Exactas de la Universidad Nacional de La Plata y a sus docentes por la calidad de la formación académica que me brindaron. Esto no solo ha sido beneficioso para mí, sino también para todos aquellos que han tenido la oportunidad de acceder a esta educación de alta calidad que brinda la Universidad, gracias a su compromiso con la educación pública y gratuita. Además, quiero agradecer el apoyo financiero proporcionado durante este período por la Comisión de Investigaciones Científicas (CIC), el Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) y la Universidad Nacional de La Plata (UNLP), lo que me permitió continuar con mi formación de posgrado.

Quiero expresar mi mayor agradecimiento hacia mi director, Guillermo, por brindarme la oportunidad de formar parte de su grupo de investigación, así como por su dedicación y compromiso. También deseo expresar mi agradecimiento a Paola, quien no solo ha demostrado ser una excelente co-directora al transmitir todo su conocimiento, sino que también ha sido una gran compañera gracias a su calidad humana, su paciencia infinita y sus valiosos consejos. A ambos les agradezco por su

confianza. A Martín Rumbo, director del IIFP, por su buena predisposición en todo momento.

Agradezco a mi familia, quienes son mis pilares y mi sostén. En especial a mi mamá y a mi papá por su amor y su incansable apoyo incondicional. A mis hermanos por sus descaradas complicidades y compañía. Gracias a mi abuela, por sus besos de chocolates y sus abrazos de budín.

Estaré eternamente agradecido con todos los integrantes del IIFP por su compañía, la cual me ayudó a transitar este largo camino. Quiero expresar mi agradecimiento a Renata, quien no solo me puso a preparar PBS en mi primer día, sino que también fue una gran compañera, salvándome durante la pandemia de COVID-19. También quiero agradecer a todos los que alguna vez integraron e integran el grupo Docena: Ceci, Kari, Male, Juli, Ema, Bel, Manu y Anahí, así también como al nuevo grupo Smaldini: Cami, Dai, Mica y Eva. Todos contribuyeron para que esto sea posible.

A Omar Azzaroni y a su grupo de trabajo en el Instituto de Investigaciones Físicoquímicas Teóricas y Aplicadas (INIFTA) con Santi, Maqui, Lorena y Euge. Si bien los químicos y los inmunólogos hablamos en distinto idioma, nos logramos comunicar y formar un excelente grupo de trabajo. Gracias a ellos por la paciencia y su predisposición.

A Sergio Costas del Instituto de Ciencias Biológicas (ICB) de la Universidad Federal de Minas Gerais (UFMG) y su equipo de trabajo, en especial a Rodrigo Sanches, quien fue un excelente compañero ayudándome en todo y a su compañera Lais por alimentarme con su farofa. A Nina por recibirme y abrirme las puertas de su casa y a Marco Tulio, gran cocinero de churrasco. Muito obrigado.

A Javier Santos y Cecilia D'alesio, del Instituto de Biociencias, Biotecnología y Biología Traslacional (IB3-UBA-CONICET) y a Pablo Baldi y Mariana Ferrero, del Instituto de Estudios de la Inmunidad Humoral (IDEHU-UBA-CONICET), quienes nos proveyeron de los inmunógenos yRBD y Btaf respectivamente.

A Hernán Sguazza, Marco Tizzano y a la Cátedra de Virología de la Facultad de Ciencias Veterinarias (FCV-UNLP), quienes también contribuyeron a mi formación,

permitiéndome dar los primeros pasos en la investigación realizando el trabajo final de grado.

Agradecer a todo el Box 4 y anexos por hacer más llevaderos los días y por sus aportes en materia de harinas y dulce de leche. En especial a Mai, Male, Kari, Caro y Juani, que siempre estuvieron y ayudaron a que sea más saludable, obvio que con alguna cerveza y comida de por medio.

A Mai, compañera en todo. Ella dice que me enseñó a preparar el mate, no le crean, será su única mentira. Pero si reconozco que aprendí mucho con ella y todos los momentos compartidos dentro y fuera del laboratorio fueron muy lindos y especiales. Gracias bicho.

Agradecerles a todos los viejitos que desde el purgatorio hasta el box 5 me acompañaron con sus consejos y sus charlas: Juan, Maxi, Pablito, Costi, Agus, Mati, Yani, Coqui, Andre, Iva y David. También quiero agradecerles a JC, Ceci Alvarez, Romi y Pau quienes me acompañaron de igual manera durante este tiempo.

A mis amigos Tomi y Lucho con quienes todavía no nos cansamos de tomar vino, compartir cenas y charlas. A Didi, Nico y el Negro que siempre estuvieron a pesar de la distancia. A las locas lindas de Anne y Lu que me acompañaron desde los primeros días de la carrera de grado hasta hoy.

Sin todos ellos, este camino hubiera sido difícil y tortuoso.

Se agradece, de corazón.

ÍNDICE

Agradecimientos	6
ÍNDICE.....	9
Índice de figuras y tablas.....	13
Abreviaturas.....	17
RESUMEN	19
INTRODUCCIÓN GENERAL.....	22
1- Vacunas	23
Generalidades	23
Vacunas preventivas y terapéuticas.....	33
Vacunas sistémicas y mucosales	33
2- Nanotecnología	38
Nanopartículas y su interacción con células de la inmunidad innata	40
HIPÓTESIS DE TRABAJO, OBJETIVO GENERAL Y OBJETIVOS ESPECÍFICOS	44
Hipótesis de trabajo	45
Objetivo general.....	46
Objetivos específicos.....	46
MATERIALES Y MÉTODOS.....	48
1-Síntesis de Nanopartículas	49
1.1. Materiales utilizados	49
1.2. Método de preparación de Nanopartículas.....	49
1.3. Protocolo de adsorción de proteínas.....	50
1.4 Medida de encapsulación de proteínas	50
2-Characterización biológica <i>in vitro</i>	51
2.1 Ensayo de internalización y activación celular	54
2.2 Detección de citoquinas en los sobrenadantes de cultivo por la técnica de ELISA	55
2.3 Medida de actividad lactato deshidrogenasa (LDH)	55
2.4 Western blot.....	56
2.5 Detección de LPS	56
2.6 Medida de actividad de fosfatasa alcalina (SEAP).....	57
3-Characterización biológica <i>in vivo</i>	57
3.1. Monitoreo de la biodistribución de Np-FITC <i>in vivo</i>	58
3.2. Análisis de la inmunogenicidad y adyuvancia de las Np.....	60
3.2.1 Inmunización por vía intranasal e intragástrico	60

3.2.2 Inmunización por vía sistémica	61
3.2.3 Modelo de protección contra SARS-CoV-2 e histopatología:.....	62
3.3 Modelo de alergia alimentaria a la proteína de la leche.....	65
3.3.1 Desafío oral y evaluación de signos clínicos.....	65
3.3.2 Prueba cutánea	66
3.3.3 Detección por ELISA de IgG1 e IgG2a específico en suero	67
3.3.4 Detección de IgE específica en suero	67
3.3.7 Cultivo de esplenocitos para el ensayo de respuesta celular	67
Análisis estadístico	68
CAPÍTULO 1	69
Caracterización fisicoquímica y biológica de nanopartículas poliméricas	69
Introducción	70
Objetivo.....	74
Resultados	75
1- Síntesis y caracterización fisicoquímica	76
1.1 Nanopartícula PAH/Tpp	77
1.2 Nanopartícula PAH/Pi.....	78
2- Caracterización biológica <i>in vitro</i> de las nanopartículas.....	81
2.1 Cambios en la morfología celular.....	81
2.2 Activación celular	82
2.3 Internalización celular	87
2.4 Activación celular y producción de IL-1 β	92
2.5 Activación de la vía intracelular del inflamosoma	97
2.6 Mecanismo de acción de las nanopartículas.....	100
Conclusión y discusión	105
CAPÍTULO 2	109
Caracterización <i>in vivo</i> de Np-PAH/Tpp y de su poder adyuvante.....	109
Introducción	110
Objetivo.....	113
Resultados	114
1. Poder adyuvante de las nanopartículas al administrarlas por vía sistémica	115
2. Empleo de Np-OVA como vacuna mucosal.....	119
2.1 Administración intranasal	119
2.1.1 Distribución tisular de las nanopartículas	120

2.1.2. Administración intranasal y poder adyuvante de las nanopartículas	122
2.1.3. Análisis de la frecuencia de linfocitos T de memoria residentes de tejido	125
2.2 Administración intragástrica	129
2.2.1 Distribución tisular de las nanopartículas	129
2.2.2 Administración intragástrica y poder adyuvante de las nanopartículas.....	131
2.3. Administración sistémica de nanopartículas y mecanismos de inducción de la inmunidad innata	134
Conclusión y discusión	136
CAPÍTULO 3	138
Aplicaciones, candidato vacunal para enfermedades infecciosas y no infecciosas.....	138
Introducción	139
1- Aplicación de un candidato vacunal para inducir protección frente a <i>Brucella suis</i> . 139	
2- Aplicación de un candidato vacunal para inducir protección frente al Sars-CoV-2 .. 140	
3- Candidato vacunal terapéutico para el tratamiento de la alergia alimentaria a las proteínas de la leche vaca	144
Objetivos	147
Resultados	148
1- Candidato vacunal mucosal contra <i>B. suis</i>	149
2- Candidato vacunal sistémico contra SARS-CoV-2	153
2.1 Optimización del candidato vacunal contra SARS-CoV-2.....	156
2.2 Optimización del plan de inmunización empleando Np-yRBD	157
2.2.1 Funcionalidad del candidato vacunal: Ensayo de protección contra SARS-CoV-2 en ratones K18-hACE2.....	161
2.2.2 Estudios histopatológicos de animales vacunados con Np-yRBD y desafiados con SARS-CoV-2.....	164
3. Empleo de nanopartículas en una formulación vacunal terapéutica para alergia alimentaria a proteínas de leche.....	165
Conclusión y discusión	174
Brucelosis	174
COVID-19	175
Alergia alimentaria	175
DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES GENERALES.....	177
BIBLIOGRAFIA.....	184

Índice de figuras y tablas

Figura 1: Mecanismo de acción de la vacunación.

Figura 2: Nuevo marco de estudio para el desarrollo de vacunas y adyuvantes.

Figura 3: Diferencia en la respuesta inmune de una vacuna acelular en presencia y ausencia de adyuvante.

Figura 4: Inmunización sistémica vs. Mucosal.

Figura 5: Estrategias y mecanismos de ingreso a las mucosas de las nanopartículas como vehículo en una vacuna mucosal.

Figura 6: Nanoescala, relación de tamaños en nanómetros.

Figura 7: Mecanismo de activación canónica y no canónica del inflamosoma NLRP3.

Figura 8: Las nanopartículas pueden inducir polarización de macrófagos y modular sus funciones de diferentes maneras.

Figura 9: Componentes utilizados para la síntesis de las nanopartículas.

Figura 10: Relación entre el potencial zeta y R para nanopartículas PAH/Tpp obtenidas a pH constante 7.4 y a pH=9.

Figura 11: Diámetro hidrodinámico de las nanopartículas sintetizadas con R=0.6.

Figura 12: Monitoreo del diámetro hidrodinámico.

Figura 13: Monitoreo del potencial zeta y diámetro hidrodinámico

Figura 14: Mediciones complementarias a las nanopartículas PAH/Tpp de R=0.6 de 200nm.

Figura 15: Cambio morfológico de células THP-1 evaluado mediante citometría de flujo al incubarlas con diferentes nanopartículas.

Figura 16: Interacción e internalización de nanopartículas-FITC con células macrofagicas RAW 264.7 luego de 6hs de estímulo.

Figura 17: Caracterización de células dendríticas derivadas de médula ósea por citometría de flujo al estimularlas con las diferentes nanopartículas y LPS.

Figura 18: Análisis por microscopía confocal de la internalización de nanopartícula-FITC y producción de IL-1 β por BMDC.

Figura 19: Análisis de la internalización por fagocitosis y endocitosis de Np-FITC.

Figura 20: Análisis de la activación de BMDM por citometría de flujo.

Figura 21: Tracking intracelular de Np-FITC.

Figura 22: Análisis de la fluorescencia Np-FITC en células epiteliales por microscopía confocal.

Figura 23: Microscopía óptica de células macrofágicas murinas J774 y células epiteliales colónicas humanas HT-29 estimuladas con distintas concentraciones de Np.

Figura 24: Análisis de la estimulación celular y producción de citoquinas frente al estímulo con distintas concentraciones de Np.

Figura 25: Caracterización de la activación de células dendríticas JWAS II estimuladas con Np-FITC.

Figura 26: Activación del inflamosoma en células reporteras THP-1-ASC-GFP por microscopía de epifluorescencia.

Figura 27: Activación del inflamosoma en células reporteras THP-1-ASC-GFP por citometría de flujo.

Figura 28: Análisis de la vía de activación del inflamosoma con el uso de inhibidores en células presentadoras de antígeno.

Figura 29: Análisis de la activación del inflamosoma por Np en células provenientes de ratones knockout en NLRP3, caspasa-1, caspasa-1/11 y gasdermina D.

Figura 30: Mecanismo de activación de la Np.

Figura 31: Análisis de la presencia de LPS en la Np y sus componentes y el porcentaje de encapsulación de OVA por las Np.

Figura 32: Respuesta humoral luego de inmunización sistémica empleando Np-OVA.

Figura 33: Respuesta celular en ratones inmunizados por vía intraperitoneal con Np-OVA.

Figura 34: Monitoreo de la fluorescencia de Np-FITC administradas por la vía intranasal.

Figura 35: Análisis de la inmunidad humoral y celular en ratones inmunizados con Np-OVA por la vía intranasal.

Figura 36: Respuesta inmune humoral en ratones Inmunizados sistémica y/o mucosal con Np-OVA.

Figura 37: Análisis de la frecuencia de linfocitos T residentes de tejido en pulmón.

Figura 38: Monitoreo de la fluorescencia en distintas porciones del tracto gastrointestinal de ratones que recibieron Np-FITC por vía intragástrica.

Figura 39: Monitoreo de macrófagos y células dendríticas en el tracto gastrointestinal post administración con Np-FITC vía intragástrica.

Figura 40: Inmunización intragástrica de ratones con Np-OVA y análisis de la respuesta inmune.

Figura 41: Inmunización de animales salvajes (C57B6) y deficientes en componentes de la vía del inflamósoma (NLRP3^{-/-}, caspasa-1^{-/-} y IL-1R^{-/-}) y análisis humoral y celular.

Figura 42: Mecanismo de infección del SARS-CoV-2 a través del reconocimiento de ACE2 en la célula blanco.

Figura 43: Porcentaje de encapsulación de Btaf en la Np.

Figura 44: Análisis de la respuesta humoral y celular del candidato vacunal contra *Brucella suis*.

Figura 45: Análisis de frecuencia de linfocitos T efectoras y de memoria en ganglio cervical.

Figura 46: Análisis de la presencia de LPS en γRBD y el porcentaje de encapsulación en Np.

Figura 47: Análisis de la respuesta humoral y celular del candidato vacunal Np-γRBD.

Figura 48: Análisis en el cambio de variables para la formulación vacunal contra SARS-CoV-2.

Figura 49: Análisis de la respuesta humoral y celular de Np-γRBD 50μg y Alum+γRBD 50μg.

Figura 50: Análisis de la respuesta celular de Np-γRBD 50μg y Alum+γRBD 50μg.

Figura 51: Análisis de la protección del candidato vacunal Np-γRBD al desafío nasal con virus SARS-CoV-2 variante Wuhan en ratones K18-hACE2.

Figura 52: Heat map para el análisis histopatológico de animales inmunizados o controles e infectados.

Figura 53: Sensibilización de ratones Balb/c.

Figura 54: Porcentaje de encapsulación de β-lactoglobulina en la Np.

Figura 55: Signos clínicos y respuesta humoral en animales alérgicos tratados con Np-βlacto.

Figura 56: Respuesta celular en animales alérgicos luego del tratamiento con Np-βlacto.

Tabla 1: Adyuvantes comerciales utilizados en vacunas aprobadas para uso en humanos.

Tabla 2: Vacunas mucosales licenciadas.

Tabla 3: Signos clínicos en animales alérgicos a PLV.

Abreviaturas

ACE2: Enzima convertidora de angiotensina 2

ADN: Ácido desoxirribonucleico

Alum: Adyuvante hidróxido de aluminio

AnaK: Anakinra (antagonista IL-1R)

ARN: Ácido ribonucleico

ARNm: Ácido ribonucleico mensajero

ATP: Adenosin trifosfato

BMDC: Dendríticas derivadas de médula ósea

BMDM: Macrófagos derivados de médula ósea

Btaf: Auto transportador trimétrico

CA-74Me: Inhibidor de catepsina B

Cito D: Citocalasina-D

CPA: Células presentadoras de antígeno

DMEM: Medio de cultivo Dulbecco's Modified Eagle Medium

DO: Desafío oral

DTH: Hipersensibilidad Tipo Retrasada o Tardía

FACS: Buffer PBS 2% SFB 2mM EDTA

FAL: Buffer Fosfatasa alcalina

FITC: Isotiocianato de fluoresceína

FLIC: Flagelina

GLP: Buenas prácticas de laboratorio (siglas en inglés)

GSDMD: Gasdermina D

I.D: Intradérmico

I.G: Intragástrico

I.N: Intranasal

I.P: Intraperitoneal

KO: Knock out

LPS: Lipopolisacárido

MLN: Ganglios linfoides mesentéricos

nm: Nanómetros

Np: Nanopartículas

OVA: Albúmina de huevo

PAH: Polialilamina

PBS: Buffer fosfato (KH₂PO₄ 0,428g/L, Na₂HPO₄ 1,39g/L, NaCl 7,2g/L pH 7,4)

PFA: Paraformaldehído

Pi: Fosfato inorgánico

pI: Punto isoeléctrico

PLV: Proteína de leche de vaca

RBD: Dominio de unión del receptor de la proteína S del virus SARS-CoV-2

RPMI: Medio de cultivo Roswell Park Memorial Institute

S: Proteína Spike (espiga) del virus SARS-CoV-2

SC: Subcutáneo

SFB: Suero Fetal Bovino

TC: Toxina colérica

TCR: Receptor de células T (siglas en inglés)

TLR: Receptores Tipo Toll (siglas en inglés)

Tpp: Tripoli fosfato

WT: Wild type

Z-VAD: Z-VAD-FmKQ (Inhibidor de caspasas)

β-lacto: β-lactoglobulina

RESUMEN

La vacunación junto con la potabilización del agua ha tenido un fuerte impacto en el crecimiento poblacional y han sido claves en el control de epidemias y pandemias. Sin embargo, el tiempo que insume el desarrollo de las vacunas es la limitante, ya que puede tardar años desde la descripción del inicio de la enfermedad hasta la obtención de una vacuna. En la actualidad, con el uso de nuevos conocimientos adquiridos a lo largo de todos estos años en la inmunología, como en otras ciencias biológicas, se logró avanzar a grandes pasos en el área de la vacunología. Además, con el desarrollo de nuevas tecnologías y nuevos materiales se lograron avances sustanciales en la biomedicina. Estos materiales pueden variar sus propiedades fisicoquímicas y biológicas cuando se cambia la escala y se trabaja en el orden de los nanómetros, lo cual ha sido explorado en los últimos años. De este modo, la nanotecnología ha tomado un rol muy importante dentro de la biomedicina, y en la vacunología en particular. Es así como las nanopartículas (Np), tanto metálicas como poliméricas, se encuentran en constante estudio descubriéndose nuevas propiedades y aplicaciones.

En este Trabajo de Tesis Doctoral se abordó el estudio de nanopartículas poliméricas de polialilaminas (PAH) para la formulación de nuevos candidatos vacunales, ya que podrían tener el rol de protección de los componentes vacunales y de direccionamiento de los mismos hacia células, tejidos u órganos blanco. A partir del conocimiento de su comportamiento fisicoquímico, evaluamos la capacidad de las nanopartículas de interactuar con distintas células del sistema inmune, principalmente con células presentadoras de antígeno (CPA). Encontramos que las Np son internalizadas y localizadas en lisosomas luego de ser fagocitadas por células dendríticas (BMDC) o macrófagos (BMDM). A su vez encontramos que las CPA se activan (aumento en la expresión de CD86 y MHCII) e inducen la producción y secreción de la citoquina pro inflamatoria IL-1 β . Estudios más profundos revelaron que estas Np activan la vía del inflamosoma NLRP3. Esto por sí solo demuestra que las Np tienen capacidad de activar la inmunidad innata y por lo tanto pueden actuar como un adyuvante en una formulación vacunal. Por otro lado, al estudiar sus propiedades como vehículo demostramos que tienen la capacidad de encapsular distintos

antígenos proteicos y que mantienen su integridad cuando son administrados por vías mucosales. Finalmente, empleamos diferentes candidatos vacunales en modelos pre-clínicos en ratones y logramos confirmar que las Np se comportan adecuadamente como vehículo mucosal y sistémico, que protegen al inmunógeno y que además se comportan como un adyuvante mucosal. Nuestros resultados demostraron que las Np tienen capacidad de inducir la producción de anticuerpos IgG, con un perfil de activación inmune Th1-dependiente, y que promueven una respuesta inmune celular con expansión y activación de linfocitos T CD4 y CD8 productores de IFN- γ . Esta capacidad de aumentar la respuesta inmune humoral y celular específica la evidenciamos tanto por vía sistémica, como por vía mucosal. Además, cuando se emplearon estas Np en una formulación vacunal encontramos que generan memoria inmune a través de la inducción de linfocitos T de memoria efectores (CD62L⁻CD44⁺), memoria central (CD62L⁺CD44⁺) y residentes de tejido (TRM, CD45⁻CD69⁺CD62L⁻). Por lo tanto, un candidato vacunal formulado a base de estas Np reúne las propiedades centrales que debe tener una vacuna: activar la inmunidad específica, generar memoria y proteger al inmunógeno, principalmente en la vacunación mucosal. Sobre la base de estos hallazgos planteamos aplicar diferentes candidatos vacunales a base de Np para las siguientes situaciones: vacunas **preventivas sistémicas o mucosales para procesos infecciosos** (SARS-CoV-2 y Brucella) y **vacunas terapéuticas mucosales para procesos no infecciosos** (alergia alimentaria a proteína de leche de vaca).

Por lo tanto, los resultados obtenidos en el siguiente trabajo nos permiten proponer a las Np como una nueva plataforma vacunal para ser aplicada en diferentes situaciones de salud animal y humana.

INTRODUCCIÓN GENERAL

1-Vacunas

Generalidades

Uno de los éxitos más importantes de la historia de la inmunología y de la Biomedicina son las vacunas y su impacto en el tamaño de la población mundial, la expectativa de vida y en la Salud Pública. La vacunación como método preventivo de enfermedades tuvo y tiene un gran impacto no sólo en la salud humana, sino también en la de los animales, tanto domésticos como de consumo. Este método, junto con la potabilización del agua, ha tenido un impacto superior sobre cualquier otra intervención con medicamentos, pudiendo controlar pandemias (como la reciente COVID-19), epidemias (como la de gripe) y enfermedades infecciosas (como la poliomielitis).

Con el desarrollo de las vacunas, y desde lo que se considera el inicio de la vacunación con bases científicas en Inglaterra en 1796 a partir de las observaciones y trabajos de Edward Jenner, se han logrado erradicar (únicamente la viruela), controlar y reducir la incidencia de enfermedades infecciosas (poliomielitis, sarampión, difteria, tétanos, paperas, rubéola congénita, tos convulsa, etc.) y evitar enfermedades severas (tuberculosis, COVID-19, etc.) ¹. Pero el concepto nace mucho antes, cuando se utilizaba la ingesta de pequeñas dosis de veneno para prevenir el envenenamiento intencional fatal de los gobernantes por parte de los enemigos. Probablemente, esta práctica se originó en creencias homeopáticas donde se utilizaban pequeñas dosis de organismos o microorganismos para la prevención de futuras enfermedades basándose en observaciones ². Los antiguos chinos se protegían contra la viruela mediante el proceso de variolación, en el que se inoculaban por vía intranasal pequeñas cantidades de costras de una lesión de una persona infectada. El proceso fue promovido por Lady Mary Montagu, quien había observado la variolación en Turquía a principios del siglo XVIII ³. En 1796, Edward Jenner (Essex, Inglaterra) empleó el virus cowpox (virus de la viruela bovina) de lesiones cutáneas de mujeres que trabajaban con vacas en la manufactura de productos lácteos y que no enfermaban de viruela (a diferencia de sus familiares que no estaban en contacto con vacas), y las introdujo en

cortes realizados en la piel de individuos sanos como inmunógeno. A pesar que muchos casos resultaron fatales, a partir de estos procedimientos se fue ajustando el protocolo de variolación y, al probar el procedimiento científicamente, se generó el precedente científico para utilizar un patógeno relacionado, menos peligroso, para generar respuestas inmunes que protejan frente al patógeno. De esta manera la reactividad cruzada es un concepto que se ha manejado desde los inicios de la especialidad, y en este caso en la vacunación para la viruela humana. Finalmente, este proceso llevó a la erradicación de la viruela en 1980. Posteriormente, el uso generalizado de vacunas para otras enfermedades infecciosas como las causadas por otros virus como los del sarampión, paperas, rubéola, varicela, adenovirus y poliovirus, y actualmente el SARS-CoV-2 han demostrado que se trata de procedimientos seguros y eficientes. El mismo principio fue aplicado para patógenos bacterianos por Luis Pasteur y en sus experimentos pudo demostrar la protección contra el cólera en gallinas y contra el ántrax, en ovejas. La vacuna BCG (Bacille Calmette-Guerin), que evita la tuberculosis severa, fue administrada por primera vez en 1921 y aún hoy sigue vigente por los resultados alcanzados. Los primeros enfoques de Pasteur sobre el origen de las enfermedades infecciosas, el desarrollo de vacunas, la atenuación de los microorganismos para reducir su patogenicidad y la inactivación de los microorganismos, son los pilares que han permitido lograr avances muy promisorios en las tecnologías de desarrollo de vacunas³⁻⁵. Inclusive, el desarrollo de la tecnología del ADN recombinante y de nuevos adyuvantes ha generado un impulso muy importante en esta área. Más recientemente, la tecnología ARNm, originalmente desarrollada para terapia génica, ha realizado un aporte fundamental en el desarrollo de nuevas plataformas vacunales a base de ARNm, lo cual junto a otras vacunas han controlado la reciente pandemia a causa de la COVID-19. Este tipo de plataforma sin dudas ha llegado para instalarse como una nueva plataforma con innovaciones que son cruciales al momento de desarrollar vacunas para patógenos emergentes, como ha sido el SARS-CoV-2⁶⁻⁹.

Como premisa general, la vacunación es el proceso de estimulación de la inmunidad protectora frente a microorganismos mediante el empleo de formas no patogénicas o componentes de los microorganismos. Una vacuna debe generar por lo

tanto una inmunidad específica y duradera en el tiempo, lo que se conoce como memoria, para preparar al organismo para una futura exposición al patógeno y evitar de esta manera la enfermedad sintomática y/o severa. Esto requiere activar adecuadamente los mecanismos efectores de la inmunidad innata y adaptativa, para lo cual una formulación vacunal debe tener al menos un inmunógeno y un adyuvante.

Actualmente, a partir del conocimiento del sistema inmune en homeostasis y en situaciones patológicas, se encuentran en desarrollo vacunas preventivas y terapéuticas. Mientras que las vacunas preventivas o profilácticas promueven la memoria inmune y preparan al organismo para futuras infecciones, las vacunas terapéuticas inducen mecanismos efectores capaces de revertir los procesos patológicos ya instaurados. Por lo tanto, las dos propiedades principales que deben reunir una vacuna son la especificidad y la memoria inmune. Para lograrlo deben ser capaces de activar la inmunidad adaptativa, expandiendo células efectoras y de memoria (Fig. 1). A su vez, para generar una adecuada inmunidad adaptativa, se requiere inducir una adecuada inmunidad innata. En este punto es fundamental la acción del adyuvante, ya sea como un componente individual o parte del microorganismo¹⁰.

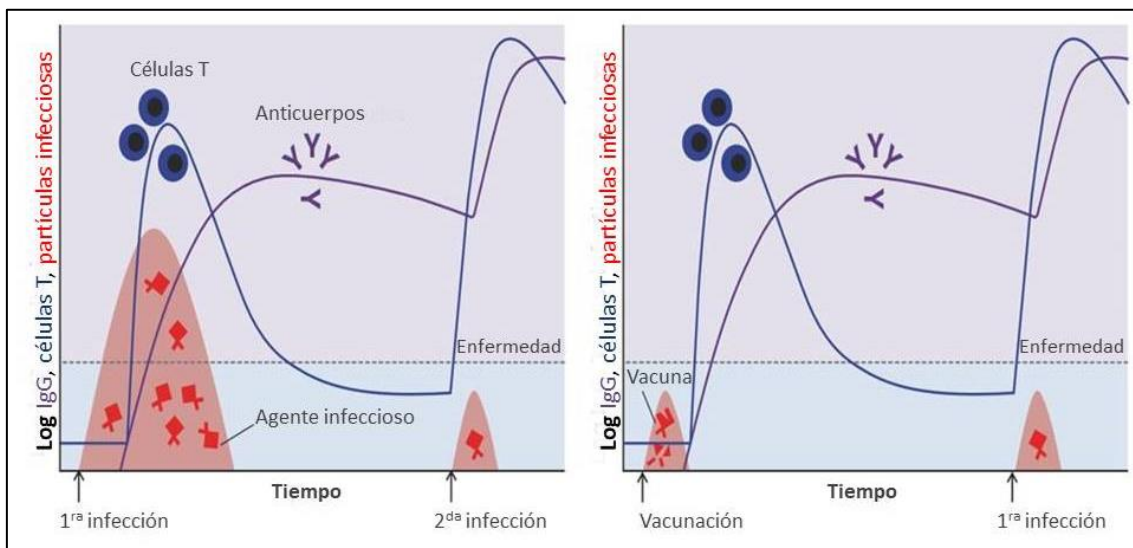


Figura 1: Mecanismo de acción de la vacunación. Comparación de la inmunidad generada por una primera infección por un patógeno y como consecuencia de la aplicación de la vacunación preventiva.

Durante décadas, el desarrollo de las vacunas se guio en medidas de parámetros sencillos, como los títulos de anticuerpos antígeno-específicos para evaluar la respuesta inmune generada. Si bien la principal función de una vacuna en un proceso infeccioso es la inducción de anticuerpos neutralizantes este criterio suele presentar limitaciones importantes y no capta la complejidad de la respuesta inmune a la vacunación. Esto es lo que está ocurriendo con las vacunas contra la COVID-19 y la evolución del SARS-CoV-2, la cual justamente está dirigida a evadir a estos anticuerpos neutralizantes. Sin embargo, las vacunas contra el SARS-CoV-2 siguen siendo altamente eficientes en evitar la enfermedad severa. Por lo tanto, el concepto de protección vacunal va más allá de la generación de anticuerpos específicos. Es por ello, y gracias a los avances en el conocimiento del sistema inmune y la tecnología desarrollada, que se pudo plantear otra manera de desarrollar y optimizar candidatos vacunales empleando la integración de genómica, transcriptómica, proteómica, metabolómica junto con datos clínicos e inmunológicos clásicos (Fig. 2). Se trata de un nuevo enfoque integral muy promisorio que permite caracterizar los mecanismos de acción de las vacunas, y además permite definir biomarcadores de protección, seguridad y como potenciadores de la respuesta inmune¹¹⁻¹³.

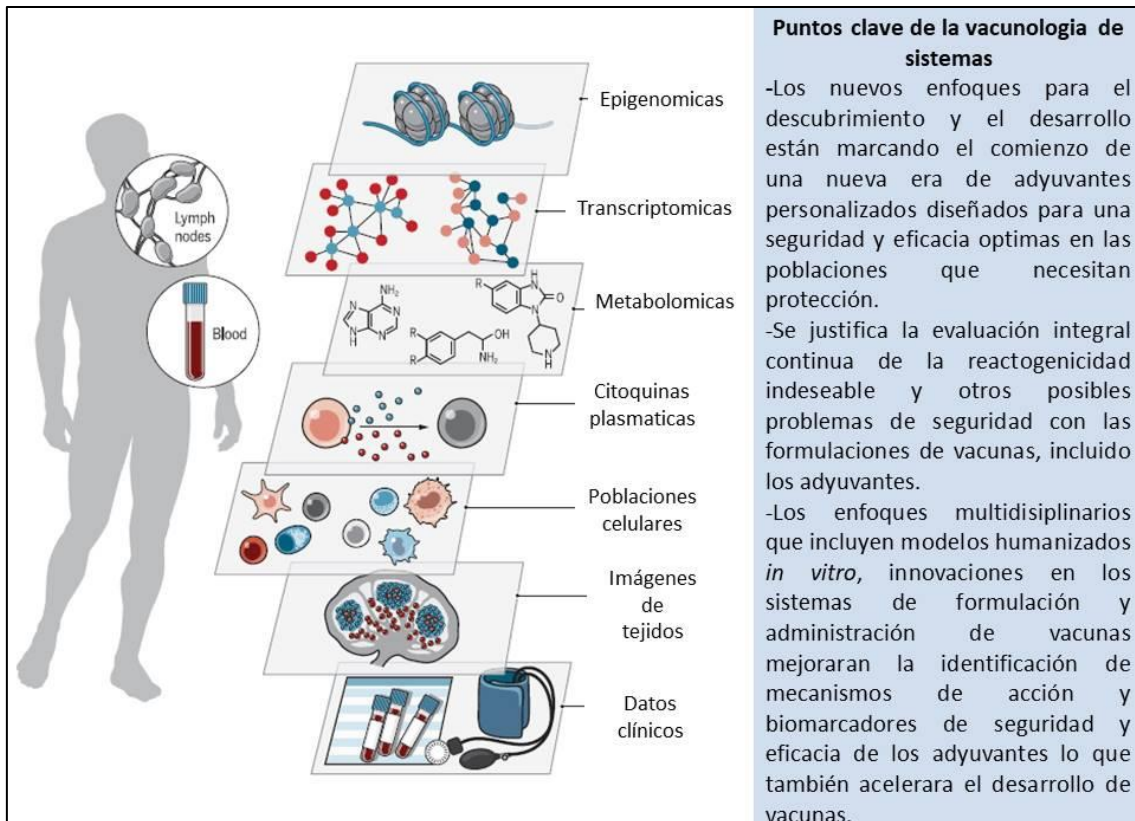


Figura 2: Nuevo marco de estudio para el desarrollo de vacunas y adyuvantes. Nuevos parámetros de estudio obtenidos por las "ómicas", respuestas celulares, datos histológicos y clínicos a tener en cuenta para los desarrollos de candidatos vacunales (Adaptación de Pulendran, Bali, and Mark M Davis 2020).

El inmunógeno como un componente principal en una formulación vacunal

Las primeras vacunas desarrolladas se basaban en el empleo de microorganismos vivos atenuados o químicamente inactivados que promovían la inmunidad humoral mediada por anticuerpos y la inmunidad celular mediada por linfocitos T efectoras y de memoria. Este espectro de mecanismos efectoras inmunes inducidos por la vacunación, junto a la inmunidad natural inducida por infecciones silentes del microorganismo salvaje podría explicar la capacidad de las vacunas de inducir una potente y duradera protección. Este fenómeno de inmunidad combinada o inmunidad híbrida indudablemente potencia la acción de las vacunas.

El mayor conocimiento de los procesos infecciosos y los desarrollos de una amplia producción de inmunógenos han generado una variedad más extensa de candidatos vacunales.

Entre las vacunas más efectivas, las compuestas por **virus vivos atenuados** son las que más se han estudiado porque el virus pierde su patogenicidad al mismo tiempo que mantienen la infectividad e inmunogenicidad. Podemos citar las vacunas para rubéola, paperas, sarampión, fiebre amarilla, poliomielitis, rabia etc. Actualmente se encuentran disponibles vacunas bacterianas vivas atenuadas contra la tuberculosis que emplea *Mycobacterium bovis* y se la conoce como BCG, contra el cólera monovalente y bivalente (Dukoral[®], Shanchol[™] y Euvichol-Plus[®]). Por otro lado, las vacunas con **microorganismos muertos** son ampliamente utilizadas (hepatitis A, poliomielitis, rabia, etc.), suelen ser menos inmunogénicas, por lo que requiere que sean administradas con mayor frecuencia y empleando adyuvantes. Estas vacunas son más seguras que las que emplean microorganismos vivos, dado que estos pueden no multiplicarse ni diseminarse¹⁴⁻¹⁵.

Otra alternativa en el diseño de vacunas son las de **subunidad** o vacunas acelulares. Aquí se emplean subunidades proteicas o polisacáridos derivados de patógenos. Dado que no todas las moléculas tienen la misma inmunogenicidad, en general en estas vacunas es necesario combinar al inmunógeno con un adyuvante para estimular una respuesta inmune más eficiente. Por otro lado, algunos componentes como los polisacáridos carecen de capacidad de activar la inmunidad T. Esto determina su incapacidad de inducir la maduración de la respuesta inmune y una memoria efectiva. En este caso se pueden generar vacunas conjugadas, uniendo covalentemente el polisacárido a una proteína como es el caso de las vacunas para neumococos. Otro ejemplo de vacunas a subunidad es la triple bacteriana DPT que es una combinación de toxoides diftéricos y tetánicos purificados en una suspensión de bacilos inactivados de *Bordetella pertusis*. Por otro lado, el empleo de la tecnología de ADN recombinante ha sido importante en los últimos años en el desarrollo de vacunas, tanto para la obtención de inmunógenos recombinantes (vacunas para el virus de la hepatitis B o para el virus del papiloma) como para la formulación vacunal (ADN o ARNm codificante de proteínas virales). En particular las vacunas a ARNm han sido licenciadas y aplicadas por primera vez en la reciente pandemia COVID-19¹⁶⁻¹⁸. La ventaja de las vacunas genéticas es que de por sí solas activan la inmunidad innata, a través de los receptores de ácidos nucleicos, y las proteínas son producidas por las

propias células por lo cual pueden activar tanto la inmunidad humoral como celular. Si bien estas vacunas han mostrado una eficacia de protección muy elevadas, principalmente las vacunas a ARNm, presentan ciertas desventajas: no se puede controlar exactamente la producción del inmunógeno in vivo, para el caso de las vacunas a ARNm, la molécula es altamente inestable y se requiere el empleo de vehículos protectores, en general liposomas, y promueven la activación de las vías inflamatorias de interferones tipo 1 que pueden generar efectos indeseables. Sin embargo, avances tecnológicos alcanzados en estos últimos dos años en cuanto a la modificación estructura del ARNm, y en la formulación de los liposomas, han permitido un mayor control de estos puntos. Esto se ha evidenciado recientemente en las vacunas a ARNm para la COVID-19, que han evitado la enfermedad severa y han limitado el desarrollo de la pandemia.

De toda esta variedad de vacunas, las más seguras han demostrado ser las que emplean microorganismos muertos o subunidades proteicas recombinantes, aunque estas últimas requiere en su gran mayoría la adición de un adyuvante. Estas vacunas tienen parámetros de seguridad elevados y permiten controlar la dosis de inmunógeno efectiva para inducir una inmunidad específica y protectora.

El adyuvante como un componente de una formulación vacunal

La palabra adyuvante deriva del latín *adjuvare*, que significa "ayudar". Un adyuvante inmunológico se define como cualquier sustancia que actúa para acelerar, prolongar y/o mejorar las respuestas inmunitarias ante antígenos específicos. Las vacunas que no son formuladas con adyuvantes y sólo contienen proteínas recombinantes inducen una modesta respuesta celular T CD4 con una baja producción de anticuerpos y reducida eficiencia para generar memoria inmune. Por esta razón las vacunas acelulares deben tener en su formulación un adyuvante. Las funciones del adyuvante son: generar un efecto depot o liberación lenta y sostenida en el tiempo del inmunógeno para generar memoria y activar la inmunidad innata para generar una eficiente inmunidad adaptativa (Fig. 3). Por lo tanto, un adyuvante debe promover un proceso inflamatorio controlado y generar baja o nula toxicidad, condición primordial

de una vacuna. Además, los adyuvantes deben ser biocompatibles y biodegradables. El desarrollo de nuevas formulaciones vacunales con adyuvantes ha sido un proceso importante y de alto desarrollo en las últimas décadas. Sin embargo, por tratarse de un proceso complejo que insuere tiempo, la aprobación de nuevos adyuvantes para uso en humanos ha sido muy limitado.

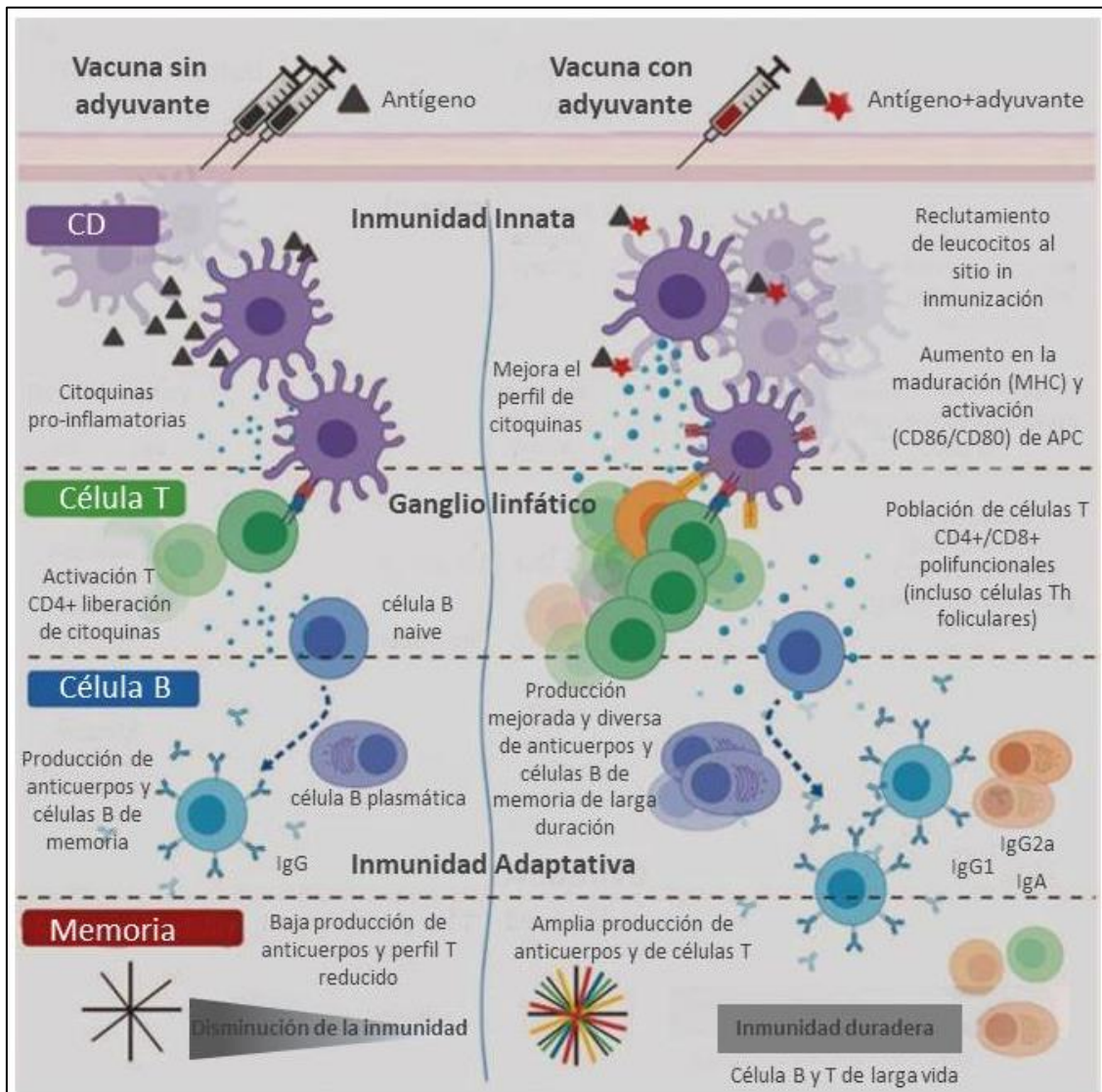


Figura 3: Diferencia en la respuesta inmune de una vacuna acelar en presencia y ausencia de adyuvante. (Adaptación de Nanishi, Etsuro et al. 2020).

Los adyuvantes actualmente utilizados en vacunas para humanos son principalmente las sales de aluminio o Alum (hidróxido de aluminio y fosfato de aluminio), las emulsiones a base de aceites como el MF59 y los sistemas de adyuvantes ASO desarrollados por Glaxo Smith Kline. Estos últimos se basan en moléculas clásicas

como aluminio, emulsiones y liposomas para obtener un máximo efecto cuando se combinan con moléculas inmunoestimuladoras como los ligandos de TLR (Tabla 1) ^{3,19-24}. La combinación de sistemas adyuvantes puede ser un poderoso enfoque para mejorar la inmunogenicidad de una vacuna ²⁵. Como cualquier agente farmacológico las combinaciones pueden demostrar aditividad, antagonismo o sinergia ²⁶. Por ejemplo, el AS04 consiste en MPL (3-O-desacil-4'-monofosforil lipíd A), que es un derivado detoxificado del LPS de *Salmonella Minnesota*, absorbido en sales de aluminio ²⁷, se emplea por ejemplo en la vacuna para el virus de papiloma; el AS03 es una emulsión de aceite de escualeno en agua, similar al MF59, y contiene vitamina E (α -tocoferol) como inmunoestimulante ²⁸, se lo emplea en las vacunas para influenza; el AS01 que consiste en liposomas que encapsulan MPL y una fracción purificada de la saponina QS-21, es empleado en vacunas contra el parásito *Plasmodium falciparum* o contra el *Herpes zoster* ²⁹ (Tabla 1).

Sin embargo, hay vacunas que no requieren el uso de adyuvantes adicionales en la formulación. Son las vacunas que emplean microorganismos, tanto atenuados como muertos. Estas vacunas resultan ser más efectivas que las acelulares con proteínas recombinantes, y esto se debe a que los microorganismos contienen componentes con poder adyuvante o PAMPs/DAMPs ^{1,11,30}.

Tabla 1: Adyuvantes comerciales utilizados en vacunas aprobadas para uso en humanos.

Adyuvante	Que sabemos
Alum Hidroxido de Aluminio Fosfato de Aluminio	*Respuesta independiente de señalización TLR *Activación del inflamosoma NLRP3 en macrófagos y CDs *Activación de CDs mediada por ácido urico *Reclutamiento rápido de neutrófilos y formación de NETs *Induce muerte celular con liberación de ADN que dispara la activación STING-IRF3, necesaria para la producción de IgE y respuesta Th2
MF59 Squaleno Tween (polysorbato) 80 Span 85	*Activación de macrófagos y CDs en lugar de inyección *Inducción de secreción de citoquinas *Respuesta humoral y celular CD4+ dependiente de la liberación de ATP de células musculares *Células T CD8 antígeno específica en tejido dependiente de RIPK3
AS04 Alum MPL	*CDs con mayor presentación de antígenos comparado con Alum *Activación por TLR4 por MPL *Alum prolonga la respuesta inducida por MPL
AS03 Escualeno α -tocoferol Tween (polysorbato) 80	*Inducción de actividad NF-kb y respuesta de quimioquinas en ganglios linfáticos drenaje en ratón entre 6 y 48 hs * α -tocoferol activa monocitos y macrófagos humanos
AS01 MPL QS-21 Liposomas	*Secreción local de quimioquinas, IFN- γ por células NK y células CD8+ en ganglio linfático drenante *Activación de caspasa 1 por QS-21 *Poblaciones heterogéneas de CDs responsables de la activación de células T en ganglio linfático drenante
CpG 1018 22-mer ADN simple cadena	*Activación mediante TLR9 siguiendo la vía de MyD88 y respuesta IFN-I

Por lo tanto, en la elección de un adyuvante para la formulación de una vacuna para prevenir enfermedades infecciosas se deben considerar distintos factores que resultan del conocimiento de la patogenia de la enfermedad, de la inmunidad natural inducida, de la identificación de los mecanismos efectores protectores, de la naturaleza del inmunógeno seleccionado, del mecanismo de acción del adyuvante, de la población etaria a la que está dirigida la vacuna, del grupo de riesgo seleccionado (adultos mayores, embarazadas, pacientes con comorbilidades) y las fases clínicas (en individuos sanos y voluntarios).

Vacunas preventivas y terapéuticas

Si bien las vacunas tradicionales son preventivas y están dirigidas a evitar procesos infecciosos, el desarrollo de nuevos adyuvantes y el mejor conocimiento de muchas inmunopatologías han generado el interés en desarrollar vacunas terapéuticas que reviertan un proceso patológico. Las vacunas preventivas se aplican en individuos sanos y están en su gran mayoría dirigidas a generar mecanismos efectores protectores frente a microorganismos infecciosos. Entre ellos los más importantes son los anticuerpos neutralizantes que bloquean la infección de las células o la acción de componentes secretados por los microorganismos sobre células propias. Por otro lado, las vacunas terapéuticas se administran a pacientes con enfermedades ya establecidas (cáncer, alergias, autoinmunidad, etc.) y están dirigidas a promover la inmunoestimulación (tumores) o tolerancia (alergias y enfermedades autoinmunes)^{31,32}. Por lo tanto, este tipo de vacunas significan un desafío importante para el desarrollo de nuevos adyuvantes. El concepto de adyuvantes tolerizantes ha promovido un nuevo campo a explorar, dado que están dirigidos a patologías en las que la tolerancia se encuentra alterada³³.

Vacunas sistémicas y mucosales

Si bien existe una amplia evidencia de que la vacunación sistémica es adecuada para generar protección contra patógenos que ingresan por mucosas (su gran mayoría), un número creciente de estudios ha demostrado que la inducción de inmunidad en las mucosas promueve una protección más eficaz y duradera³⁴. El sistema inmune de mucosas es más accesible para la inducción de una respuesta inmune en una infección mucosal porque todas las superficies de las mucosas pueden, en principio, actuar como sitios de entrada de antígenos y aquí se concentran las células del sistema inmune para controlar el ingreso de los microorganismos. Sobre la base de esta premisa, la vacunación a través de las mucosas es una estrategia de generación de inmunidad muy atractiva para promover una protección de primera línea en el sitio de entrada del patógeno. Esto permite prevenir el establecimiento y la diseminación de un determinado microorganismo. Además, la inmunización en una

determinada mucosa no sólo promueve una inmunidad local, sino también sistémica, y de esta manera se puede proteger otras mucosas a distancia, dado que éstas están interrelacionadas entre sí³⁵.

Si bien la inmunidad mucosal presenta algunas ventajas sobre la sistémica para controlar infecciones mucosales, esto no significa que la inmunidad sistémica no sea efectiva en este tipo de infecciones. La prueba más contundente es que la gran mayoría de las infecciones son mucosales (respiratorias y gastrointestinales) y las vacunas son principalmente sistémicas. Entre las principales ventajas de una vacuna mucosal es que además de inducir inmunidad sistémica, promueve una inmunidad localizada en el sitio de infección, más potente y duradera. El hecho de activar linfocitos B en los centros germinales e inducir preferencialmente el cambio de isotipo a IgA y sintetizarse como dímero, genera un isotipo de inmunoglobulina con capacidad de trastocarse a lumen de la mucosa para posibilitar la exclusión del antígeno y evitar su translocación al medio interno. La IgA presenta una glicosilación diferencial que la hace más adherente al moco y además con mayor valencia que la inmunoglobulina monomérica. Por tratarse las mucosas de un tejido con gran superficie expuesta, existe una enorme capacidad de generar IgA y de hecho se sintetizan varios gramos de IgA por día. Pero un aspecto diferencial de la inmunidad mucosal es la capacidad de generar memoria local, además de la sistémica. La activación de linfocitos B y T efectores mucosales genera también linfocitos de memoria residentes de tejidos (TRM) que se alojan en las mucosas^{36,37}, aunque también pueden encontrarse en cerebro³⁸ e hígado^{39,40}. Dado que las células de memoria tienen un umbral de activación inferior a los linfocitos naïve, y se encuentran preformadas en los sitios mucosales, frente a una reinfección, los TRM se activan y expanden más rápidamente que un linfocito virgen⁴¹. Por otro lado, una inmunización mucosal, como mencionamos previamente, activa también la inmunidad sistémica. Esto significa que la administración mucosal genera linfocitos B y T que se alojan en médula ósea y además en la mucosa. Esto induce una memoria inmune de larga duración. Dado que una de las principales funciones de una vacuna es generar una inmunidad protectora duradera en el tiempo, este último aspecto es fundamental en una vacuna mucosal. Si

bien con una vacuna sistémica se generan mecanismos efectores protectores en las mucosas, éstos son más potentes y eficientes cuando se inducen localmente ^{42,43}.

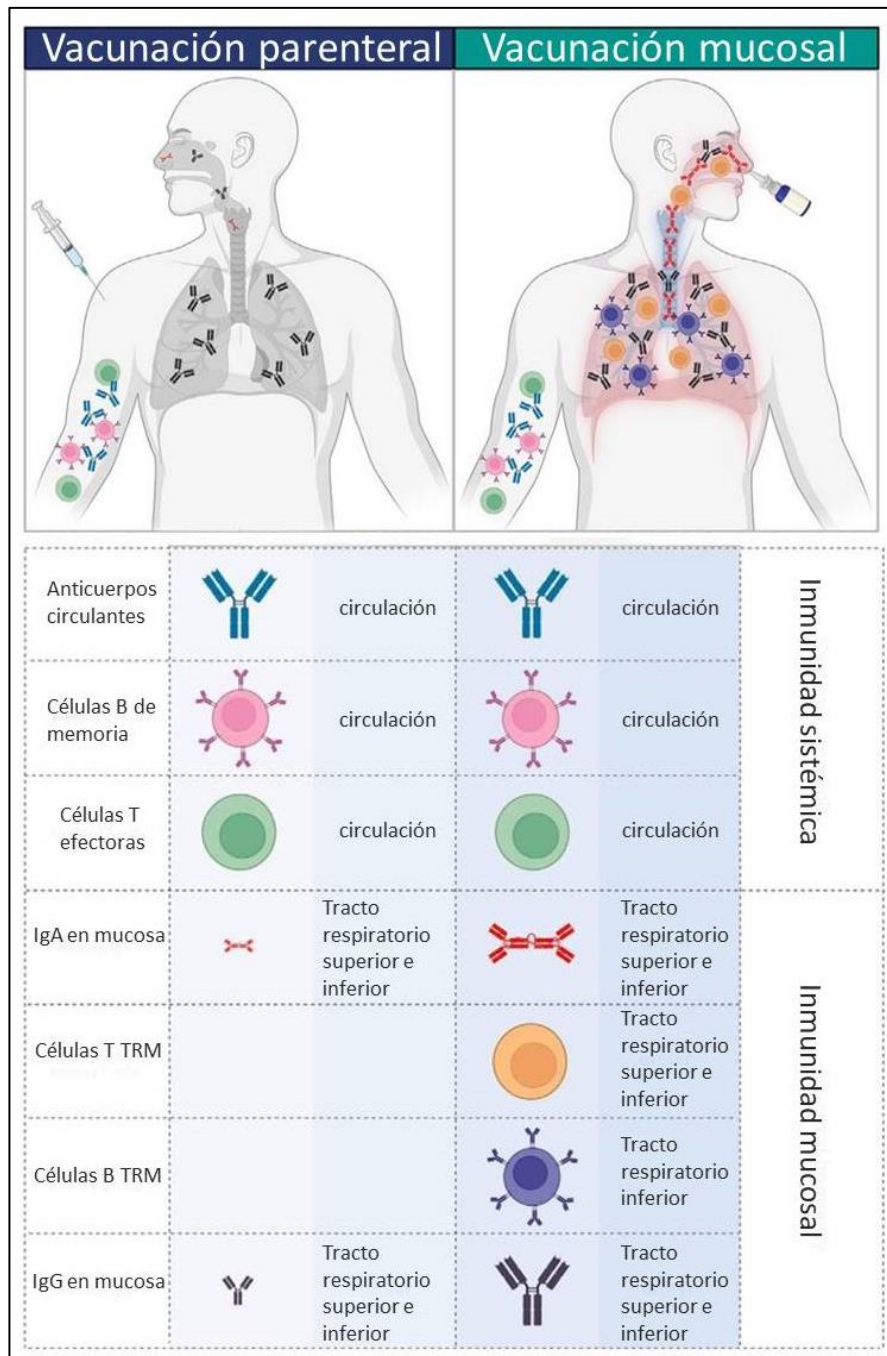


Figura 4: Inmunización sistémica vs. mucosal. (Adaptación de Pilapitiya, Devaki et al 2023).

A pesar de que las vacunas mucosales presentan importantes ventajas sobre las sistémicas para generar protección frente a una infección mucosal, es muy limitado el número de vacunas aprobadas para uso en humanos. En su gran mayoría son a base de

microorganismos vivos atenuados, inactivados o con vectores virales (Tabla 2). Las vacunas mucosales son de aplicación sencilla y utilizan en sus formulaciones una baja carga antigénica, finalmente generando menos efectos adversos⁴⁴.

Tabla 2: Vacunas mucosales licenciadas.

Tipo de vacuna	Nombre	Antígeno	Formulación	Patología	Administración
Viva atenuada	OPV (b/m/tOPV)	Poliovirus	Acuosa	Poliomielitis	Oral
Viva atenuada	Fluenz™/FluMist	Influenza A / B	Spray	Influenza	Nasal
Viva no infectiva	RotaTeq	Rotavirus	Acuosa	Diarrea infantil	Oral
Viva atenuada	Rotarix	Rix4414	Acuosa	Diarrea infantil	Oral
Inactivada	Euvichol/Shancol	<i>Vibrio cholerae</i>	Acuosa	Colera	Oral
Viva atenuada	Vivotil	<i>Salmonella typhimurium</i>	Capsula	Gastroenteritis aguda	Oral
Vector viral	Adenovirus tipo 4 y 7	Adenovirus tipo 4 y 8		Fiebre respiratoria aguda	Oral
Viva atenuada	Vaxchora	<i>Vibrio cholerae</i>	Acuosa	Colera	Oral

Los principales obstáculos en el desarrollo de vacunas mucosales son el adyuvante y la necesidad de un vehículo para proteger a los componentes vacunales (en las mucosas prevalece la degradación a través de enzimas o cambios de pH) y para dirigirlos al sitio de interés.

Utilización de un vehículo carrier en formulaciones vacunales

La utilización de un carrier o vehículo no sólo se limita a las vacunas mucosales, sino también a las vacunas sistémicas. Existen vehículos o nanopartículas dirigidas por ejemplo a células dendríticas para dirigir al inmunógeno y al adyuvante a la misma célula presentadora de antígenos y de esta manera activar a la célula que va a presentar péptidos provenientes del inmunógeno a los linfocitos T^{45,46}. Esto es relevante para los inmunógenos recombinantes que no tienen propiedades adyuvantes o presentan una baja inmunogenicidad. Por ejemplo, cuando se usan estructuras proteicas mínimas que imitan los epitopes reconocidos por los anticuerpos neutralizantes, los cuales debido a su pequeño tamaño resultan ser poco inmunogénicos, aumentan su inmunogenicidad cuando son acoplados a sistemas de partículas como las nanopartículas de oro o liposomas⁴⁷⁻⁴⁹.

El desarrollo de la nanotecnología, como se describirá en la sección siguiente, ha significado un aporte muy importante en este campo. Se han diseñado

nanopartículas con diferentes propiedades que están siendo estudiadas profundamente en su aplicación en vacunas mucosales. En este sentido, el tamaño, la carga y la forma de las nanopartículas juegan un papel importante en la adhesión al mucus, la interacción con la barrera epitelial, captación por células blanco de interés y su posterior activación celular, y también en la inducción de mecanismos inmunes protectores ^{50,51}. Entre estos últimos, podemos mencionar la capacidad de ciertas nanopartículas de inducir mecanismos inflamatorios o de promover la presentación cruzada de antígenos en células dendríticas ⁵²⁻⁵⁴.

Como se puede observar en la Figura 5 se pueden diseñar partículas que puedan penetrar la barrera de mucus a través de la mucoadhesión, mucopenetración o mucolisis. También, se pueden conjugar ligandos agonistas de TLR para dirigir la partícula a células portadoras de estos receptores de la inmunidad innata (células epiteliales, células dendríticas, macrófagos o células M) ⁵⁵. Dado que las células epiteliales son la interfase entre el medio interno y el lumen mucosal, y las células dendríticas y los macrófagos son las encargadas de captar los antígenos presentes en el lumen y de activar a los linfocitos T vírgenes y de memoria, estas células constituyen blancos relevantes al momento de diseñar vacunas mucosales. Por lo tanto, la capacidad de dirigir los componentes vacunales a estas células es un aspecto crucial que debe cumplir el vehículo para dar inicio a una respuesta inmune específica y protectora.

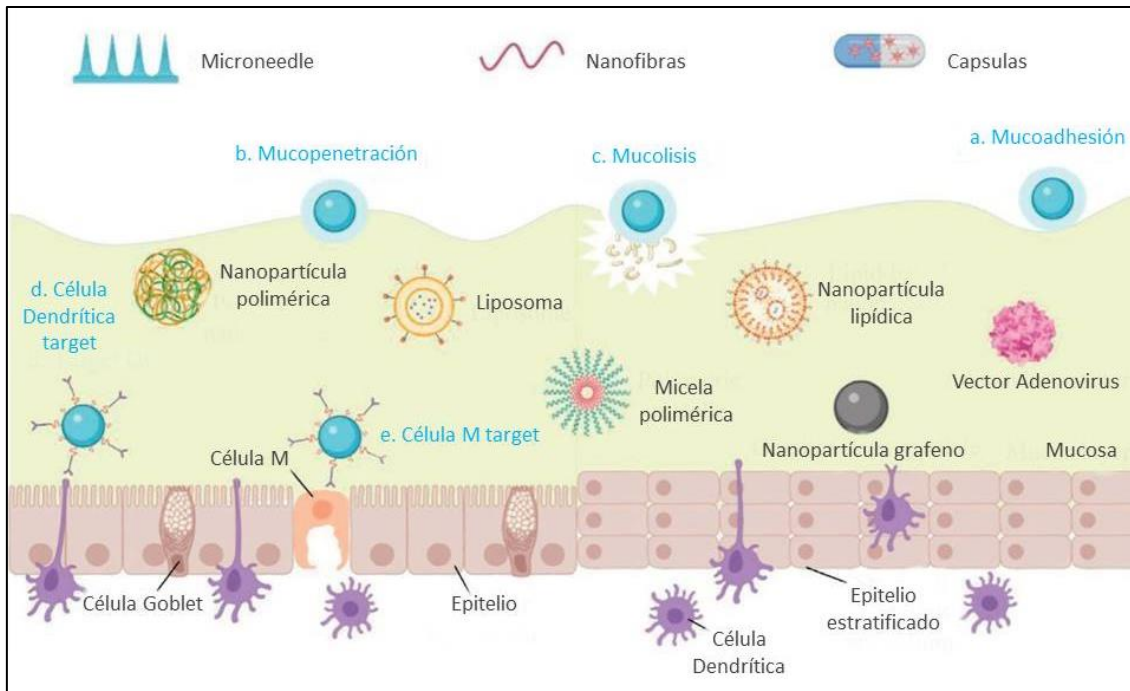


Figura 5: Estrategias y mecanismos de ingreso a las mucosas de las nanopartículas como vehículo en una vacuna mucosal (Adaptación de Huang, Mengwen et al 2022).

Finalmente, y dado que la inducción de mecanismos efectores y la generación de memoria requiere una correcta activación inicial de la inmunidad innata, dirigir los componentes vacunales a las células mencionadas resulta crucial.

2-Nanotecnología

La nanotecnología es la aplicación del conocimiento científico para manipular y controlar la materia predominantemente en la nanoescala (rango de longitud aproximadamente de 1 nm a 100 nm) para hacer uso de propiedades y fenómenos dependientes del tamaño y las distintas estructuras que se pueden obtener dependiendo del material y su composición. Es una disciplina que se encuentra en constante crecimiento en diversas áreas, como pueden ser la industria textil, química, alimenticia, farmacéutica, y con gran impacto en biomedicina tanto en salud humana como veterinaria.

La Organización Internacional de Normalización (ISO de sus siglas en inglés International Organization for Standardization) define "nanomaterial" como un "material con cualquier dimensión externa, interna o una estructura superficial en la

nanoescala" y un "nano-objeto" como una "nanopartícula" siendo "pieza discreta de material con las tres dimensiones en la nanoescala". (ISO/TS 80004-1:2015(en), Nanotechnologies — Vocabulary — Part 1: Core terms. Available at: <https://www.iso.org/obp/ui/#iso:std:iso:ts:80004:-1:ed-2:v1:en>. (Accessed: 29th March 2019). En la Figura 6 se muestran, en forma comparativa y esquemática diferentes estructuras presentes en la naturaleza y con sus respectivos tamaños, con nanopartículas de distinto origen.

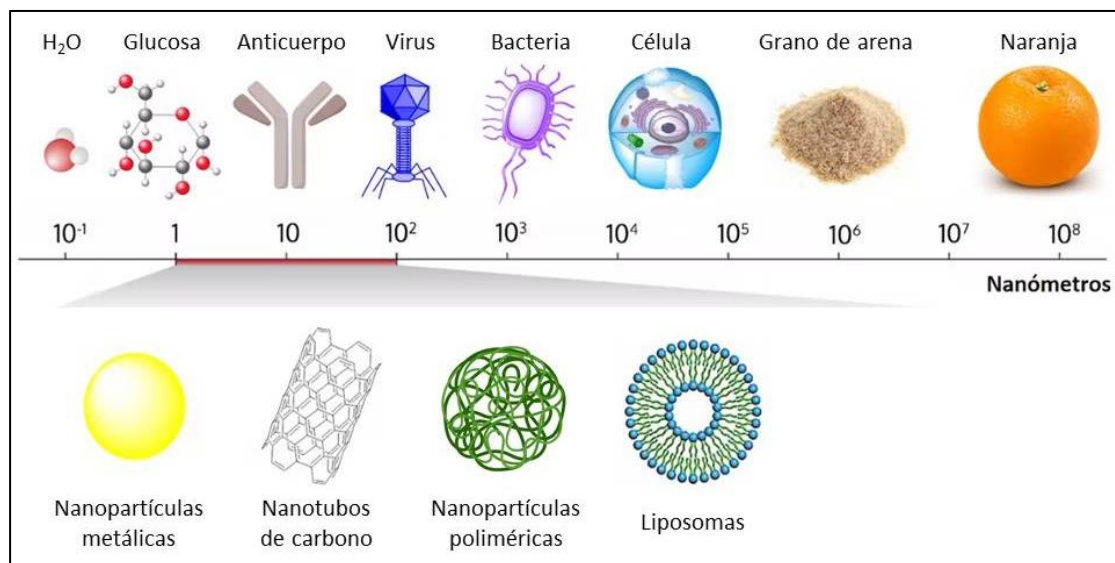


Figura 6: Nanoescala, relación de tamaños en nanómetros. Las nanopartículas abarcan el rango entre 1 y 100nm.

Los materiales con que se sintetizan las nanopartículas pueden cambiar drásticamente sus propiedades cuando las dimensiones toman valores dentro de la nanoescala, con la particularidad que estas nuevas propiedades no pueden ser predichas cuando se trabaja con el material en dimensiones macroscópicas o a gran escala. Las nanopartículas actualmente más utilizadas y descritas son las llamadas **nanopartículas inorgánicas** como son las de oro, plata, silicio, zinc y titanio^{56,57}. Si bien se describen como agentes antibacterianos, y se emplean en la medicina con tal fin, suelen presentar efectos adversos y tóxicos dependiendo de su concentración, vía de ingreso y distribución en el organismo. En cambio, las **nanopartículas poliméricas**, pueden variar su tamaño, forma, carga neta y capacidad de encapsular alguna droga o inmunógeno por lo que las hace más versátiles. Debido a que todas estas variables fisicoquímicas se pueden manipular y modificar, es posible diseñar nanopartículas en

función de lo que se desee encapsular y el efecto biológico deseado. Es por ello que la nanotecnología ha tomado un valor muy importante en la biomedicina. Es sabido que dependiendo del tamaño, la carga y la estabilidad frente al pH, las nanopartículas a base de polímeros orgánicos, las nanopartículas inorgánicas y las sales de aluminio, se caracterizan por su capacidad de activar la inmunidad innata⁵⁸⁻⁶². Además, pueden inducir mecanismos de senescencia o ser totalmente inertes.

Nanopartículas y su interacción con células de la inmunidad innata

El sistema inmune reacciona a los materiales extraños con acciones defensivas sólo si se perciben como potencialmente peligrosos. En el caso de las nanopartículas, como ocurre con muchos otros agentes transmitidos por el medio ambiente (como las partículas de polvo y los microorganismos), las barreras biológicas y los sistemas de eliminación del organismo son, en la mayoría de los casos, suficientes para excluirlas, y los mecanismos de reconocimiento inmunitario no se activan. En otros casos, las nanopartículas pueden inducir una reacción inmune que promueve la eliminación de las mismas. Las células efectoras que intervienen principalmente en esta reacción son aquellas con capacidad fagocíticas. Es por ello que se comenzó a utilizar el término **NAMPs** (Patrones Moleculares Asociados a Nanopartículas) para los ligandos no patogénicos que pueden desencadenar una respuesta inmune. Al igual que los PAMPs o DAMPs pueden ser reconocidos mediante receptores de reconocimiento de patrones (PRR) presentes en las células del sistema inmune⁶³. Entre los receptores mejor caracterizados para los NAMPs se encuentra un conjunto de moléculas citosólicas de la familia de los receptores tipo NOD (NLR), entre los cuales el inflamosoma NLRP3 es el más estudiado y caracterizado⁶⁴⁻⁶⁶.

El inflamosoma es un complejo multiproteico que para su activación canónica necesita de una primera señal mediada por receptores, por ejemplo LPS vía TLR4, y una segunda señal que suele ser más amplia. En el caso de las nanopartículas, luego de ser internalizadas producen la desestabilización de los lisosomas produciendo la permeabilización de la membrana lisosomal (LMP de sus siglas en inglés *Lysosomal membrane permeabilization*) con la liberación al citosol de componentes que activan al

inflamatosoma. Este, cliva y activa a la caspasa-1, la que cumple una función crucial en la activación canónica de esta vía dado que cliva y activa a las citoquinas proinflamatorias pro-IL-1 β y pro-IL-18, e inclusive puede inducir muerte celular mediante la piroptosis ⁶⁷. En cambio, la activación no canónica del inflamatosoma NLRP3 requiere de la señal extracelular de LPS vía TLR4-MyD88, para la síntesis de pro-IL-1 β y NLRP3 (Fig. 7). Asimismo, también debe estar involucrado el receptor TLR4-TRIF para la inducción y la liberación de IFN tipo I, quien actúa de manera autocrina mediante el receptor de interferón tipo I (IFNAR) para inducir la expresión de caspasa-11. Sin embargo, para que se active la caspasa-11, ésta debe unirse al LPS citosólico ⁶⁸⁻⁷⁰.

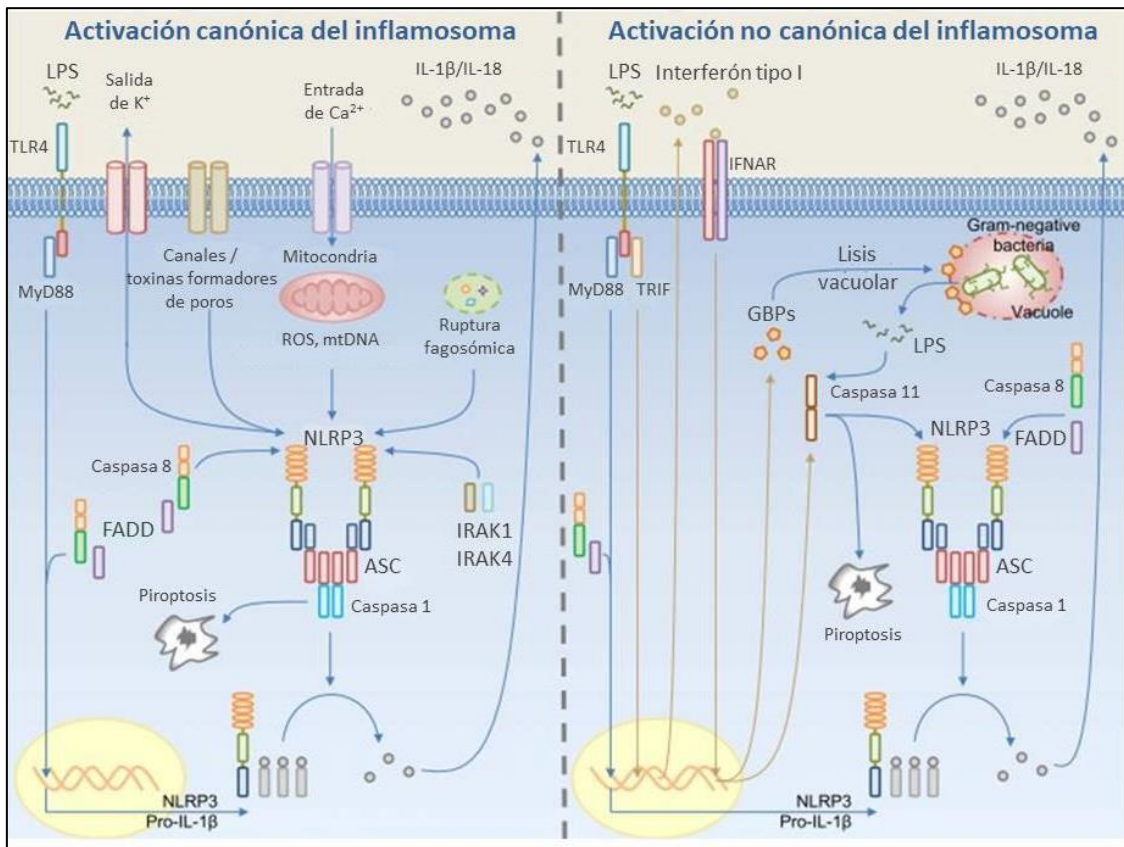


Figura 7: Mecanismo de activación canónica y no canónica del inflamatosoma NLRP3. (Adaptación de Si Ming Man 2015.)

Las nanopartículas dependiendo de sus propiedades fisicoquímicas (composición química, tamaño, carga y tipo de superficie), pueden polarizar y/o reprogramar la respuesta inmune. Por ejemplo, puede inducir la polarización de la diferenciación de macrófagos hacia M1 (fenotipo inflamatorio) o M2 (fenotipo anti inflamatorio), reprogramar un perfil M1 hacia otro M2 y viceversa ⁷¹. Además, las

nanopartículas pueden modular la memoria innata de los macrófagos al disminuir (tolerancia) o mejorar (inmunidad adaptativa) su reactividad ante desafíos posteriores, probablemente a través de cambios epigenéticos⁶¹ (Fig. 8). Además, las nanopartículas pueden activar células dendríticas y de esta manera promover la activación de la inmunidad adaptativa, a través de la reprogramación de las mismas para migrar de un tejido periférico (células dendríticas inmaduras) a un órgano linfoide secundario para interactuar con los linfocitos T (células dendríticas madura). Por otro lado, una vez que las nanopartículas activan a la célula dendrítica y son internalizadas pueden inducir la disrupción mecánica o química de los lisosomas y de esa manera ser liberadas al citosol. Las señales de peligro resultantes liberadas dentro del citoplasma de las células fagocíticas, pueden contribuir a la nanotoxicidad por activación del inflamósoma, pero al mismo tiempo también inducen la liberación del inmunógeno encapsulado. De esta manera un inmunógeno captado del medio extracelular, al ser traslocado al citosol, será procesado y presentado en el contexto MHC clase I, además de ser procesado y presentado a través de la vía endocítica en el contexto clase II. Por lo tanto, entre las propiedades de las nanopartículas podemos incluir su capacidad de inducir la presentación cruzada de antígenos para generar una inmunidad celular dependiente de linfocitos T CD4 y linfocitos T CD8⁷².

La aplicación cada vez más intensiva de la nanotecnología en la vacunología en los últimos años ha generado lo que se denomina “nanovacunología”⁷³. Básicamente se debe, como mencionamos anteriormente, a la gran versatilidad de las nanopartículas en cuanto a su síntesis y propiedades que se pueden alcanzar, lo cual ha llevado a que sean empleadas como una herramienta importante a considerar al momento de diseñar vacunas o vehículos para distribución de drogas y componentes activos dentro de un organismo. El hecho de poder dirigirlas a macrófagos y/o células dendríticas como células blanco ha posibilitado que su empleo como inmunoestimuladores o inmunomoduladores sea una posibilidad atractiva en el diseño de vacunas dirigidas a la prevención o tratamiento de enfermedades infecciosas y no infecciosas.

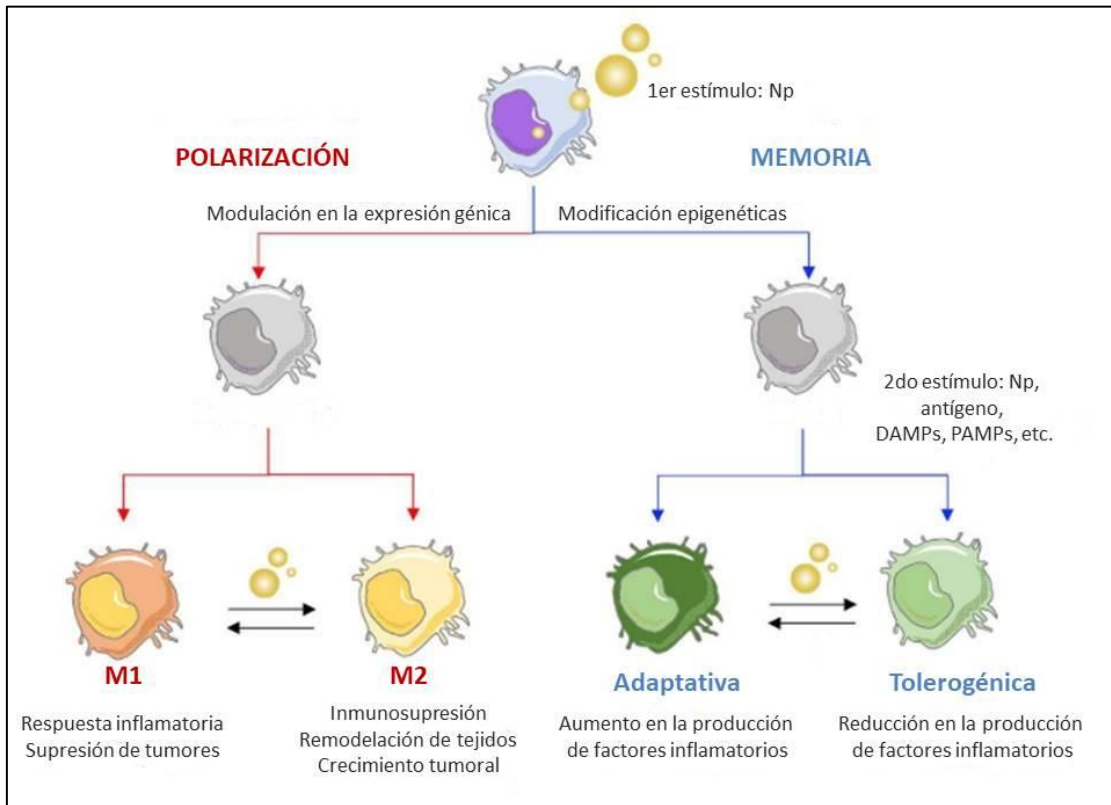


Figura 8: Las nanopartículas pueden inducir polarización de macrófagos y modular sus funciones de diferentes maneras. (Adaptación de Diana Boraschi et al 2017).

En este trabajo se describen principalmente las propiedades biológicas de nanopartícula poliméricas ensambladas con el polímero polialilamina. Estas nanopartículas fueron capaces de activar células innatas mediante la activación de la vía del inflamosoma con la producción y liberación de IL-1 β e IL-18. Además, nuestros hallazgos demuestran que son capaces de activar la inmunidad adaptativa Th1-dependiente con producción de anticuerpos IgG2a específicos y producción y liberación de IFN- γ por células T CD4⁺ y CD8⁺.

HIPÓTESIS DE TRABAJO,
OBJETIVO GENERAL Y
OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Hipótesis de trabajo

Las nanopartículas de polialilamina inducen la activación de la inmunidad innata por medio de mecanismos inflamatorios a través de distintos receptores NLR intracelulares en células presentadoras de antígeno. La activación del inflamosoma induce la liberación de las citoquinas IL-1 β e IL-18, las cuales promueven un foco inflamatorio que activa la inmunidad adaptativa.

Las nanopartículas poseen la capacidad de encapsular antígenos proteicos lo que confiere protección al antígeno para no ser degradado una vez que ingresan al organismo. Esta característica es importante para la formulación de vacunas mucosales, ya que se debe evitar los cambios de pH y enzimas presentes en las mucosas.

La inducción de mecanismos humorales y celulares Th1-dependientes mediante el empleo de nanopartícula de PAH y OVA permiten extrapolar este diseño vacunal a una vacuna para la COVID-19 que permite inducir anticuerpos IgG específicos de alta afinidad y linfocitos T productores de IFN- γ . Estos mecanismos efectores han mostrado ser protectores en las diferentes vacunas actualmente disponibles para la COVID-19.

Las vacunas a subunidades proteicas formuladas con proteínas recombinantes y las nanopartículas como adyuvantes, inducirán una respuesta mucosal Th1-específica de componentes proteicos de *Brucella*, que permitirán prevenir la infección, y diseminación de bacterias *Brucella suis*. La administración intranasal generará una respuesta efectora protectora a nivel pulmonar que controlará la infección bacteriana en la mucosa pulmonar a través de la generación de linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ productoras de IFN- γ que ejercen funciones efectoras protectoras en esta infección.

La administración mucosal de antígenos dietarios junto a las nanopartículas adyuvantes en ratones alérgicos a leche de vaca induce los mecanismos Th1 específicos del antígeno en el intestino y así permite controlar el entorno inflamatorio pro-Th2 que gobierna a las reacciones alérgicas. Por otro lado, la generación de estos linfocitos Th1 productores de IFN- γ protege en forma conjunta las diferentes mucosas

de reacciones de hipersensibilidad frente a la exposición al alérgeno. La administración de la nanopartícula conteniendo a las proteínas de la leche bovina permite conservar y presentar a las mismas en las células presentadora de antígenos (células dendríticas) activadas encargadas de activar a los linfocitos T naïve que inmunomodularán local o sistémicamente a los linfocitos Th2 responsables de contribuir a la generación de un entorno inflamatorio alérgico. De esta manera, esta vacuna terapéutica inmunomoduladora nos permitirá revertir un proceso alérgico no infeccioso.

Objetivo general

El objetivo de este trabajo es desarrollar y validar el empleo de nanopartículas de polialilamina con funciones adyuvantes, protectoras del inmunógeno y como sistema de delivery en la formulación de vacunas sistémicas mucosales en enfermedades no infecciosas (alergia alimentaria) e infecciosas.

Objetivos específicos

El cumplimiento de los siguientes objetivos nos permitirá demostrar la hipótesis de trabajo:

- 1- Construcción y caracterización de nanopartículas de PAH conteniendo distintas proteínas como antígenos: OVA, γRBD, Btaf y β-lactoglobulina.
- 2- Caracterización *in vitro* e *in vivo* de las nanopartículas (distribución celular y tisular, captación y diferenciación de células dendríticas, inducción de linfocitos, activación de linfocitos, células dendríticas y macrófagos).
- 3- Estudio de las nanopartículas en la formulación de una vacuna sistémica contra el SARS-CoV-2.
- 4- Estudio de nanopartículas en la formulación de una vacuna mucosal para prevenir la infección de ratones con bacterias del género *Brucella suis*.

5- Estudio de las nanopartículas en la formulación de una vacuna terapéutica mucosal para la inmunomodulación de alergias IgE-dependientes en un modelo animal pre-clínico de alergia alimentaria IgE-dependiente

6- Estudio de la seguridad, inmunogenicidad, eficacia y duración de la inmunidad protectora inducida por las vacunas preventiva y terapéutica.

MATERIALES Y MÉTODOS

1-Síntesis de Nanopartículas

1.1. Materiales utilizados

Para la construcción de las nanopartículas se utilizaron los siguientes reactivos químicos: hidrocloreto de polialilamina (PAH) (Sigma-Aldrich - Mw=17500), hidrocloreto de polialilamina: fluoresceína isotiocianato 50:1 (PAH-FITC) (Sigma-Aldrich - Mw=56000), tripolifosfato de sodio (Tpp) y fosfato inorgánico (Pi) (Sigma-Aldrich). Para preparar las soluciones de cada uno de los componentes se utilizó agua destilada y agua farmacológica para experimentos de caracterización fisicoquímicos y ensayos biológicos, respectivamente. Para ajustar el pH de las soluciones se utilizó HCl 1 M y NaOH 1 M.

1.2. Método de preparación de Nanopartículas

Se prepara una solución de PAH en medio acuoso tal que la concentración de monómeros sea de 40 mM (Masa molecular PAH=93.5 g/mol). Se ajusta el pH al valor deseado (pH=8.5) mediante agregado NaOH. Esta solución se denomina "Solución A". Por otro lado, se prepara una solución de Tpp en medio acuoso tal que la concentración sea de 24 mM (Masa molecular TPP=367.86 g/mol) y se ajusta el pH con HCl al valor pH=8.5 (igual pH que la solución A). Esta solución se denomina "Solución B". Para obtener una solución de nanopartículas en dispersión coloidal se colocan en un frasco de vidrio o un recipiente de plástico limpio y estéril los siguientes reactivos en el siguiente orden: 1) VPAH mL de solución A; 2) VH₂O mL de agua; 3) VTpp mL de solución B. Para obtener una solución homogénea de nanopartículas, el último agregado (paso 3) debe hacerse de manera rápida y bajo agitación constante. Debe evitarse agregar la solución B lentamente, de a porciones o de a gotas. Se define R como la relación de concentraciones entre monómeros de PAH y Tpp, es decir $R=[Tpp]/[PAH]$. A volumen final Vf y una concentración final de PAH=CPAH, el valor R definirá los volúmenes VPAH, VH₂O y VTpp. Por ejemplo, si Vf=10 mL, CPAH=5 mM y R=0.6, los volúmenes a utilizar serán: VPAH=1.25 mL; VH₂O=7.5 mL y VTpp=1.25 mL. Es decir, los volúmenes se calculan de la siguiente manera:

$$V_{PAH} = (V_f * C_{PAH}) / 40 \text{mM}$$

$$VT_{pp} = (V_f * CPAH * R) / 24 \text{ mM}$$

$$V_{H_2O} = V_f - V_{PAH} - V_{TPP}$$

1.3. Protocolo de adsorción de proteínas en Nanopartículas

Para incorporar proteínas a las nanopartículas PAH/Tpp se añaden las siguientes cantidades en el siguiente orden: 1) VPAH mL de solución A; 2) VH₂O mL de agua; 3) Vprot mL de solución de proteína; 4) VTpp mL de solución B. En este protocolo, la solución madre de proteína debe ser acuosa o en su defecto en buffer Tris o HEPES y no debe superar la concentración de 1 mg/mL. Debe evitarse el uso de buffer fosfato ya que los iones fosfato interfieren en la formación de las nanopartículas. De manera similar que en el caso anterior, el último paso (paso 4) debe realizarse de manera rápida y bajo agitación constante. Sabiendo la concentración final de PAH CPAH, R, el volumen final Vf y la concentración final de proteína Cprot f, se calculan los volúmenes mediante las siguientes relaciones:

$$V_{PAH} = (V_f * CPAH) / 40 \text{ mM}$$

$$V_{Tpp} = (V_f * CPAH * R) / 24 \text{ mM}$$

$$V_{prot} = (V_f * C_{prot f}) / C_{prot i}$$

$$V_{H_2O} = V_f - V_{PAH} - V_{TPP} - V_{prot}$$

Todas las preparaciones se realizaron utilizando materiales apirógenos y agua farmacológica comercial para evitar contaminaciones.

1.4 Medida de encapsulación de proteínas

Luego de la formulación de la nanopartícula en presencia de las proteínas se deja reposar 2 horas a temperatura ambiente. Se toma una alícuota y el resto del volumen se centrifuga a 6000 xg a 4°C durante 20 minutos y se mide la presencia de proteínas en el sobrenadante y en la alícuota de la solución original utilizando el kit comercial BCA (Thermo Scientific) siguiendo las indicaciones del fabricante. Por diferencia se calcula el porcentaje de proteínas encapsuladas.

2- Caracterización biológica *in vitro*

Para realizar la caracterización biológica se utilizaron distintas concentraciones de Np, variando desde 0.25 mM hasta 1.25 mM, siendo la concentración de 0.5 mM la óptima y la utilizada en la mayoría de los ensayos en las siguientes líneas celulares:

- RAW 264.7 (macrófagos murinos) se mantuvieron en medio DMEM-10% suero fetal bovino (SFB), 100 U/mL de penicilina, 100 µg/mL de estreptomina a 37°C en atmósfera de CO₂ al 5% y se sembraron en placa de 48 pocillos a razón de 2×10^5 células/pocillo. Se estimuló ON (overnight) con la Np en presencia o en ausencia de LPS 1 µg/mL. Se recolectó el sobrenadante de cultivo luego del estímulo y se almacenó a -80°C hasta su uso.

- THP-1 (monocitos de sangre periférica humana) se mantuvieron en medio RPMI-10% SFB, 100 U/mL de penicilina, 100 µg/mL de estreptomina a 37°C en atmósfera de CO₂ al 5% y se sembraron en placa de 48 pocillos a razón de $2,5 \times 10^5$ células/pocillo, luego de 30 minutos se estimularon con LPS 1 µg/mL durante 3 horas seguido del estímulo ON con Np. Se cosechó sobrenadante de cultivo y se almacenó a -80°C hasta su uso. Los mismos estímulos se utilizaron para la caracterización mediante citometría de flujo.

- J774 (macrófagos murinos) se mantuvieron en medio DMEM-10% SFB, 100 U/mL de penicilina, 100 µg/mL de estreptomina a 37°C en atmósfera de CO₂ al 5% y se sembraron en placa de 48 pocillos a razón de $2,5 \times 10^5$ células/pocillo. Se estimularon con LPS 1 µg/mL durante 3 horas seguido de la Np entre 2 y 4 horas para microscopía u ON para citometría o detección de citoquinas. Se cosechó el sobrenadante de cultivo y se almacenó a -80°C hasta su uso para medir citoquinas.

- HEK reporteras hTLR4 (células epiteliales humanas de riñón transfectadas con hTLR4/MD-2/CD14 y con el gen de la fosfatasa alcalina embrionaria secretoria, SEAP) se mantuvieron en medio DMEM-10% SFB, 100 U/mL de penicilina, 100 µg/mL de estreptomina a 37°C en atmósfera de CO₂ al 5% y se sembraron en placa de 96 pocillos a razón de 3×10^4 células/pocillo. Con 70% de confluencia, se cambió el medio y estimularon durante ON con Np, proteínas problema y como control positivo se utilizó una curva de dosis-respuesta con distintas concentraciones de LPS. Se cosechó el

sobrenadante de cultivo y se almacenó a -20°C hasta su uso para medir actividad de la fosfatasa alcalina.

- JAWS-II (célula dendrítica/monocito de médula ósea de ratón) se mantuvieron en medio IMDM-10% SFB, 5 ng/mL GM-CSF (Preprotech), 100 U/mL de penicilina, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de estreptomina y β -mercaptoetanol a 37°C en atmósfera de CO_2 al 5%. Se sembró en placas de Petri de 100mm 6×10^6 células con 10 mL de medio completo. Se cosecharon tanto las células en suspensión como las adherentes y se sembraron en placas $2,5 \times 10^5$ células/pocillo en placas de 48 pocillos. Luego del estímulo las células se cosecharon para su caracterización por citometría de flujo y el sobrenadante del cultivo se almacenó a -80°C hasta su uso para medir citoquinas.

- Caco (células epiteliales de adenocarcinoma colorrectal humano) se mantuvieron en medio DMEM piruvato-10% SFB, 100 U/mL de penicilina, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de estreptomina a 37°C en atmósfera de CO_2 al 5% y se sembraron en placas a razón de 3×10^4 células/pocillo en placas de 96 pocillos. Con 70% de confluencia, se cambió el medio y se estimuló durante 1 hora con Flagelina (FLIC, $1 \mu\text{g}/\text{mL}$) seguido de la Np durante toda la noche a 37°C y 5% CO_2 , se cosechó el sobrenadante de cultivo y se almacenó a -80°C hasta su uso.

- HT-29 (células epiteliales de carcinoma de colon humano): se mantuvieron en medio DMEM-10% SFB, 100 U/mL de penicilina, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de estreptomina a 37°C en atmósfera de CO_2 al 5% y se sembraron en placas a razón de 3×10^4 células/pocillo en placas de 96 pocillos. Con 70% de confluencia, se cambió el medio y se estimuló con $\text{TNF-}\alpha$ (10 ng/mL) durante 20 minutos y luego se estimuló con Np durante 3 horas para microscopía o se incubó ON a 37°C y 5 % de CO_2 , se cosechó el sobrenadante de cultivo y se almacenó a -80°C hasta su uso.

- Hek (células epiteliales humanas de riñón) se mantuvieron en medio DMEM-10% SFB, 100 U/mL de penicilina, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de estreptomina a 37°C en atmósfera de CO_2 al 5% y se sembraron en placas a razón de 3×10^4 células/pocillo en placas de 96 pocillos. Con 70% de confluencia, se cambió el medio y estimularon con Np-FITC durante tres horas para la caracterización mediante microscopía confocal.

- Extracción de células de médula ósea (MO) y diferenciación de células dendríticas (BMDC): se utilizó el fémur y la tibia de ratones Balb/c, se eliminó el músculo que los rodea y se cortaron los extremos de los huesos todo bajo condiciones de esterilidad. Con una jeringa de tuberculina con aguja 23g se inyectó 0.5 mL de solución PSE (suero fetal bovino 0.5%, EDTA 2mM en PBS pH7,2) de manera de hacer fluir la médula y recibirla en un tubo estéril. La suspensión celular se centrifugó a 250xg durante 10 minutos y se resuspendió en PSE. Se sembraron en placas de Petri de 100mm 6×10^6 células con 10 mL de RPMI/GM-CSF. Al tercer día se le adicionó 10 mL de medio RPMI/GM-CSF a la placa. Al séptimo día de cultivo se tomó 10 mL de suspensión, se centrifugó por 5 minutos a 500xg, se descartó el sobrenadante y se resuspendió en 10 mL de RPMI/GM-CSF nuevo y se colocó nuevamente en la placa original. Al octavo día las células no adherentes fueron cosechadas con un pipeteo suave para ser sembradas.

- Maduración de DC: Se sembraron 1×10^6 células/pocillo en la placa de 24 pocillos en RPMI 10% SFB, 100 U/mL de penicilina, 100 µg/mL de estreptomina. Se estimuló ON con Np a 37°C 5% de CO₂. Las células se cosecharon para su caracterización para la caracterización por citometría de flujo, se recolectó el sobrenadante de cultivo y se almacenó a -80°C hasta su uso para medir citoquinas.

- Generación de macrófagos derivados de médula ósea (BMDM):

Se obtuvieron células de médula ósea de fémures y tibias de ratones C57BL/6 WT y deficientes en NLRP3, Casp1/11, Casp11, GSDMD e IL-1R de igual manera que en el inciso anterior de obtención de BMDC. Brevemente, las células se sembraron en placas de 24 pocillos a razón de 5×10^5 células/mL (día 0) y se mantuvieron en medio de cultivo DMEM-10% SFB, 100 U/mL de penicilina, 100 µg/mL de estreptomina y 20% de sobrenadante de cultivo de la línea L929 (línea celular de fibroblastos murino productora de M-CSF), a 37°C en una atmósfera de CO₂ al 5% durante 7 días. Al día 4 de incubación, el medio se reemplazó por completo nuevo ⁷⁴.

- Maduración de BMDM: Se sembraron 1×10^6 células/pocillo en la placa de 24 pocillos en DMEM como medio de cultivo. Se estimuló ON con Np a 37°C 5% CO₂. Se recolectó el sobrenadante de cultivo, las células fueron lavadas con PBS y lisadas con 25 µL/pocillo del buffer lisis M-PERR (Mammalian Protein Extraction Reagent, Thermo

Fisher Scientific) agregando cocktail de inhibidor de proteasa (1:100). El sobrenadante de cultivo y el lisado se almacenaron a -80°C hasta su uso.

Estímulos e inhibidores utilizados:

LPS (Sigma) 1 µg/mL

ATP (Sigma) 2.5-5 mM

Inhibidor de caspasa: Z-VAD-FmkQ (Sigma) 10 µg/mL

Anticuerpo monoclonal bloqueante del receptor de interleuquina-1β (IL-1R): Anakinra

Inhibidor de la fagocitosis: Citocalasina D (Santa Cruz) 1 µg/mL

Inhibidor de catepsina B: CA-74Me (Santa Cruz) 50 µM

Hidróxido de aluminio (Alum) o Alhydrogel

2.1 Ensayo de internalización y activación celular

Se estimularon las líneas celulares RAW, J774, THP-1, JAWS, BMDC y BMDM con Np o Np-FITC con 0.5 mM. Se incubaron ON para medir citoquinas en sobrenadante y para caracterizarlas por citometría de flujo. Para microscopía confocal o de epifluorescencia se plaquearon las células en un slide de vidrio de 12mm de diámetro y se estimularon durante 1, 2 o 4 horas. Para citometría de flujo se recolectaron las células, se lavaron con PBS y se marcaron con los anticuerpos específicos CD103, CD14, CD11b, CD11c, MHCII y/o CD86 (Thermofisher) conjugados a diferentes fluorocromos dependiendo del ensayo y el tipo celular. Se centrifugaron durante 10 minutos a 500xg y se resuspendieron en 300 µL de buffer FACS (PBS + 2% SFB + 2 mM EDTA). Las células fueron adquiridas empleando un citómetro de flujo FACScalibur o FACSAria (BD). Para microscopía confocal o epifluorescencia las células fueron estimuladas de igual manera con Np-FITC, se lavaron con PBS y se fijaron con paraformaldehído (PFA) al 2%. Para la marcación de núcleo se utilizó ioduro de propidio o DAPI (1 µg/mL) en PBS durante 15 minutos a temperatura ambiente, luego se lavaron con PBS y se montaron en portaobjeto para ser observadas en microscopio confocal o de epifluorescencia.

2.2 Detección de citoquinas en los sobrenadantes de cultivo por la técnica de ELISA

Las líneas celulares antes mencionadas se estimularon con Np 0.5 mM y se utilizaron con los siguientes controles positivos: 1 µg/mL de LPS durante 3 horas seguido de 2.5 nM de ATP durante 3 horas, 1 µg/mL de LPS durante 3 horas seguido de 50 a 100 µg/mL de hidróxido de Aluminio 24 horas, 1 µg/mL de LPS durante 3 horas seguido de la transfección de un fragmento de ADN de un gen no relacionado con Lipofectamina TM LTX Reagent y con PLUSTM Reagent (Invitrogen) durante 3 horas o 1 µg/mL de LPS durante 3 horas seguido de 20 µM de Nigericina durante 40-45 minutos. El estímulo con Np se realizó durante 24 horas en estufa a 37°C y 5% de CO₂. En el sobrenadante de los cultivos se cuantificó la presencia de citoquinas mediante el empleo de un ELISA de captura de origen comercial anti-humano (Invitrogen) hIL-1β y hIL-8 y anti-ratón (R&D Systems) mL-6, mL-1β, mL-18 y mTNF-α según las especificaciones de los fabricantes.

2.3 Medida de actividad lactato deshidrogenasa (LDH)

La actividad enzimática lactato deshidrogenasa (evaluación de integridad celular) se midió en el sobrenadante de cultivo y lisados celulares (lisados con Cell Culture Lysis 5x Reagent de Promega) con el kit LDH-L comercial (WienerLab) según especificaciones del fabricante. Se midió la densidad óptica (DO) a 340 nm cada 10 minutos durante 2 horas empleando el lector espectrofotómetro de placas VarioskanLux (Thermo scientific).

La actividad de la enzima liberada al medio extracelular se calculó siguiendo la siguiente fórmula: $\%LDH = [SND / (SND + LISIS)] \times 100$, la cual tiene en cuenta la actividad en el sobrenadante (SND) en relación con la suma de la actividad de la enzima presente en el sobrenadante y en el lisado celular (LISIS), individualmente para cada estímulo.

2.4 Western blot

Se caracterizaron los sobrenadantes y los lisados celulares de BMDM por Western blot. Los extractos se prepararon en buffer muestra conteniendo SDS y 2-mercaptoetanol. Se sembraron volúmenes de 20 µL que contengan 10 µg de proteína por calle y se separaron en un gel de SDS-PAGE al 15%. Luego de la corrida electroforética (1 hora a corriente constante de 50 mA), las proteínas fueron electro-transferidas a membranas de nitrocelulosa (Amersham Biosciences, Uppsala, Suecia) en buffer de transferencia (Tris 50mM, glicina 40mM, 10% metanol) durante 1 hora a 300 mA. Las membranas se bloquearon durante 1 hora a temperatura ambiente en una solución de leche descremada al 5% TBS-T (Tris 1mM, NaCl 28mM, KCl 0.6mM, Tween-20 0,1%). Posteriormente se incubaron con los anticuerpos primarios correspondientes durante toda la noche a 4°C. Las membranas se lavaron tres veces durante 5 minutos en TBS-T y se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente con el anticuerpo secundario conjugado a peroxidasa HRP correspondiente (Cell Signaling Technology, Danvers, MA) a una dilución 1:1000.

Se emplearon los siguientes anticuerpos: anticuerpo monoclonal de ratón específico para la subunidad p20 de caspasa-1 (Adipogen, San Diego, CA, EE. UU.) a una dilución 1:1000 y como control de carga proteica se utilizó un anticuerpo monoclonal de ratón anti-β-actina (Cell Signaling Technology, Danvers, MA) a una dilución 1:1000.

El revelado de las bandas en la membrana se visualizaron usando el sustrato de HRP quimioluminiscente Luminol (Millipore) y analizado con el ImageQuant TL Software (GE Healthcare, Buckinghamshire, UK).

2.5 Detección de LPS

Para detección de endotoxinas (lipopolisacáridos) se utilizó la línea celular HEKTLR4 que expresan el receptor tipo Toll 4 acoplado a la secreción de SEAP. Por lo tanto, las células estimuladas con LPS secretan la enzima fosfatasa alcalina al medio extracelular para luego medir su actividad en el sobrenadante. La línea celular se estimuló con Np, PAH, Tpp, agua farmacológica, γRBD, OVA, y LPS como control positivo durante 24 horas a 37°C y en atmósfera de 5% de CO₂. Para las Np y sus

componentes se utilizaron 0.5 mM y 1 µg/mL para γRBD y OVA. El sobrenadante se guardó a -20°C hasta su uso.

2.6 Medida de actividad de fosfatasa alcalina (SEAP)

Para realizar la medida de la actividad enzimática de fosfatasa alcalina se incubaron 30 µL de sobrenadante de cultivo con 60 µL de sustrato (1 mg de crómogeno p-nitrofenil fosfato disódico disuelto en 1 mL buffer para fosfatasa), durante 10 minutos a 37°C, luego se frenó la reacción mediante el empleo de 30 µL EDTA 0,1M y se midió la DO a 405 nm en un lector espectrofotómetro de placas (Variouskan Lux).

3- Caracterización biológica *in vivo*

Animales de laboratorio: Ratones Balb/c de 5 a 7 semanas libres de patógenos fueron provistos por la Facultad de Veterinaria de la Universidad Nacional de La Plata. Los animales se alojaron en el bioterio propio del instituto IIFP y se manipularon siguiendo las pautas internacionales de experimentación con animales. El Comité Institucional para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio (CICUAL) de la Facultad de Ciencias Exactas (Universidad de La Plata) aprobó el protocolo (006-37-21 y 017-10-15). La realización de los modelos de infección con SARS-CoV-2 se realizaron bajo los protocolos aprobados por el Instituto Malbrán (#3300/18).

En Brasil, se adquirieron ratones C57BL/6 de tipo salvaje (WT) y deficientes para los siguientes genes: Nlrp3^{-/-}, Casp1/11^{-/-}, Casp11^{-/-}, Gsdmd^{-/-} e IL-1R^{-/-} de la Universidad Federal de Minas Gerais (UFMG) en el background C57BL/6. Los animales se mantuvieron en la UFMG en ciclos de 12 horas de luz/oscuridad y se usaron entre las 6-9 semanas de la edad. Todos los experimentos con animales se llevaron a cabo de acuerdo con la Ley Federal de Brasil número 11.794, que regula el uso científico de los animales en Brasil, los lineamientos de los Comités Institucionales de Uso y Cuidado de Animales (IACUC), y los lineamientos de la Ley de Bienestar y los reglamentos establecidos por la Panel de la Asociación Americana de Medicina Veterinaria sobre eutanasia. Los animales fueron alimentados, alojados y manipulados en estricto

acuerdo con estas recomendaciones. Todos los protocolos fueron aprobados por el Comité de Ética en la Experimentación Animal (CETEA) de la Universidad Federal de Minas Gerais UFMG con permiso # 165/2019.

3.1. Monitoreo de la biodistribución de Np-FITC *in vivo*

Se administraron las Np a ratones BALB/c por las vías intragástrica (IG) 200 μ L e intranasal (IN) 40 μ L (2 administraciones de 20 μ L en cada orificio nasal) y a distintos tiempos se sacrificaron los animales para la detección de fluorescencia en distintos tejidos por citometría de flujo.

Aislamiento de enterocitos y células mononucleares de lámina propia: Se extrajo la primera porción de intestino delgado (longitud aproximada 10 cm), se colocó en una placa de Petri con PBS 1X donde se removió la grasa que se encuentra por fuera del tubo intestinal. Se retiraron y se recolectaron las placas de Peyer en HBSS para luego procesarlas, y se cortó el intestino longitudinalmente para limpiar el interior y se recolectó en la solución I hasta obtener las muestras de todos los animales. Luego se pasaron a la solución 2 y se incubaron en hielo durante 10 minutos. Al finalizar, se pasaron las muestras a la solución III donde se incubaron a 37°C durante 15-30 minutos en agitación, luego del tiempo cumplido se agitó fuertemente para desprender células epiteliales, estas fueron separadas por centrifugación (5 minutos a 500xg) y guardadas en hielo. Sobre una placa de Petri se cortó con bisturí el tejido remanente y se colocó en la solución IV donde se incubó con agitación a 37°C durante 30 minutos. Para finalizar el disgregado del tejido y obtener la suspensión celular de lámina propia se utilizó jeringa y aguja. La suspensión resultante se filtró mediante un cell strainer de 40 μ m de tamaño de poro, se lavaron con RPMI. Finalmente, se centrifugaron las células a 500xg por 5 minutos y se resuspendieron en buffer FACS para su marcación y análisis por citometría de flujo.

Aislamiento de células de la mucosa sublingual: Se extrajo la mucosa que se encuentra en la cavidad bucal debajo de la lengua y se colocó en la solución I hasta la recolección de todas las muestras. Luego se pasaron a la solución III y se incubaron 20 minutos a 37°C con agitación. Luego de la incubación se agitó varias veces fuertemente para

desprender las células epiteliales, estas fueron separadas por centrifugación (5 minutos a 500xg) y guardadas en hielo. El tejido remanente se cortó con tijera para terminar de disgregar y se pasó a la solución IV e incubó a 37°C durante 30 minutos con agitación. De ser necesario se terminó de disgregar con aguja, jeringa y cell strainer. Se centrifugó durante 5 minutos a 500xg, se resuspendió en buffer FACS para su marcación a análisis por citometría de flujo.

Soluciones empleadas:

SOLUCION I: HBSS, SFB 2-5%, Hepes 10mM, Penicilina y Estreptomicina, agua farmacológica estéril.

SOLUCIÓN II: SOLUCIÓN I más DTT 1 mM.

SOLUCIÓN III: SOLUCIÓN I sin SFB más EDTA 1 mM.

SOLUCIÓN IV: RPMI completo, SFB 10%, Colagenasa (Sigma) 1 mg/mL.

Aislamiento de células de las Placas de Peyer: Las Placas de Peyer aisladas del intestino delgado ⁷⁵ (un ratón puede tener entre 5 y 10 PP distribuidos entre el duodeno y el íleon), se colocan en HBSS y se mantuvieron en hielo hasta la recolección de las Placas de los diferentes animales. Luego, se colocan en el medio de disociación (RPMI base, SFB 10%, penicilina 100 U/mL, estreptomicina 100 U/mL y 1 mg/mL colagenasa) y se incubó por 15-20 minutos a 37°C en agitación. Se diluyo con RPMI completo fresco para inactivar la enzima colagenasa. Se pasó por jeringa y aguja para terminar de disgregar el tejido y luego de filtro usando un Cell strainer de 40µm. La suspensión celular se centrifugó 500xg por 5 minutos, se resuspendió en FACS para su marcación y análisis por citometría de flujo.

Aislamiento de células de ganglios (submaxilares, mesentéricos y mediastínicos) y pulmón: Se extrajeron los ganglios y la totalidad de los pulmones para recolectarlos en 1mL y 3mL de RPMI completo respectivamente (RPMI base, SFB 10%, penicilina 100 U/mL y estreptomicina 100 U/mL), se mantuvieron en hielo hasta el procesamiento posterior. Se agregó colagenasa 1 mg/mL y disgregó con tijeras. Se incubó a 37°C en agitación por 30 minutos y se agregó medio de cultivo fresco para inactivar la colagenasa. Se pasó por jeringa y aguja para completar la disgregación y se filtró la suspensión celular usando Cell strainer de 40µm para obtener la suspensión celular. Se

centrifugó a 500xg por 5 minutos, se resuspendió en FACS para su marcación y análisis por citometría de flujo.

3.2. Análisis de la inmunogenicidad y adyuvanticidad de las Np

Se utilizó un esquema de inmunización por la vía intranasal o intraperitoneal de una vez por semana durante tres semanas o de dos dosis separadas por 14 o 21 días dependiendo del modelo animal y candidato vacunal utilizado.

Como antígeno concepto se utilizó ovoalbúmina EndoFit™ (Invivogen) según datos del fabricante presenta niveles de endotoxina menores a 1 EU/mg lo cual se considera como garantía de apirogenicidad. Para la formulación del candidato vacunal contra *Brucella suis* se utilizó la proteína recombinante Btaf obtenida a partir de cultivo de *Escherichia coli* BL21 (DE3) y detoxificada con Polimixina B⁷⁶ en el Instituto de Estudios de la Inmunidad Humoral (IDEHU-UBA-CONICET). Para la formulación del candidato vacunal contra SARS-CoV-2 se utilizó la proteína recombinante RBD obtenida en cultivo de *Pichia pastoris* y detoxificada con Polimixina B⁷⁷ en el laboratorio del IB3 en la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales de la Universidad Nacional de Buenos Aires (UBA-CONICET).

3.2.1 Inmunización por vía intranasal e intragástrico

Se utilizó un esquema de tres dosis, donde se inmunizó una vez por semana durante tres semanas (días 0, 7 y 14). Los animales fueron anestesiados previamente con isoflurano (1-cloro-2,2,2-trifluoroetil difluoroetil éter) y luego se administró por vía intranasal por instilación en cada narina con pipeta un volumen final de 20 µL con 10 µg de OVA o Btaf por dosis. Bajo el mismo esquema de inmunización se administró por vía intragástrica 100 µg de OVA en 200 µL por dosis. Se tomó muestra de suero antes de cada inmunización. A los 21 días se sacrificaron, en cámara de dióxido de carbono y se tomaron muestra de saliva, suero, lavado broncoalveolar en los cuales se midió la respuesta humoral, además se extrajo el bazo para cultivo de esplenocitos donde se midió la respuesta celular.

Obtención de saliva: Se administró por vía intraperitoneal 100 μ L de una solución 0.02% de pilocarpina clorhidrato (Alcon). Luego de 5 minutos se comienza a recolectar la saliva con pipeta alcanzando un volumen aproximado de 100 μ L. La muestra se conserva a -20°C hasta su uso.

Obtención de células dendríticas: Para evaluar la población de células dendríticas en ganglio mesentérico y en Placas de Peyer, las muestras de los distintos grupos de animales inmunizados se disgregaron siguiendo el protocolo descrito en el **apartado 3.1.**

3.2.2 Inmunización por vía sistémica

- Para la inmunización intraperitoneal empleando Np como adyuvante se emplearon 2 esquemas de trabajo:

- Un esquema de tres dosis administradas semanalmente, con un volumen final de formulación de 200 μ L con 100 μ g de OVA, donde los animales fueron sacrificados una semana después de la última inmunización.
- Un esquema de dos dosis separadas por 21 días con un volumen final de formulación de 500 μ L con 40 μ g de γ RBD, donde los animales fueron sacrificados luego de dos semanas después de la última inmunización.

En ambos modelos se tomaron muestras de suero antes de cada inmunización. Y al punto final se tomaron muestra de suero, lavado broncoalveolar para la determinación de la respuesta humoral, y se realizaron cultivos de esplenocitos para la determinación de la respuesta celular.

Obtención de suero y lavado broncoalveolar (BAL): Por punción intracardiaca se obtuvo la sangre entera, se centrifugó a 1500xg por 10 minutos y se separó el suero. Para el lavado broncoalveolar, se expuso la tráquea y a través de la misma se realizaron tres lavados perfundiendo los pulmones con 1 mL de PBS. Ambas muestras se conservaron a -20°C hasta su uso.

Determinación de IgG, IgG1, IgG2a e IgA específicos en suero y BAL mediante ELISA indirecto: Placas de microelisa de poliestireno (NUNC, Maxisorp, Denmark) fueron sensibilizadas con 1 μ g/100 μ L de antígeno en buffer carbonato, pH 9.6 durante toda la

noche a 4°C. Las placas sensibilizadas se bloquearon con 5% de suero equino normal en PBS durante 1 hora a 37°C y luego se incubaron los sueros (dil 1/100 o título) o BAL (dil 1/2 o título) durante 1 hora a 37°C. La unión antígeno-inmunoglobulina se detectó con anticuerpos específicos correspondiente, IgG, isotipo-específicos (IgG1 e IgG2a) e IgA. Como sustrato de revelado se utilizó TMB y se detuvo la reacción con 2M de H₂SO₄ y la DO se midió a 450 nm utilizando un espectrofotómetro (Variouskan Lux).

Cultivo primario de células de bazo para ensayo de respuesta celular: Se evaluó la inducción de linfocitos T específicos durante la inmunización mediante el dosaje de citoquinas a partir de células aisladas de animales provenientes de los distintos lotes. Para ellos, los bazos de los ratones inmunizados fueron disgregados mecánicamente. Se plaquearon 4x10⁶ células/mL en medio RPMI completo (RPMI base, 10% SFB, 100 U/mL penicilina, 100 U/mL estreptomina) en placas de 48 pocillos y se estimularon con 10-100 µg/mL de antígeno durante 48 o 72 horas dependiendo el antígeno. Se midió mediante ELISA comercial IFN-γ (R&D Systems), IL-5 e IL-13 (Invitrogen) en los sobrenadantes de cultivo, según las especificaciones del fabricante.

Prueba de hipersensibilidad retardada (DTH): Para evaluar la inmunidad celular *in vivo* se realizó la prueba DTH. Veintiún días después de la última inmunización, se le administro por vía subcutánea 20 µg de antígeno en 20 µL de PBS en una de la almohadilla plantar trasera. Como control negativo, se inyectó solución salina de manera similar en la almohadilla plantar contralateral. A las 48 horas se evaluó el proceso inflamatorio a través de la medida del espesor de las patas. La medida se realizó utilizando un calibre digital con una precisión de 0,01mm.

3.2.3 Modelo de protección contra SARS-CoV-2 e histopatología: El siguiente modelo se llevó a cabo en las instalaciones de La Administración Nacional de Laboratorios e Institutos de Salud “Dr. Carlos Malbrán” (ANLIS MALBRAN) en conjunto con el área de virología. Ratones K18-hACE2 Balb/c hembras y machos fueron inmunizados con dos dosis separados por 21 días con los candidatos vacunales Np-yRBD y Alum+yRBD y se utilizaron como controles ratones inmunizados solo con yRBD y Np. El día 35 se infectaron con la cepa Whuan de SARS-CoV-2 a razón de 10⁵ TCID (*Tissue Culture Infectious Dose*) y el día 39 post segunda dosis se procede al sacrificio y

a la toma de muestras para la determinación de carga viral por RT-PCR y para estudios histopatológicos.

El estudio histopatológico se realizó en el Instituto de Ciencias Veterinarias del Litoral del Centro de Medicina Comparada perteneciente a la Universidad Nacional del Litoral, siguiendo los siguientes criterios^{78,79} (<https://ntp.niehs.nih.gov/nnl/index.htm>):

Hígado	
VC	Vacuolización citoplasmática
HEM	Hematopoyesis extramedular
Co	Congestión
E	Esteatosis
I	Inflamación
Pulmón	
HN2	Hiperplasia de neumocitos tipo 2
HEB	Hiperplasia de epitelio bronquiolar
Co	Congestión
H	Hemorragia
I	Inflamación
Encéfalo	
VB	Vacuolización de la sustancia blanca
DkN	Dark neurons

S	Severidad	Score
1	Leve	1
2	Moderado	2
3	Severo/abundante	3/4
SLA	Sin Lesiones Aparentes	0

D	Distribución	Score
F	Focal	1
FE	Focal extenso	2
MF	Multifocal	3
D	Difuso	4

Para la asignación del score se evaluó en forma semi-cuantitativa por microscopía la severidad y distribución de los siguientes parámetros:

Pulmón

Inflamación: Las etiologías más frecuentemente asociadas a procesos de neumonía intersticial son virus, tóxicos, alérgenos y sepsis. En los estudios NTP (*National Toxicology Program*), hay cinco categorías estándar de inflamación: aguda, supurativa, crónica, crónica activa y granulomatosa. Un agente o sustancia de prueba puede estimular las células epiteliales y los macrófagos residentes para secretar citoquinas, induciendo así una respuesta inflamatoria. Alternativamente, un agente o sustancia de prueba puede causar daño tisular, lo que secundariamente resulta en inflamación.

Hiperplasia de neumocitos tipo 2: La presencia de hiperplasia de neumocitos tipo II podría asociarse a etiologías como virus, tóxicos, alérgenos y sepsis. La hiperplasia de neumocitos tipo II puede ser primaria o secundaria a lesión o inflamación de neumocitos de tipo I. Los neumocitos tipo I son especialmente vulnerables a las

lesiones oxidantes, y la proliferación de los neumocitos tipo II a menudo se observa después de la lesión y la pérdida de células tipo I.

Hiperplasia de los epitelios bronquiolares: La hiperplasia alveolar-bronquiolar puede ser secundaria a procesos inflamatorios o como una lesión pre-neoplásica. En general es un proceso benigno, reversible.

Encéfalo

Inflamación (I): En los estudios de NTP, hay cinco categorías estándar de inflamación: aguda, supurativa, crónica, crónica activa y granulomatosa. Las inflamaciones de tipo linfoplasmocitarias podrían ser sugerentes de procesos de base viral, aunque no podrían descartarse otros procesos crónicos que afecten al sistema nervioso central.

Vacuolización de la sustancia blanca (VB): la presencia de vacuolas es un artefacto común relacionado al proceso de autólisis. Suele ser más prominente en la sustancia blanca y puede aparecer como resultado del procesamiento (ej. contacto prolongado con etanol 70%)

Dark neuron (DkN): La basofilia y la contracción neuronal son artefactos comunes en cerebros no perfundidos.

Hígado

Vacuolización citoplasmática (VC): La presencia de vacuolas citoplasmáticas puede asociarse a cambios en la cantidad de glucógeno en los hepatocitos o degeneración hidrópica. Los cambios en la cantidad de glucógeno hepatocelular suelen ir acompañados de otras alteraciones citoplasmáticas, como el cambio graso o la vacuolización citoplasmática. En ausencia de tratamiento los cambios en el contenido de glucógeno se consideran "background". Debido a que los roedores generalmente se alimentan de noche, el grado de acumulación de glucógeno dentro de los hepatocitos es típicamente más alto en las primeras horas de la mañana y disminuye durante todo el día.

Hematopoyesis extramedular (HEM): La hematopoyesis extramedular es inesperada en roedores adultos y generalmente se asocia con afecciones patológicas. Se distingue de los infiltrados de células inflamatorias por la presencia de eritrocitos nucleados,

granulocitos inmaduros y / o células progenitoras indiferenciadas en ausencia de necrosis hepatocelular asociada.

Congestión (Co): Podría asociarse al método eutanásico, sin significación patológica,

3.3 Modelo de alergia alimentaria a la proteína de la leche

El siguiente modelo se encuentra ampliamente caracterizado y descrito por el grupo de trabajo⁸⁰⁻⁸⁴. Ratones Balb/c de 5 a 7 semanas libres de patógenos fueron provistos por la Facultad de Veterinaria de la Universidad Nacional de La Plata. Los animales se alojaron en el bioterio propio del instituto y se manipularon siguiendo las pautas internacionales de experimentación con animales. El protocolo de trabajo fue aprobado por el Comité Institucional para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio (CICUAL) de la Facultad de Ciencias Exactas (Universidad Nacional de La Plata).

El extracto de proteína de leche (PLV) fue preparado a partir de leche en polvo (Svelty, Nestle). Se disolvió PLV en buffer carbonato para la administración oral. La toxina colérica (TC) (Sigma Aldrich, St. Louis, USA), empleado como adyuvante mucosal, se disolvió en buffer carbonato.

La sensibilización se realizó según Smaldini et al 2012⁸⁰. Brevemente, los ratones (n=5/grupo) recibieron una vez por semana durante seis semanas 10 µg de TC y 20 mg de PLV en 200 µL de buffer bicarbonato por vía intragástrica. Los ratones fueron ayunados 2 horas antes de la sensibilización y 30 minutos se les administró por vía intragástrica una solución de bicarbonato de sodio para reducir la acidez estomacal. Luego, los animales se desafiaron por vía oral con PLV (10mg/200µL) en dos días consecutivos. Con el fin de modular la alergia los ratones sensibilizados fueron agrupados en cuatro lotes, los cuales recibieron por sonda intragástrica 10 µg β-lactoglobulina (Sigma) en PBS (Sens/PLV), 10 µg de β-lactoglobulina encapsulado en la Np (Sens/Np-βlacto) y solo PBS (Sens/PBS).

3.3.1 Desafío oral y evaluación de signos clínicos

Una vez concluido el plan de inmunización los animales fueron desafiados con PLV con el fin de analizar los signos clínicos locales y sistémicos inducidos como consecuencia de la sensibilización previa. Para esto se les administró únicamente el

antígeno por vía intragástrica. Los síntomas clínicos indicadores de la inducción de reacciones mediadas por IgE aparecen entre los 15 y 30 minutos posteriores a la exposición al antígeno y alcanza un pico aproximadamente 45min después de la aparición del primer síntoma. Los animales fueron observados durante la hora y media siguiente al desafío oral por más de un observador. Para la evaluación de los signos clínicos, se definió una escala cuantitativa de "índice" de síntomas, asignándole de manera arbitraria un puntaje a cada signo clínico inducido en función de la intensidad de los mismos (Tabla 3). Luego de asignados los índices clínicos se considera el valor más alto alcanzado por cada animal.

Tabla 3: Signos clínicos en animales alérgicos a PLV

Puntaje	Signos clínicos observados
0	Sin síntomas
1	Rascado de nariz y cabeza y enrojecimiento alrededor de nariz y cabeza
2	Hinchazón alrededor de ojos y boca, pelo erizado, baja actividad general y/o baja actividad con aumento de frecuencia respiratoria
3	Respiración dificultosa, cianosis alrededor de la boca y cola
4	Inactividad, convulsiones
5	Muerte

3.3.2 Prueba cutánea

Brevemente, esta prueba evalúa la presencia de IgE específica unida a los receptores de alta afinidad en la superficie de los mastocitos de la piel, para lo cual se inocula 20 µg de antígeno en 20 µL de solución salina por vía subcutánea (SC), en una almohadilla plantas y solución salina en la pata contraria como control negativo. Luego a los animales se le inyecta 100 µL de azul de Evans 0.1% en forma intravenosa (iv). Si el animal sensibilizado tiene anticuerpos IgE específicos en las células, la presencia del antígeno específico induce la activación celular con la consiguiente liberación de mediadores pro-inflamatorios pre-formados en los gránulos citoplasmáticos. La zona inflamada se evidencia experimentalmente mediante la extravasación del azul de Evans al tejido circundante (coloración azul de la piel). Este resultado es indicador de un proceso mediado por IgE solo si la extravasación del colorante se produce a los

minutos de inoculado el antígeno por vía SC. Dicha extravasación produce una hinchazón local de las almohadillas plantares, la cual puede ser medida con un calibre.

3.3.3 Detección por ELISA de IgG1 e IgG2a específico en suero

Placas MaxiSorp (NUNC, Denmark) fueron sensibilizadas con $1\mu\text{g}/100\mu\text{L}$ de PLV en buffer carbonato, pH 9.6 durante toda la noche a 4°C . Las placas sensibilizadas se bloquearon con 5% de suero equino normal en PBS durante 1 hora a 37°C y luego se incubaron las muestras en una dilución 2/200 durante 1 hora a 37°C . La unión antígeno-inmunoglobulina se detectó con anticuerpos anti-mouse isotipo específico (1/1000 y 1/3000 1h a 37°C). Como sustrato se utilizó TMB para generar la reacción colorimétrica y se frenó la reacción con 2M de H_2SO_4 y la DO se midió a 450 nm.

3.3.4 Detección de IgE específica en suero

Se utilizó la técnica de EAST para la evaluación de anticuerpos IgE específicos en suero. Brevemente, los discos de papel de celulosa activados con bromuro de cianógeno se sensibilizaron con PLV a una concentración de 1.75 mg/mL en buffer carbonato, pH=9.6 durante toda la noche a 4°C y bloqueados con etanolamina 0.05 M durante 2 horas a temperatura ambiente. Finalmente, los papeles sensibilizados y bloqueados se colocaron en sus respectivos tubos y se incubaron toda la noche a 4°C con $50\mu\text{L}$ de suero. Para revelar se utilizó un anti-IgE de ratón biotinilado (BD Pharmagen) dilución 1:1000 durante 5 horas a 4°C seguido de streptavidina conjugada a la fosfatasa alcalina (Sigma) durante 30 minutos a 37°C . La actividad enzimática se reveló p-nitrofenol fosfato y se paró con 0.1 M EDTA. Se mide la densidad óptica a 405 nm.

3.3.7 Cultivo de esplenocitos para el ensayo de respuesta celular

Se midió la producción y liberación de citoquinas en células aisladas de bazo de los distintos grupos de animales. Para ello, en placa de 48 pocillos se plaquearon 4×10^6 células/mL en medio RPMI completo (RPMI base, 10% SFB, 100U/mL penicilina, 100U/mL estreptomycin) y se estimularon con $350\mu\text{g}/\text{mL}$ de PLV durante 72hs. Se midió mediante ELISA comercial IFN-g (R&D Systems), IL-5 e IL-13 (Invitrogen) en los sobrenadantes de cultivo, según las especificaciones del fabricante.

Evaluación de linfocitos T y células dendríticas de lámina propia: Las poblaciones celulares se obtuvieron por disgregación de la muestra de intestino delgado de los diferentes grupos siguiendo el protocolo descrito en el **apartado 3.1**

Análisis estadístico

Todos los experimentos se repitieron al menos dos veces con resultados comparables. Las citometrías de flujo se analizaron utilizando FlowJo X, las imágenes obtenidas por microscopía se analizaron usando ImageJ. Los gráficos y el análisis de datos fueron realizados utilizando GraphPad Prism8. Los análisis estadísticos fueron realizados mediante ANOVA de una o dos vías, seguidas del test de Bonferroni para discriminar las diferencias significativas entre las medidas de los diferentes grupos experimentales o mediante t-Student según corresponda. Todos los datos cuantitativos se expresan como media \pm SEM. A $P < 0,05$ ($p \leq 0,05$) se consideró estadísticamente significativo.

CAPÍTULO 1

Caracterización fisicoquímica y biológica de nanopartículas poliméricas

Introducción

En este capítulo se caracterizarán nanopartículas poliméricas para su potencial empleo en biomedicina, para la formulación de candidatos vacunas profilácticos y terapéuticos.

Los polímeros de poliaminas se utilizan para el ensamblado y síntesis de nanopartículas, siendo el hidrocloreto de polialilamina el más utilizado^{85,86}. La PAH se emplea en la formulación de drogas que son administrada por la vía oral como el Renogel y Renvela de Sanofi⁸⁷, en ligandos de cromatografía de intercambio aniónico para el posterior procesamiento de productos biofarmacéuticos⁸⁸, en reactivos para diagnóstico⁸⁹ y en formulaciones de bactericidas como desinfectantes y antisépticos. Los entrecruzadores o crosslinkers a base de fosfato como el anión pentavalente tripolifosfato (Tpp) y el ion fosfato (Pi) se ensamblan con el polímero PAH formando nanopartículas esféricas⁹⁰⁻⁹². Estos entrecruzadores son los responsables de las características de las nanopartículas dependiendo de la relación molar polímero/entrecruzador: tamaño, forma, estabilidad y carga neta. Estos dos entrecruzadores tienen múltiples aplicaciones en la industria como aditivos alimentarios o como crosslinker con drogas u otros polímeros⁹³ dado que han sido aprobados por la agencia del Gobierno de los Estados Unidos responsable de la regulación de alimentos y medicamentos (FDA, *Food and Drugs Administration*) y reconocidos como seguros (GRAS, *generally regarded as safe*). Si bien ambos compuestos han sido ampliamente caracterizados y utilizados en la industria, poco se ha descrito acerca del uso del polímero PAH para la formulación de nanopartículas^{85,93,94} y aún menos en su caracterización biológica y su aplicación.

El uso de nanopartículas en la formulación de vacunas presenta varias ventajas teóricas que incluye una mayor captación por células presentadoras de antígenos (células dendríticas o macrófagos). La posibilidad además que puedan activar células de la inmunidad innata y diferenciarlas a células con capacidades migratorias que transporten al inmunógeno a ganglio linfático con la activación de la inmunidad

adaptativa con células B y T efectoras las convierte en potenciales candidatos para una vacuna ^{59,95}. Las nanopartículas de origen orgánico e inorgánico como los cristales de ácido úrico, cristales de colesterol, cristales de sílice, cristales de pirofosfato de calcio (pseudogota), asbestos y las sales de aluminio son capaces de activar la inmunidad innata a través de la activación del complejo multiproteico llamado inflamosoma, ya que promueven el daño lisosomal con la liberación de catepsina B al citosol ^{60,96,97}. Este proceso ocurre principalmente en CPA como las mencionadas, las cuales son las encargadas de censar el entorno e internalizar por medio de la fagocitosis y endocitosis antígenos o células infectadas.

La respuesta inmune innata se inicia por lo tanto con el reconocimiento de ciertos patrones moleculares conservados derivados de microorganismos (MAMPs y PAMPs) y de señales derivadas de daño tisular por parte del hospedador (DAMPs). Como mencionamos anteriormente, la inducción de procesos inflamatorios por señales no patogénicas por parte de las nanopartículas las convierten en los nuevos NAMPs ^{61,98}. Tanto los PAMPs, como los DAMPs y los NAMPs interactúan con receptores de reconocimientos de patrones ubicados en el exterior y/o en el interior de la célula ⁹⁹ lo que genera la inducción de programas pro-inflamatorios que activan a las células innatas ¹⁰⁰. La producción de citoquinas y quimoquinas, y la expresión en la superficie celular de CD80, CD86 y MHCII, transforman a estas células en CPA profesionales que tienen una capacidad incrementada de activar linfocitos T, si las mismas se dirigen a los sitios que corresponden ¹⁰¹.

Mientras que la mayoría de las quimoquinas y citoquinas dependientes de receptores TLRs se secretan a través de la vía convencional de secreción de proteínas, que incluye el tráfico vesicular intracelular, las citoquinas de la familia de IL-1 no tienen una señal de secreción N-terminal y se producen como citoquinas inmaduras (pro-citoquinas). Sólo se liberan luego de que la célula experimenta una segunda señal ¹⁰²⁻¹⁰⁴. Existen varias familias de PRRs que inducen esta segunda señal que permite la liberación de las citoquinas maduras de la familia de IL-1: las proteínas que contienen repeticiones ricas en leucinas que se unen a nucleótidos (NLRs), los receptores similares a AIM2 (ALRs) y la proteína pirina ¹⁰⁵. En particular los NLR son los responsables de la detección de NAMPs en los compartimentos citosólicos, siendo el

NLRP3 el más caracterizado y se expresa principalmente en células de linaje mieloide como granulocitos, monocitos, macrófagos y células dendríticas.

Las catepsinas (CTSB) son cisteín proteasas que se encuentran principalmente en los lisosomas y desempeñan funciones cruciales en varios procesos fisiológicos, como el procesamiento de proteínas, la inflamación, la apoptosis y la transformación de la matriz extracelular. Dicha enzima es funcional y mantiene su actividad proteolítica a pH citoplasmático luego de ser liberada por el proceso conocido como permeabilización de la membrana lisosomal^{96,97,106}. Dichas enzimas, principalmente catepsinas B, son capaces de desencadenar la activación del inflamosoma NLRP3^{99,107-110}. Los PRR luego de la detección de NAMPs citosólicos inducen la formación del complejo multiproteico, que incluye sensores, proteínas adaptadoras y enzimas caspasas. Tras la activación de los sensores del inflamosoma, la proteína adaptadora ASC (*apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD*) se ensambla en grandes fibras helicoidales que interactúan entre sí y sirven como una plataforma de señalización supramolecular denominada “speck”¹¹¹. El reclutamiento de pro-caspasa-1 a ASC promueve la activación autocatalítica de caspasa-1. Estos specks pueden observarse cuando alcanzan un tamaño de alrededor de 1 μm y en la mayoría de las células solo se forma un speck tras la activación del inflamosoma. La formación de specks de ASC se utiliza frecuentemente como lectura de activación del inflamosoma¹¹². La activación de caspasa-1 promueve la activación de las pro-formas de IL-1 β e IL-18, como así también la proteína citosólica formadora de poros llamada gasdermina-D (GSDMD)^{67,113}. Tras la escisión del extremo N-terminal de GSDMD, estos fragmentos oligomerizan en forma de anillo y se insertan en la membrana plasmática formando un poro^{114,115}. GSDMD permeabiliza la membrana celular y debido al desequilibrio iónico y la consecuente lisis osmótica puede desencadenar una forma de muerte celular programada inflamatoria llamada piroptosis^{116,117}, la cual se puede evidenciar con la secreción de la enzima lactato deshidrogenasa (LDH) hacia el medio extracelular¹¹⁸. La formación del poro de GSDMD en la membrana plasmática posibilita la secreción de manera rápida de IL-1 β e IL-18.

El mecanismo de activación de la inmunidad innata del adyuvante Alum (sales de aluminio), ampliamente empleado en vacunas para humanos, es precisamente mediante la activación del inflamosoma NLRP3^{60,119}.

En este contexto y con el objetivo de caracterizar la acción de estas nanopartículas estudiamos la estabilidad y el mecanismo por el cual son capaces de activar la inmunidad innata.

Objetivo

Caracterización *in vitro* de las nanopartículas poliméricas a base de PAH y entrecruzadores Tpp y Pi. Caracterización fisicoquímica y biológica, interacción y activación celular.

Resultados

1- Síntesis y caracterización fisicoquímica

Aquí presentaremos los resultados que describen las propiedades y características fisicoquímicas y biológicas que presentan las nanopartículas sintetizadas con PAH como polímero y utilizando los entrecruzadores a base de fosfato: Tpp y Pi.

Una de las ventajas más notables que presentan las nanopartículas poliméricas con PAH es la sencillez de su síntesis, reproducibilidad y facilidad de escalado. Se sintetizan mezclando el polímero PAH y cualquiera de los entrecruzadores tripolifosfato TPP o el ión fosfato Pi en agitación constante durante 30 minutos a temperatura ambiente (Fig. 9). La solución final se puede evidenciar de manera macroscópica a través de un cambio de color en la suspensión de transparente a blanco translúcido.

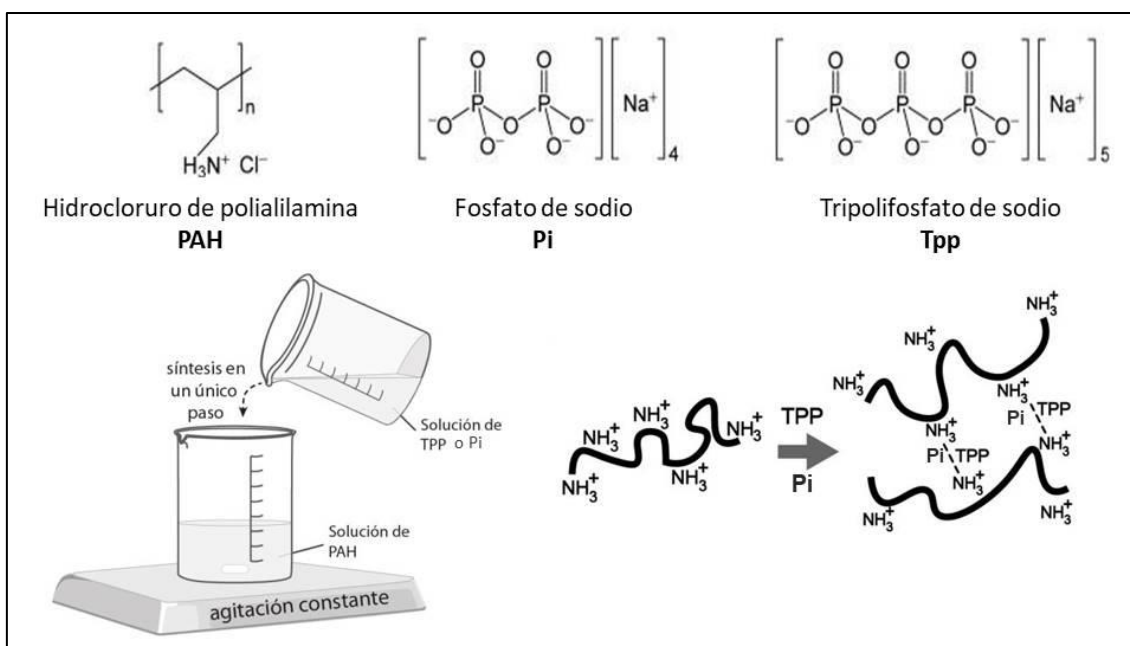


Figura 9: Componentes utilizados para la síntesis de las nanopartículas.

Además, empleando PAH conjugado a isotiocianato de fluoresceína (FITC), obtuvimos nanopartículas fluorescentes.

1.1 Nanopartícula PAH/Tpp

Al poner en contacto el polímero de polialilamina PAH con Tpp a un pH entre 7 y 9, la PAH ($pK_{a_{1-2}}^{PAH}=8.5$) se protona casi por completo. A su vez, en contacto con PAH, el TPP ($pK_{a_4}^{TPP}=5,7$ y $pK_{a_5}^{TPP}=8.5$) se desprotona casi por completo. Por lo tanto, la PAH va a tener 1 carga positiva por mol de monómero y el Tpp va a tener 5 cargas negativas por mol de anión, a una relación molar de 0.2 ($R=[Tpp]/[PAH]=0.2$) la carga neta de la nanopartícula o la carga superficial de la nanopartícula (relacionada con el potencial zeta) será 0. Bajo estas condiciones experimentales de síntesis las nanopartículas se agregan rápidamente. Por otro lado, cuando la relación molar es mucho menor que 0.2 ($R \ll 0.2$), existirá un exceso de cargas positivas en el medio, que se explica por el defecto de Tpp para formar pares iónicos con los grupos $-NH_3^+$ del polímero. Experimentalmente determinamos que cuando la síntesis se realiza con un $R < 0,15$ una porción del polímero de partida queda libre en solución sin ser entrecruzada (Fig. 10). Por ejemplo, para una relación molar de $R=0,12$, un 50% PAH queda en estado libre sin formar parte de las nanopartículas.

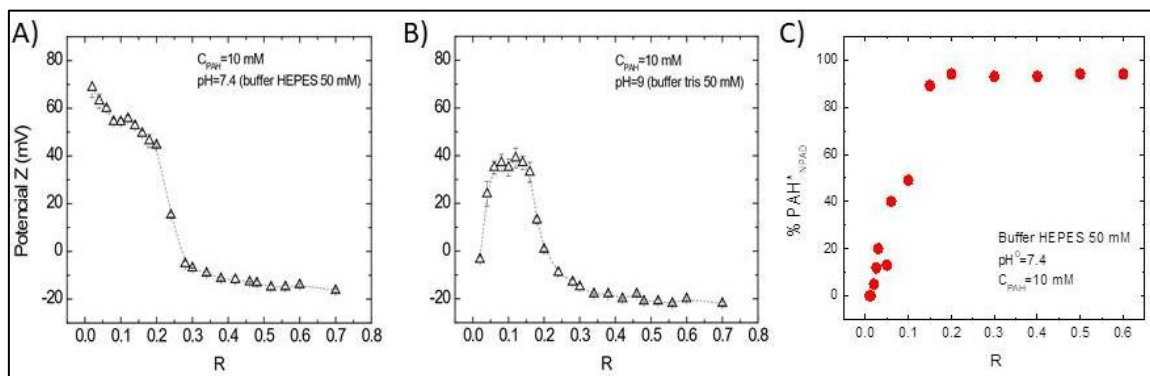


Figura 10: Relación entre el potencial zeta y R para nanopartículas PAH/Tpp. Nanopartículas obtenidas a pH constante 7.4 (A) y a pH=9 (B). C) Porcentaje de PAH del total inicial que forma la nanopartícula en función de $R= [TPP]/[PAH]$.

En la Figura 10C se puede observar que a la relación molar de $R=0.6$ se encontró una solución de nanopartículas con valores cercanos al 100% de PAH formando parte de las nanopartículas y además presentaron una carga neta negativa en la superficie, con valores entre -10 y -20 mV (Fig. 10A).

Al caracterizar el tamaño de las nanopartículas luego de su síntesis con un $R=0.6$ y $\text{pH}=8.5$ (Fig. 11A) observamos que presentan un diámetro hidrodinámico de aproximadamente 200 nm y que se mantuvo estable al menos por 9 meses (Fig. 11B).

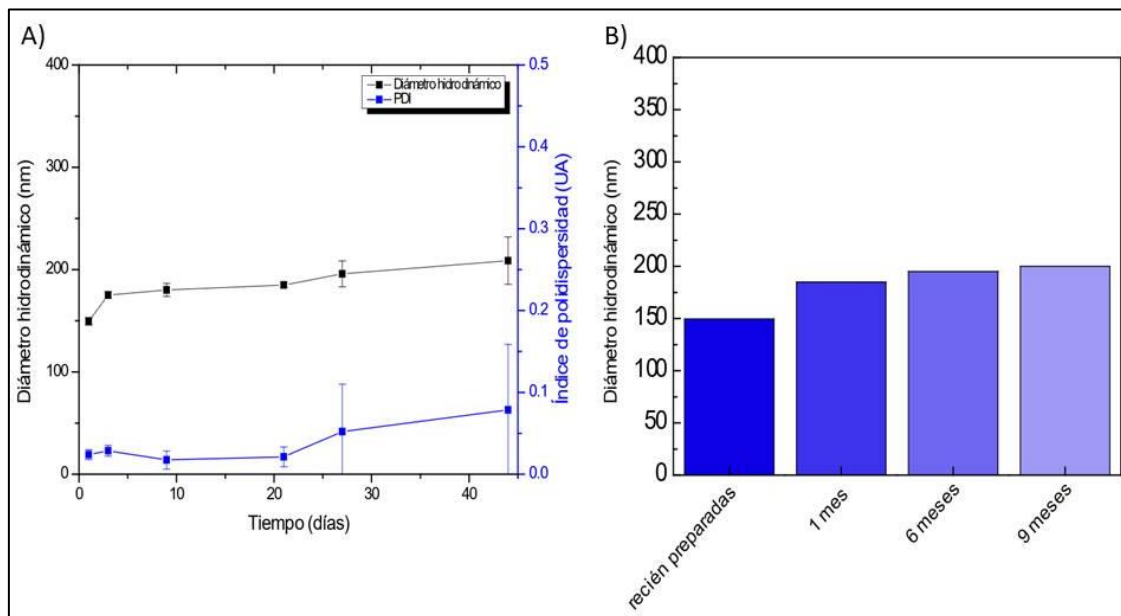


Figura 11: Diámetro hidrodinámico de las nanopartículas sintetizadas con $R=0.6$. A) Monitoreo del diámetro durante 45 días y B) 9 meses. PAH/TPP con $R=0.6$. $[\text{PAH}]=5 \text{ mM}$, pH de preparación 8.5.

Por lo tanto, bajo las condiciones de síntesis descriptas se obtuvieron partículas de PAH/Tpp cargadas negativamente en su superficie, de alta estabilidad y de un tamaño de 200 nm.

1.2 Nanopartícula PAH/Pi

El ion fosfato Pi también fue utilizado como entrecruzador en la síntesis, pero a diferencia del tripolifosfato puede tener una, dos o tres cargas negativas dependiendo del pH. En una solución con pH cercano a 7, el ion fosfato puede tener entre una y dos cargas negativas. Cuando se pone en contacto PAH con Pi el entrecruzador tiende a desprotonarse y a adquirir un total de dos cargas negativas. Por lo tanto, la relación a la cual se anulan las cargas y el sistema precipita es de $R=[\text{Pi}]/[\text{PAH}]=0.5$. Con $R<0.5$ se forman nanopartículas con potencial zeta positivo y tamaños de partícula de alrededor de 100 nm pero quedarán en solución polímeros de PAH libre. En la Figura 12 se observa que en estas condiciones de síntesis el diámetro hidrodinámico de las

nanopartículas no se mantiene estable en el tiempo y solo se alcanzó a realizar mediciones a tiempos cortos. Además, se estima que para un $R=0.3$ habrá alrededor de 50% de PAH libre.

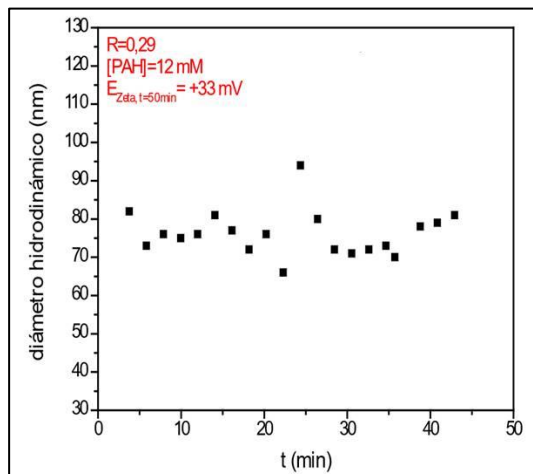


Figura 12: Monitoreo del diámetro hidrodinámico a tiempos cortos de la nanopartícula PAH/Pi con una relación de $R=0.29$.

Sin embargo, al incrementar el R ($R \gg 0.5$) y tener un exceso de iones fosfato, se obtuvieron partículas de mayor tamaño, con carga levemente negativa y con tamaños que aumentan rápidamente alcanzando valores por encima de los 600 nm (Fig. 13). En estas condiciones las nanopartículas se desestabilizaron, se agregaron y precipitaron en poco tiempo. Por esta razón se descartó el empleo de nanopartículas sintetizadas en estas condiciones con PAH/Pi.

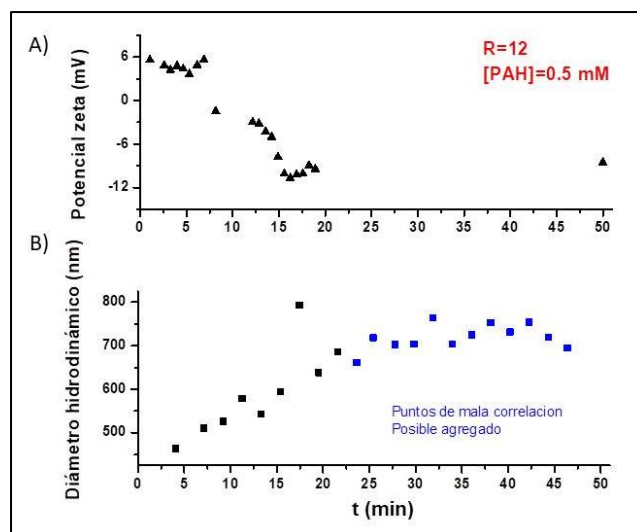


Figura 13: Monitoreo del potencial zeta (A) y diámetro hidrodinámico (B) de las nanopartículas a tiempos cortos post-síntesis. Nanopartícula PAH/Pi con un $R \gg 0.5$.

Inclusive cambiando el R se obtuvieron dos nanopartículas de distinto tamaño: PAH/Pi 80 nm ($R=0.29$) y PAH/Pi 200 nm ($R=0.35$). Sin embargo, ambas nanopartículas presentaron menor estabilidad en el tiempo, con respecto a PAH/Tpp.

Por lo tanto, entre ambos tipos de nanopartículas optamos continuar con las de PAH/Tpp dado que brindaron propiedades fisicoquímicas más robustas. En la Figura 14 se muestra una foto de las mismas obtenidas mediante el uso de microscopía electrónica de transmisión (TEM) (Fig. 14A); además se caracterizó su tamaño mediante la cuantificación del radio hidrodinámico aplicando la técnica de DLS a distintas temperaturas en agua y medio de cultivo (Fig. 14B).

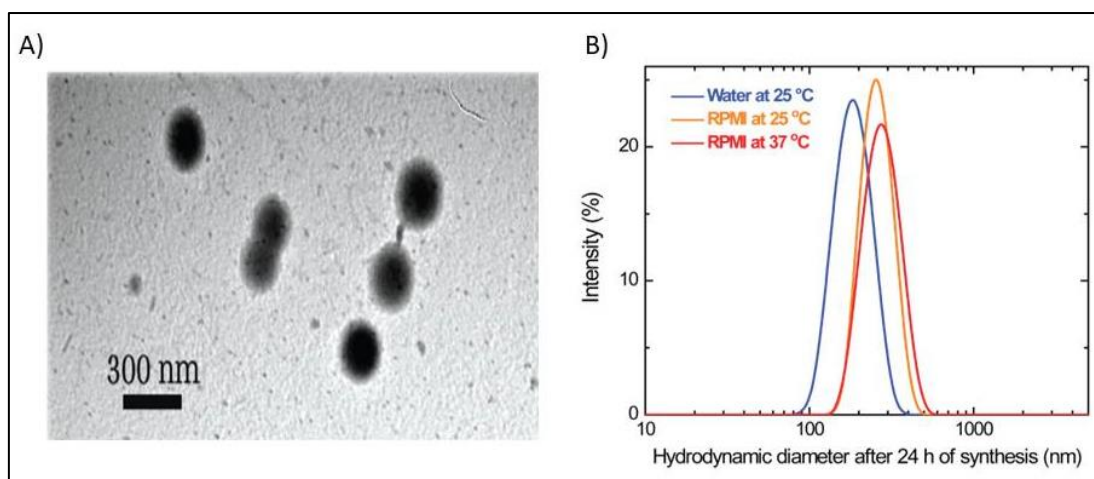


Figura 14: Mediciones complementarias a las nanopartículas PAH/Tpp de $R=0.6$ de 200 nm. A) Microscopía electrónica de transmisión (TEM) y B) medida del radio hidrodinámico por DLS en distintas condiciones.

De esta manera observamos que las nanopartículas PAH/Tpp tienen un mejor comportamiento fisicoquímico en cuanto a tamaño, carga y estabilidad hidrodinámica en el tiempo con respecto a PAH/Pi. Además, las nanopartículas PAH/Tpp son fácilmente reproducibles dando soluciones de nanopartículas con tamaños homogéneos y pudiendo encapsular distintas proteínas dependiendo del punto isoeléctrico (pI) y de la concentración, como se demostrará en los capítulos siguientes.

2- Caracterización biológica *in vitro* de las nanopartículas

2.1 Cambios en la morfología celular

Para estudiar las propiedades biológicas que podrían tener estas nanopartículas, se emplearon distintas líneas celulares humanas y murinas. Principalmente se estudió el efecto sobre células presentadoras de antígenos: línea monocítica tumoral humana (THP-1), líneas macrofágicas murinas (Raw 264.7 y J774) y las células dendríticas (JAWS II). Además, se obtuvieron células dendríticas y macrófagos derivados de médula ósea de ratón por cultivo empleando factores de crecimiento (BMDC y BMDM respectivamente). Por otro lado, y por tratarse de nanopartículas para emplearse en candidatos vacunales y administrarse por vías mucosales, se utilizaron las líneas de células epiteliales colónicas humanas (Caco-2 y HT-29) y la línea celular HEK-293 aislada de riñón embrionario. Para caracterizar el efecto biológico de las Np se evaluaron distintos parámetros celulares: viabilidad celular, morfología, activación celular y producción de citoquinas.

Al analizar las células THP-1 por citometría de flujo observamos que dependiendo del tipo de nanopartícula, las cuales varían su composición, tamaño y carga, se modificaban los parámetros morfológicos de las células (Fig. 15). Para concentraciones de 0.75, 1 y 1.25 mM de las nanopartículas que presentaban un menor tamaño, PAH/Pi 80 nm, estas produjeron los mayores cambios en la morfología celular. Las nanopartículas PAH/Pi de 200 nm, generaron una segunda población celular, donde una de ellas es comparable al control basal y la otra presentó un menor tamaño, este resultado varía conforme se aumenta la concentración de nanopartículas. Sin embargo, al analizar los parámetros morfológicos de las células expuestas a las nanopartículas PAH/Tpp de 200 nm, los cambios fueron mínimos, comparados con el control basal.

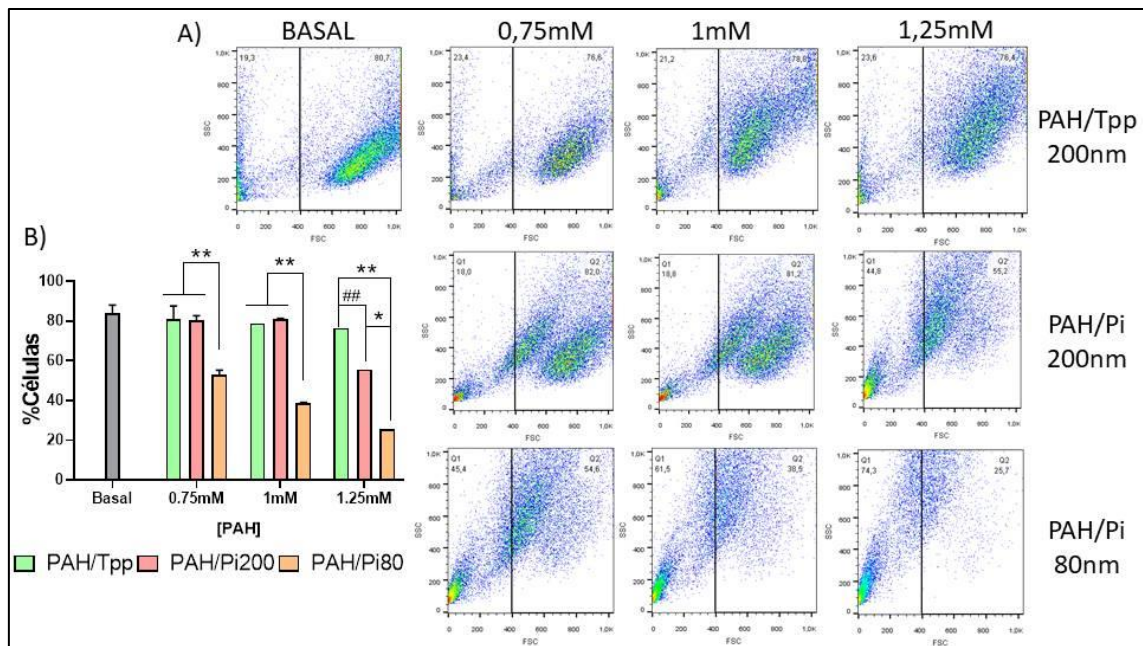


Figura 15: Cambios morfológicos de células THP-1 evaluado mediante citometría de flujo al incubarlas con diferentes nanopartículas. A) Dot-plot representativo donde se compara la condición basal, sin nanopartículas, con las diferentes nanopartículas a distintas concentraciones. B) Frecuencia de células, seleccionadas bajo los parámetros tomando el control basal como referencia. Las distintas condiciones experimentales se llevaron a cabo por duplicado, se graficó la media con su desviación estándar (ANOVA* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$, t-Student ## $P < 0.01$).

De las condiciones experimentales analizadas se eligió continuar trabajando con 0.75 mM de las distintas nanopartículas, ya que fue la concentración que generó un menor cambio morfológico.

2.2 Activación celular

Empleando nanopartículas con PAH-FITC en las condiciones anteriormente indicadas para la síntesis de nanopartículas PAH/Tpp-FITC y PAH/Pi-FITC, se enfrentaron las mismas con células macrofágicas RAW 264.7 durante 6 horas. Para ello se emplearon células sin activar y pre-activadas (1 hora) con 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de lipopolisacáridos (LPS) de *E. Coli*. Se evaluó la fluorescencia por citometría de flujo y microscopía confocal (Fig. 16). Nuestros hallazgos indican que las nanopartículas fluorescentes fueron internalizadas independientemente del estado de activación celular (Fig. 16A y B). Además, se observó una mayor fluorescencia y presencia de la nanopartícula PAH/Tpp-FITC en el interior celular comparada con PAH/Pi-FITC. Por otro

lado, los cambios morfológicos detectados en las células THP-1 (Fig. 15) se condicen con las variaciones morfológicas observadas en las células RAW 264.7 por microscopía confocal. Las células fluorescentes adquirieron morfología de células activadas con proyecciones citoplasmáticas ¹²⁰. Para cuantificar la activación celular, se evaluó la expresión de CD14 y CD11b por citometría de flujo. Se observó que tanto la presencia de LPS como de ambas nanopartículas-FITC inducen una mayor frecuencia de células CD14⁺CD11b⁺ (Fig. 16C), confirmando lo observado por citometría y microscopía confocal en ambas líneas celulares humanas y murinas.

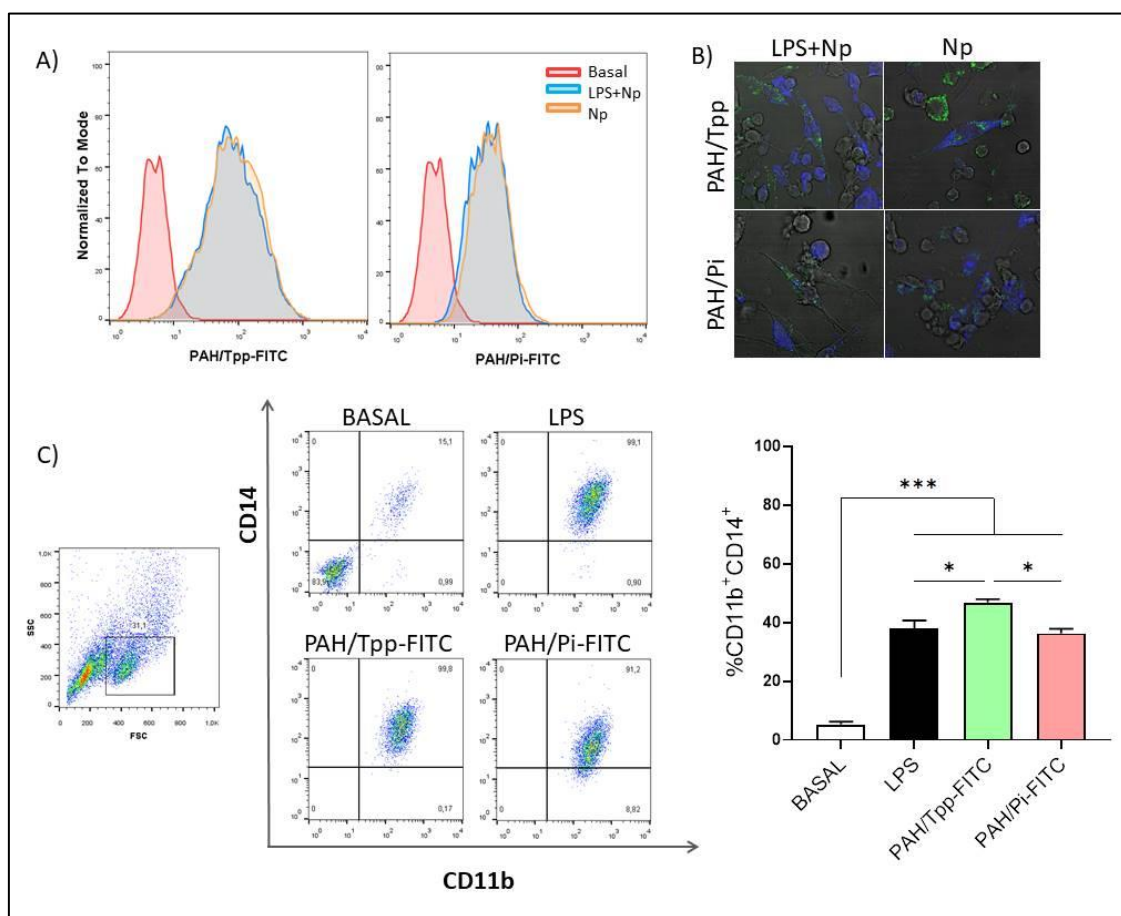


Figura 16: Interacción e internalización de nanopartículas-FITC en células macrofágicas RAW 264.7 luego de 6 horas de estímulo. A) Citometría de flujo, B) Microscopía confocal. C) Activación celular por citometría de flujo y cuantificación del porcentaje de la población CD11b⁺CD14⁺ en el total de células adquiridas. Las distintas condiciones experimentales se llevaron a cabo por duplicado. (ANOVA* $P < 0.05$; *** $P < 0.001$)

Finalmente, aplicamos las mismas metodologías para el análisis de células dendríticas derivadas de médula ósea de ratones.

Las BMDC fueron caracterizadas principalmente por citometría de flujo mediante marcadores superficiales de linaje CD11c y CD11b, marcadores de activación celular CD86 y MHC II, y CD103 como marcador de célula dendrítica que adquiere capacidad de migrar principalmente desde mucosa intestinal a ganglios linfáticos drenantes e interactuar con células T^{34,121,122}.

En la Figura 17 se muestran los resultados por citometría de flujo para BMDC en condiciones basales y expuestas a nanopartículas PAH/Pi 80 nm, PAH/Pi 200 nm y PAH/Tpp 200 nm en presencia o ausencia de LPS durante 24 horas a 37°C. Observamos que las distintas nanopartículas inducen un aumento en la expresión de CD86 y CD103, independientemente de la pre-activación o no con LPS (Fig. 17B). Sin embargo, las nanopartículas PAH/Tpp 200 nm inducen una mayor intensidad de fluorescencia media (MFI) para CD86 en comparación con las nanopartículas PAH/Pi, independientemente de su tamaño (Fig. 17B y C panel superior).

Con respecto a la marca de CD103 se puede observar que las nanopartículas PAH/Tpp indujeron una población más homogénea, con los picos de los histogramas mejor definidos y desplazados hacia la derecha, comparado con las células estimuladas con las nanopartículas PAH/Pi (Fig. 17 B y C panel inferior). A su vez, existe una leve diferencia entre la condición basal con nanopartícula y medio de cultivo, respecto a la condición con LPS y nanopartícula, favoreciendo a la primera condición. En el panel inferior de la Figura 17C no observamos diferencias en el porcentaje de células CD103⁺. Sin embargo, se puede observar que la intensidad de fluorescencia media para PAH/Pi 80 nm es mayor que para el resto de las nanopartículas, esto puede deberse a los cambios morfológicos que las células presentan luego del estímulo PAH/Pi 80 nm.

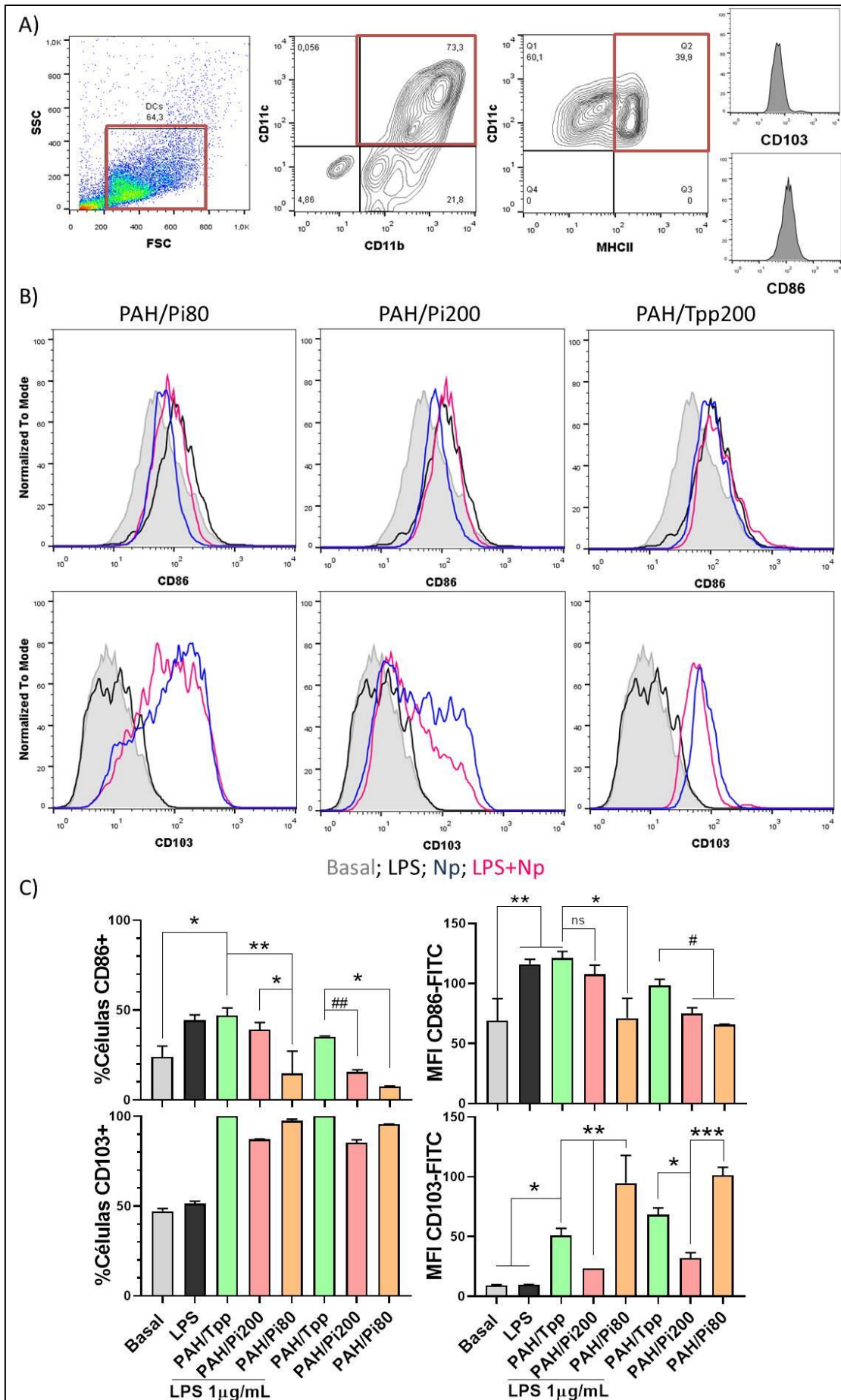


Figura 17: Caracterización de células dendríticas derivadas de médula ósea por citometría de flujo al estimularlas con las diferentes nanopartículas y LPS. A) Estrategia de gates en la citometría de flujo para la selección de células $CD11c^+CD11b^+MHCII^+CD103^+$ o $CD86^+$ realizado con la condición de PAH/Tpp 200. B) Histogramas correspondientes a las marcas de $CD86^+$ y para $CD103^+$. C) MFI y porcentaje de células positivas para $CD103$ o $CD86$. Las distintas condiciones experimentales se llevaron a cabo por duplicado, se grafica la media con su desviación estándar (ANOVA* $P<0.05$; ** $P<0.01$; *** $P<0.001$. t-Student # $P<0.05$; ## $P<0.01$).

Posteriormente, evaluamos la internalización de las nanopartículas por microscopía confocal en las BMDC incubadas con las distintas nanopartículas durante 24 horas a $37^{\circ}C$. Observamos que las células dendríticas, al igual que los macrófagos, son capaces de internalizar a las nanopartículas-FITC (Fig. 18A). Además, evaluamos la secreción de citoquinas por ELISA y hallamos que al incubar las BMDC con las nanopartículas PAH/Tpp 200 nm secretan IL- 1β en el sobrenadante de cultivo (Fig. 18B). Es importante resaltar que los componentes que conforman las nanopartículas (PAH, Tpp y Pi) no estimulan la producción de esta citoquina pro-inflamatoria, como se observó con el control positivo LPS+hidróxido de aluminio (LPS+Alum).

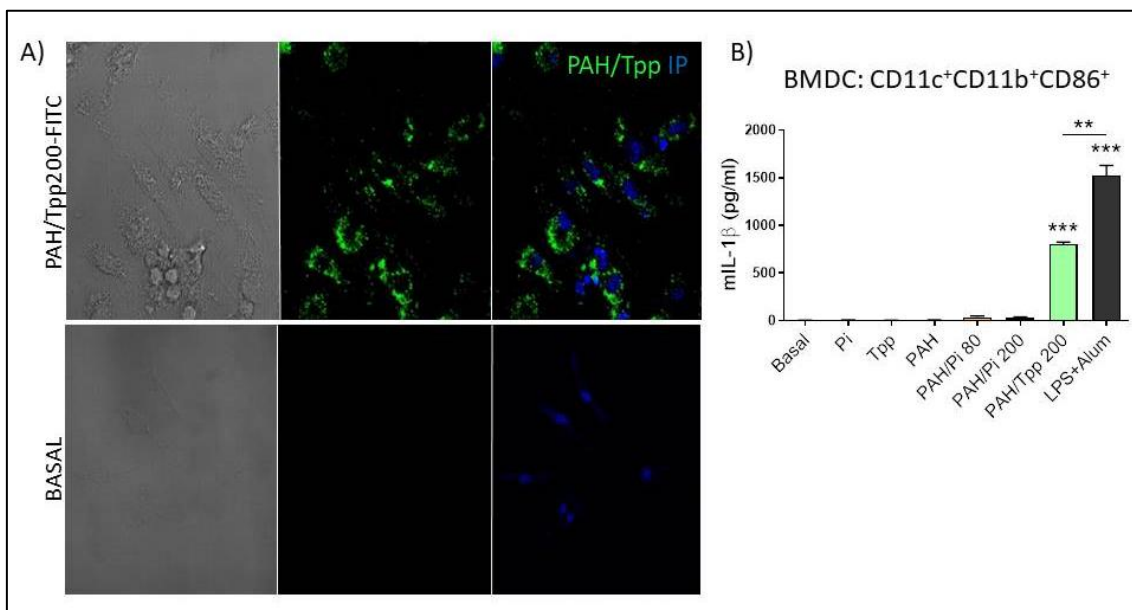


Figura 18: Análisis por microscopía confocal de la internalización de nanopartícula-FITC y producción de IL- 1β por BMDC. A) Microscopía confocal, B) Cuantificación de mIL- 1β por ELISA en sobrenadante de cultivo luego de 24 horas de estímulo. Se muestran resultados experimentales por duplicado y se grafica la media (ANOVA** $p<0.01$, *** $P<0.001$).

Hasta aquí hemos observado cómo las nanopartículas PAH/Tpp inducen una mayor activación celular con un aumento en la expresión de CD86 y CD103, secreción de IL-1 β , mientras que anteriormente demostramos que mantienen una estabilidad conformacional en el tiempo y son altamente reproducibles en su síntesis. Las nanopartículas que contienen Pi producen un mayor cambio morfológico probablemente asociado a la muerte celular ya que disminuye su tamaño y aumentan su granulosidad, sin promover activación celular y su estabilidad luego de su síntesis es limitada a un corto tiempo.

En base a los resultados de estos últimos análisis, y los datos fisicoquímicos antes mostrados, decidimos continuar trabajando únicamente con las nanopartículas PAH/Tpp de 200 nm en la caracterización biológica. Por lo tanto, a partir de ahora las **nanopartículas PAH/Tpp** de 200 nm serán nombradas como **Np** o **Np-FITC**.

2.3 Internalización celular

Luego de observar que las Np son capaces de ser internalizadas por células presentadoras de antígenos fagocíticas humanas y murinas, evaluamos cuál es el mecanismo por el cual las nanopartículas ingresan a las células. Para ello, se empleó la línea celular macrofágica J774 y macrófagos derivados de médula ósea de ratón (BMDM) que fueron incubados con Np-FITC y solo con PAH-FITC como control. Ambos tipos de células presentan características y comportamientos similares⁶⁷. Para analizar el mecanismo de ingreso a la célula se empleó un inhibidor de la fagocitosis citocalasina D (Cito D) que es un metabolito de origen fúngico capaz de unirse a filamentos de actina e impedir su polimerización y elongación. Por ello, este inhibidor afecta la morfología celular e inhibe procesos celulares como la división celular, la síntesis de proteínas y la fagocitosis. También se evaluó la internalización por endocitosis, inhibiendo la misma por incubación de las células BMDM a 4°C^{123,124}.

Los resultados mostrados en la Figura 19A indican que el polímero PAH-FITC no ingresa a la célula, sin embargo, cuando se ensambla con el Tpp formando Np-FITC es internalizado por los macrófagos. A su vez, cuando se inhibió la fagocitosis observamos una disminución en la fluorescencia de las células J774 por microscopía confocal y

citometría de flujo (Fig. 19B). En cambio, cuando se inhibió la endocitosis se observó un corrimiento mínimo en la intensidad de fluorescencia por citometría de flujo, pero las nanopartículas se encontraban adheridas a la superficie y no internalizadas (Fig. 19C).

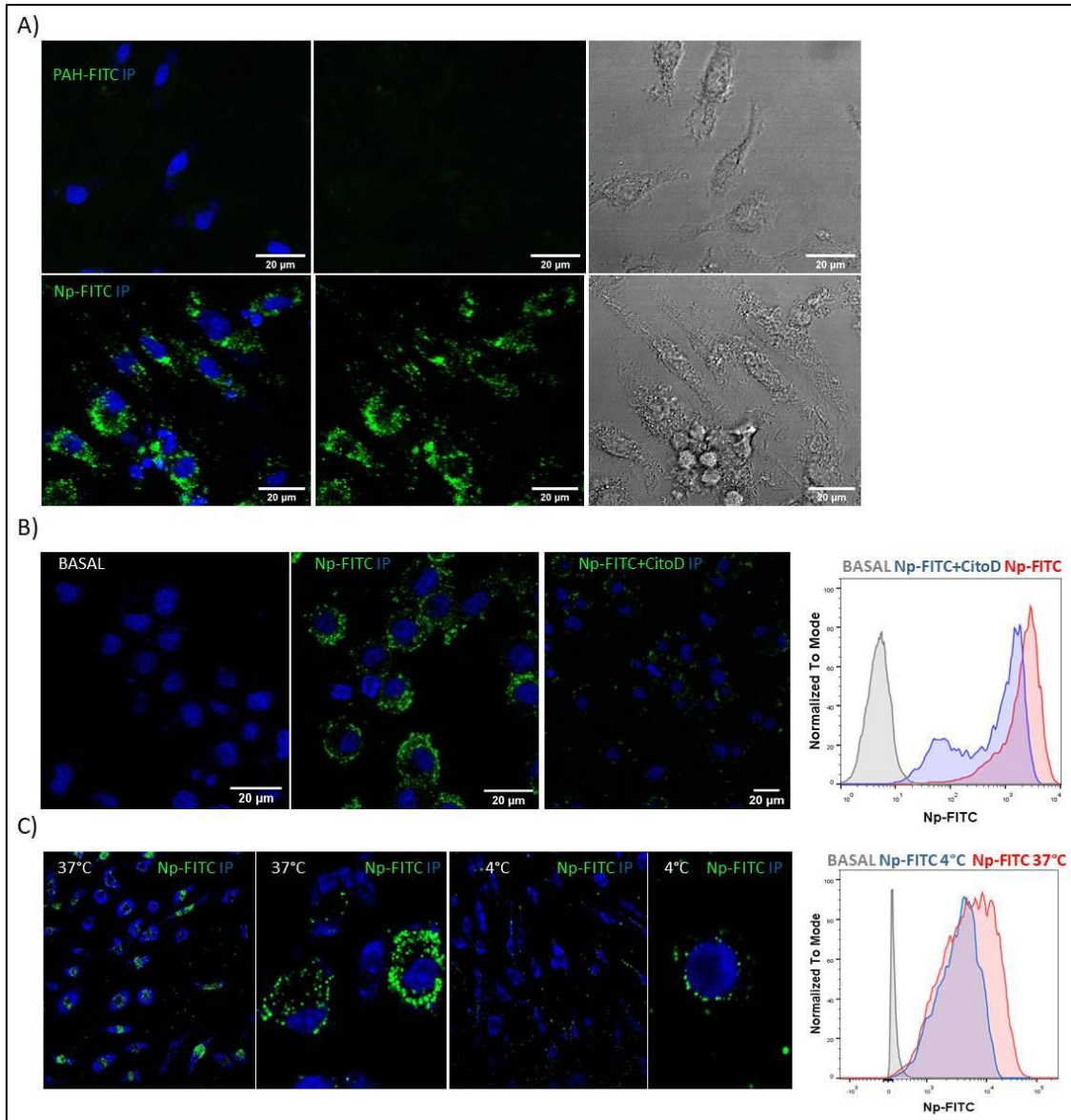


Figura 19: Análisis de la internalización por fagocitosis y endocitosis de Np-FITC. A) Determinación de la internalización de PAH-FITC y Np-FITC por microscopía confocal. B) Análisis de la línea celular J774 estimuladas Np-FITC y tratadas con Citocalasina D (CitoD) por microscopía confocal y citometría de flujo. C) Análisis de macrófagos derivados de médula ósea (BMDM) estimuladas con Np-FITC e incubados a 37°C y 4°C por microscopía confocal y citometría de flujo.

Asimismo, tal como se analizó la internalización y la activación de células dendríticas, se evaluó la maduración y activación de las células macrofágicas a través de la expresión superficial de F4/80 y MHC II respectivamente ^{125,126}. Luego del estímulo de las BMDM a 37°C con Np, se encontró un aumento en la frecuencia de células F4/80⁺ MHCII⁺, en comparación con células estimuladas a 4°C (Fig. 20).

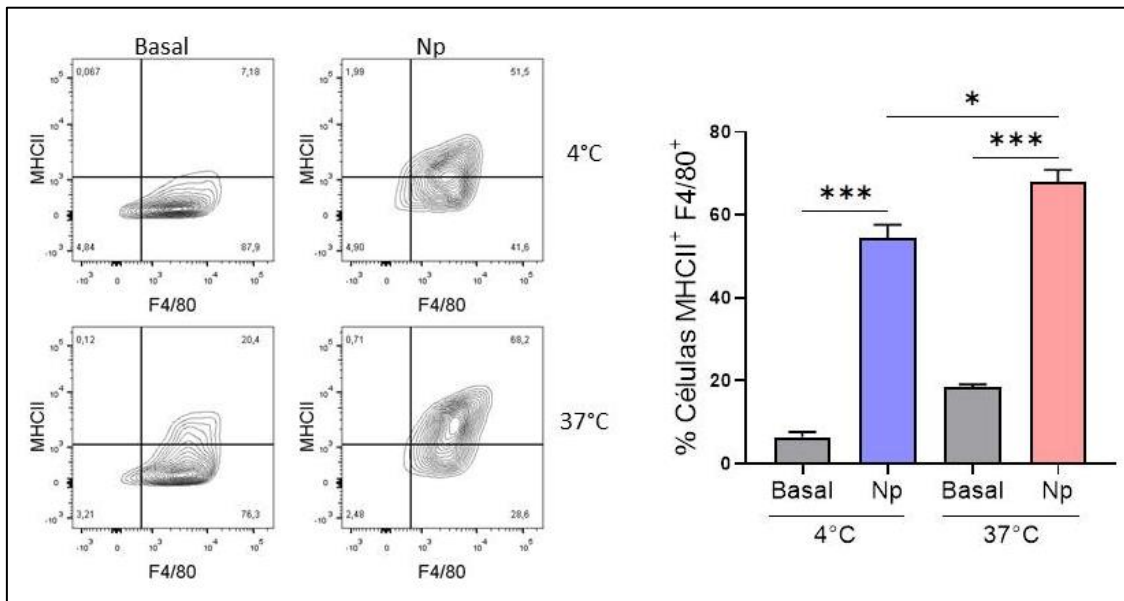


Figura 20: Análisis de la activación de BMDM por citometría de flujo. Se analizó y comparo la activación celular con medio de cultivo y con Np-FITC. Se muestran resultados experimentales obtenidos por duplicado y se grafica la media con su desviación estándar (ANOVA * $p < 0.05$; *** $p < 0.001$).

Con el fin de profundizar sobre los mecanismos de activación celular se realizó un tracking intracelular donde se analizó la fluorescencia mediante la colocalización de Np-FITC con Lamp-1 (de sus siglas en inglés *Lysosomal-associated membrane protein 1*), que es responsable junto a Rab7 de mantener la integridad, el pH y el catabolismo en las vesículas terminales de la vía endolisosomal. Por lo tanto, son marcadores característicos de endosomas tardíos y de lisosomas ¹²⁷⁻¹²⁹. Luego de la fagocitosis se forma un endosoma temprano cuyo pH interno es el fisiológico (pH=7.4), pero a medida que el mismo madura y migra intracelularmente se activan bombas de protones y se produce un descenso de pH interno, para luego fusionarse con las vesículas provenientes del Aparato de Golgi y formar el fagolisosoma que tiene un pH aproximado de 4.5. En estas condiciones se activan las enzimas lisosomales, entre ellas las catepsinas, que degradan proteínas contenidas en los mismos. En los ensayos con

la línea celular de macrófagos J774 se demostró que luego de 4 horas de estímulo las Np-FITC se encontraban en los fagolisosomas (Fig. 21). La fluorescencia definida en el citosol indica la presencia de nanopartículas en vesículas, mientras que la fluorescencia difusa probablemente indique la presencia de FITC dispersa en el citosol. Además, se observó que a este mismo tiempo hay vesículas amarillas (colocalización de Np-FITC con Lamp-1, en endosomas tardíos) y vesículas solo verdes (Np-FITC⁺ Lamp-1⁻) que podrían ser endosomas tempranos.

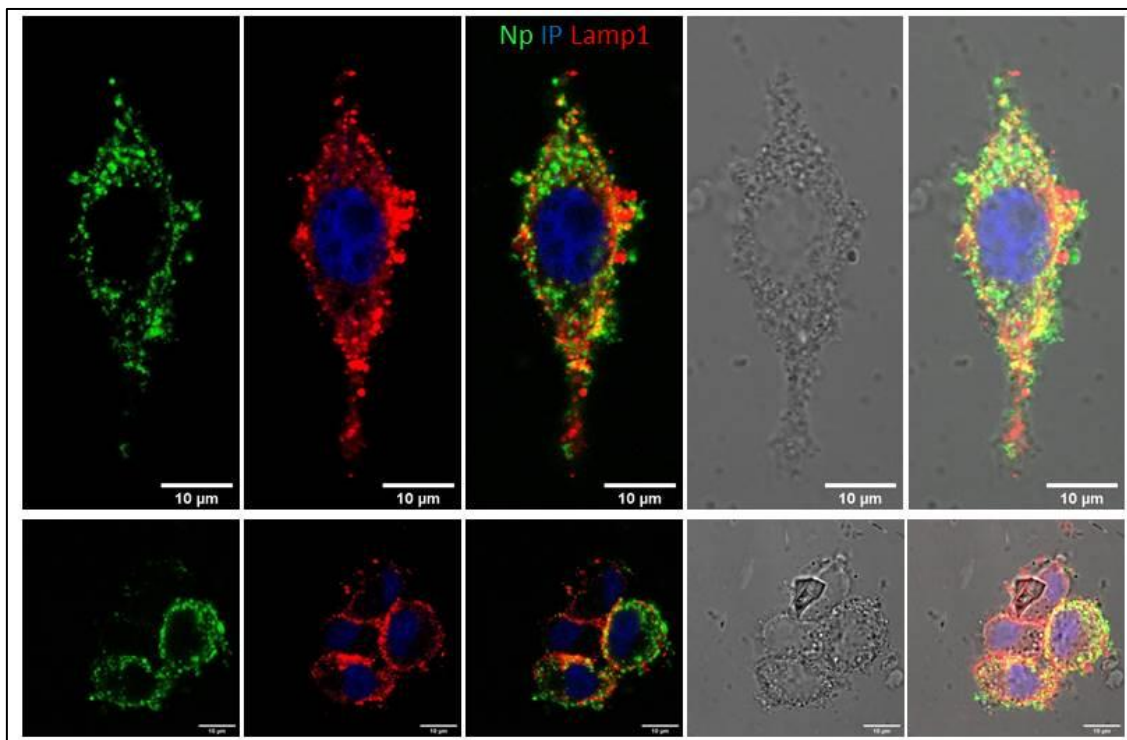


Figura 21: Tracking intracelular de Np-FITC. Microscopía confocal con yoduro de propidio (IP) para marcación de núcleo, Lamp-1 para lisosomas y Np-FITC.

Por lo tanto, con estos resultados demostramos que las Np ingresan a las células por endocitosis y fagocitosis, se alojan en endosomas, la maduración y el descenso del pH en los endosomas tardíos probablemente las disrumpe y eso determina que luego se trasloquen al citosol, dispersando el contenido de las mismas.

Dado que las Np van a ser empleadas en inmuno intervenciones mucosales también analizamos células epiteliales intestinales por tratarse de las células que se encuentran en la interfase entre el lumen y el tejido mucosal, y las Np deben atravesarlas para ingresar y activar al sistema inmune. Cabe aclarar que en intestino un

mecanismo muy frecuente de ingreso de antígenos al interior es a través de macrófagos (CX3CR1⁺) que emiten prolongaciones entre las células epiteliales, captan el antígeno luminal y lo introducen para luego traslocarlos a células dendríticas (CD103⁺) con capacidad de migrar hacia el ganglio y activar células T^{130,131}.

Para evaluar si las células epiteliales mucosales son capaces de internalizar las Np, expusimos diferentes líneas celulares colónicas a Np-FITC. Se utilizó flagelina (FLIC) para activar células epiteliales que expresan TLR5 y se evaluó EpCAM (*Epithelial Cell Adhesion Molecule*) como marcador de células y se evaluó la localización de las nanopartículas mediante microscopía confocal. En la Figura 22 se puede observar que la incubación de las células Caco-2 con Np-FITC no mostró fluorescencia intracelular. A través del barrido en el eje Z en la microscopía confocal, observamos que la fluorescencia verde correspondiente a Np-FITC se encuentra en la superficie de la monocapa celular y no en el interior de las mismas, aun cuando se activan con FLIC (1µg/mL). Los mismos resultados se obtuvieron en la línea de células epiteliales colónicas humanas HT29 (Fig. 22), que fueron estimuladas con TNF-α (20 ng/mL), para evaluar internalización en estado basal o activado.

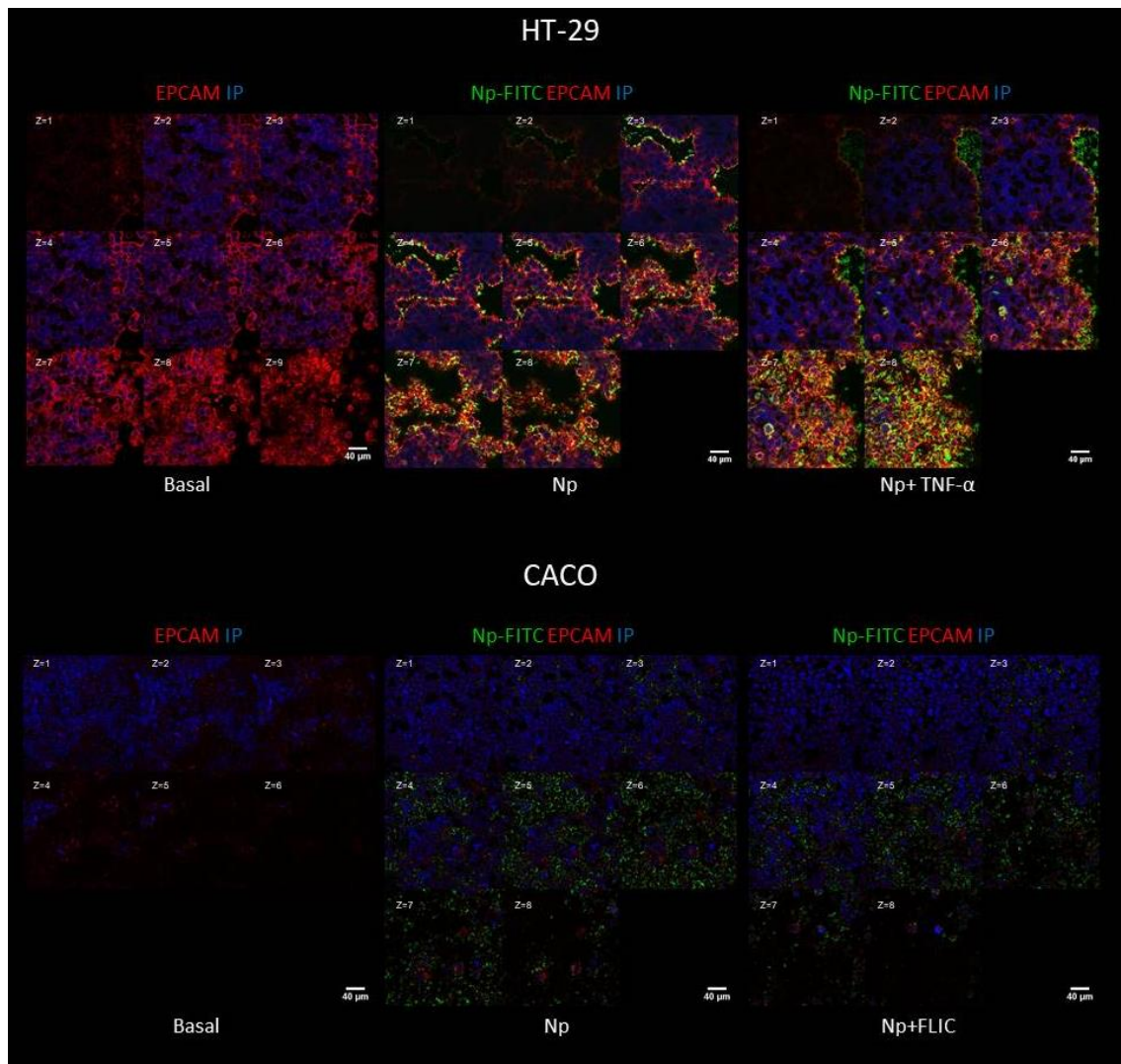


Figura 22: Análisis de la fluorescencia Np-FITC en células epiteliales por microscopía confocal. (Barrido en el eje Z).

De este modo pudimos demostrar que las Np sólo ingresan a células presentadoras de antígeno con capacidad fagocítica (células dendríticas y macrófagos) induciendo un cambio morfológico y aumento de expresión de moléculas coestimuladoras como CD86. En cambio, en células epiteliales intestinales no se evidenció la internalización de las Np ni cambios o alteraciones morfológicas.

2.4 Activación celular y producción de IL-1 β

Con el fin de evaluar la activación celular en células macrófágicas (macrófagos J774) y epiteliales (HT-29) y si ésta depende de la concentración de nanopartículas con que se estimulan, se emplearon 1×10^6 células/mL en placa de 48 pocillos para los

macrófagos y fosas con células en confluencia para las células epiteliales durante 24 horas. Se evaluó por microscopía óptica la morfología de los macrófagos J774 y se observó la presencia de precipitados en el fondo de la placa de cultivo debido a que las nanopartículas pueden sufrir cambios fisicoquímicos cuando se encuentran en altas concentraciones (>0.75 mM) y en presencia de sales (como sucede en los medios de cultivos). En la Figura 23A podemos observar que las Np inducen cambios morfológicos como el aumento del diámetro celular y prolongaciones citoplasmáticas, similar a lo que observamos anteriormente con las células monocíticas THP-1. Por el contrario, cuando se analizaron las células epiteliales HT-29, no se observaron cambios morfológicos ni alteraciones en la monocapa celular, manteniendo su integridad en todo el rango de concentraciones (Fig. 23B).

En consecuencia, estos resultados indican que sólo las células fagocíticas son capaces de internalizar a las nanopartículas, proceso que induce la activación de las mismas, como se observó en los apartados anteriores.

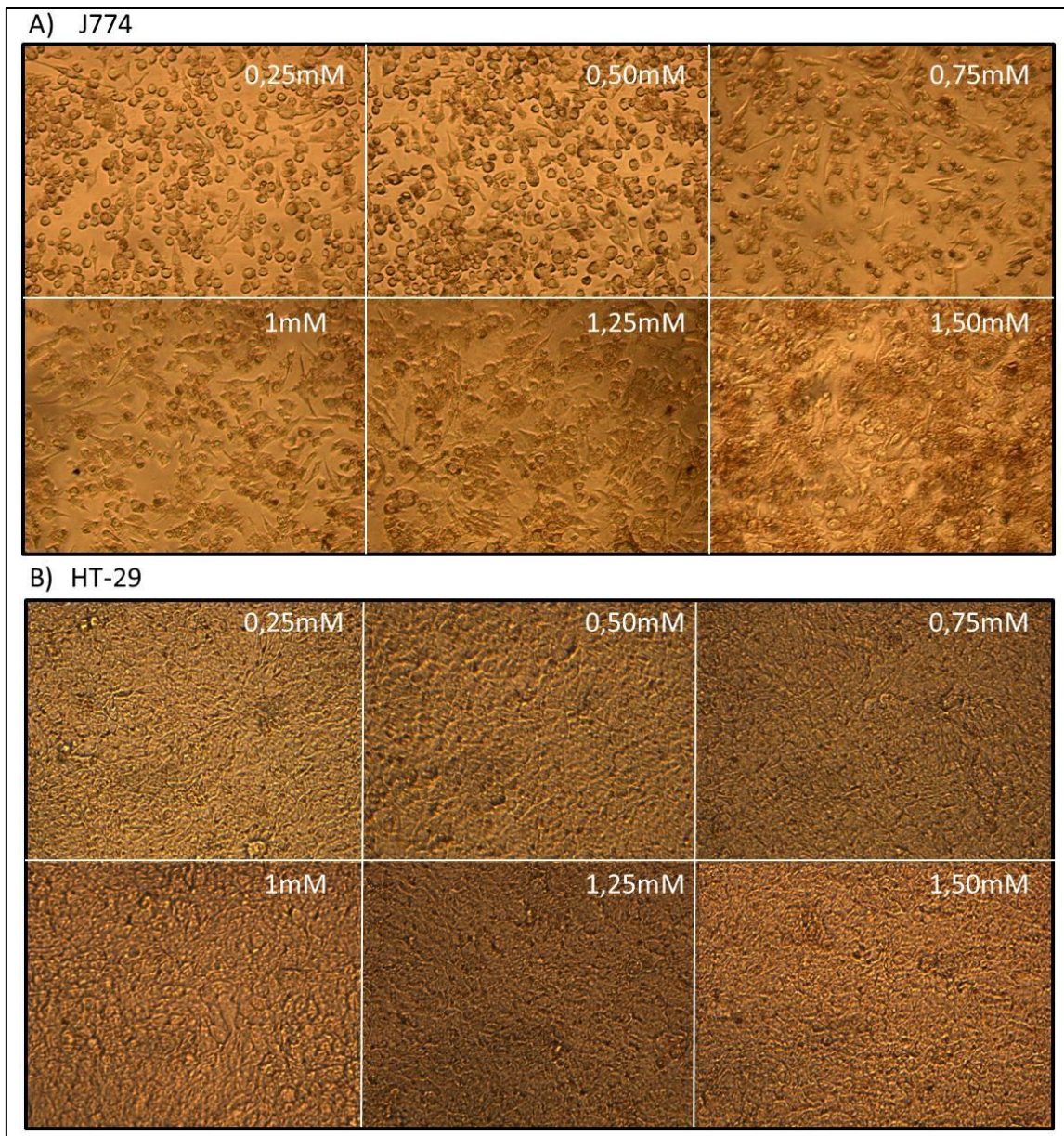


Figura 23: Microscopía óptica de células macrofágicas murinas J774 (A) y células epiteliales colónicas humanas HT-29 (B) estimuladas con distintas concentraciones de Np (0.25 mM-1.50 mM) 24 horas de estímulo. Las distintas condiciones experimentales se llevaron a cabo por duplicado y se muestran imágenes representativas.

Para confirmar estos resultados evaluamos la producción de las citoquinas pro-inflamatorias $\text{mIL-1}\beta$ e hIL-8 en las células macrofágicas y epiteliales respectivamente. Como control positivo se estimularon macrófagos con LPS+ATP , y las células epiteliales con $\text{TNF-}\alpha$. Se cuantificaron los niveles de estas citoquinas en el sobrenadante de cultivo y se midió la actividad de la enzima lactato deshidrogenasa (LDH) como parámetro de toxicidad celular. Esta enzima está directamente relacionada con la

muerte celular no específica, ya que es liberada al medio extracelular mediante la ruptura de la membrana celular o por la formación de grandes poros en la misma.

En la Figura 24A se observa la producción y secreción de $\text{mIL-1}\beta$ en el sobrenadante de cultivo cuando la línea J774 fue estimulada con LPS+Np o LPS+ATP. En las condiciones de trabajo empleadas observamos mayores niveles de $\text{mIL-1}\beta$ cuando las células fueron incubadas con LPS+Np, que con LPS, Np o LPS+ATP. Estos resultados confirman que la secreción de $\text{mIL-1}\beta$ requiere de LPS y Np. Para corroborar que esta activación celular es específica de las CPA y no se activan otras vías intracelulares, se estimuló la línea HT-29 con Np y $\text{TNF-}\alpha$ como agonista de la vía NF- κ b y se midió la secreción de hIL-8 (Fig. 24B). Pudimos demostrar que las Np no activan por sí solas la vía NF- κ b y no inducen la secreción de hIL-8 en dichas células epiteliales. Los niveles de hIL-8 son similares para las condiciones de $\text{TNF-}\alpha$ +Np y $\text{TNF-}\alpha$, y significativamente superiores a los hallados con Np. Podemos extrapolar este hallazgo a las células J774, y concluir que las Np no inducen activación de la vía NF- κ b.

Finalmente analizamos la viabilidad celular por la medida de la actividad de LDH en el sobrenadante de cultivo y observamos que en todas las condiciones ensayadas los niveles enzimáticos se mantienen en valores basales y constantes (Fig. 24A y B). En estos ensayos se utilizó 0.75 mM de Np. Con este último ensayo, y la caracterización fisicoquímica descrita en el apartado anterior, pudimos concluir que la concentración óptima de Np a utilizar en cultivos celulares debe ser de 0.5 mM. Utilizando dicha concentración se concluye que la Np inducen en células fagocíticas la producción y secreción de $\text{IL-1}\beta$ con un bajo porcentaje de LDH en sobrenadante.

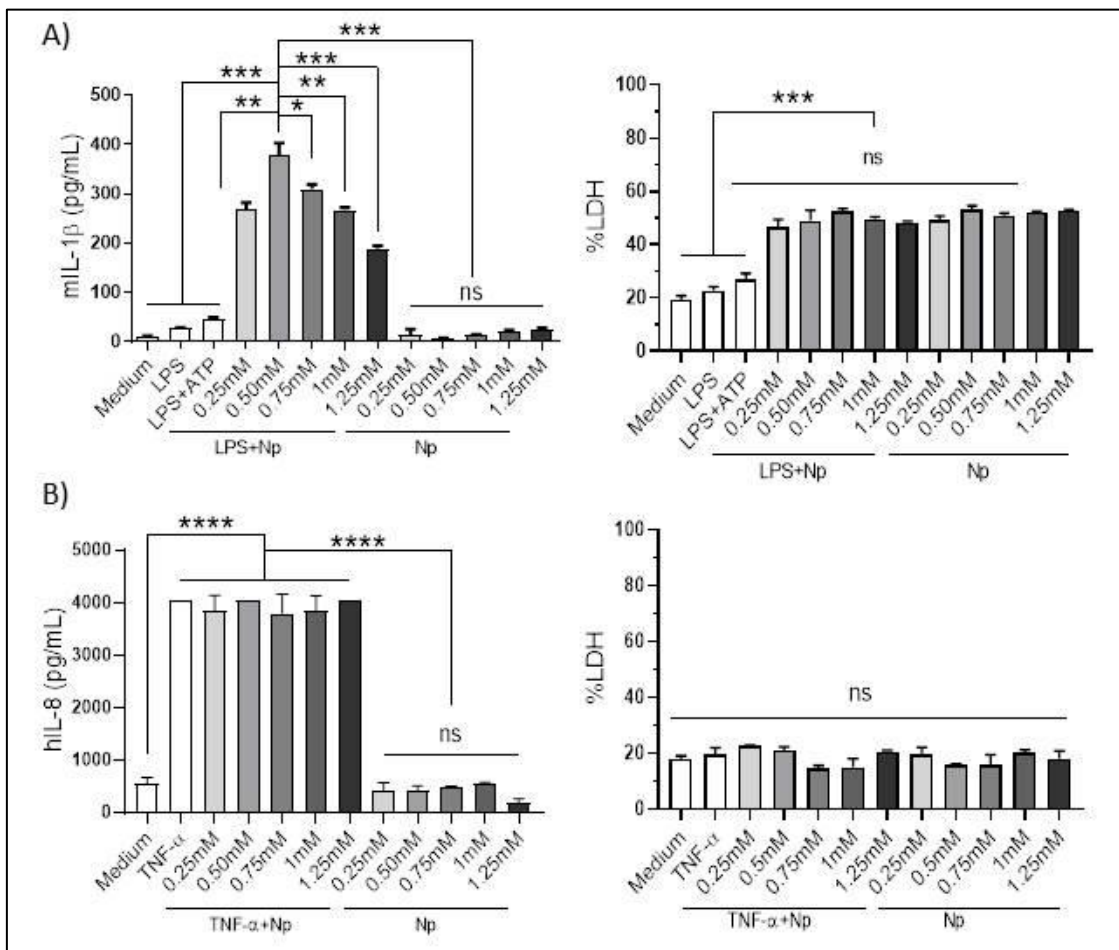


Figura 24: Análisis de la estimulación celular y producción de citoquinas frente al estímulo con distintas concentraciones de Np. A) Niveles de mL-1 β y actividad enzimática LDH en sobrenadante de cultivo de macrófagos J774 y B) Niveles de hIL-8 y actividad enzimática LDH en la línea celular HT-29. En ambos casos los estímulos se realizaron durante 24 horas y el porcentaje de LDH corresponde a los 40 minutos de la reacción. Las distintas condiciones experimentales se llevaron a cabo por triplicado, se grafica la media con su desviación estándar (ANOVA* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$).

A fin de confirmar que la concentración de 0.5 mM de Np es la óptima, se utilizó otra línea de células presentadoras de antígeno: células dendríticas JAWS II de origen murino. Como primera medida evaluamos si las Np-FITC eran internalizadas. En la Figura 25A se observa por microscopía de epifluorescencia como las células sufren un cambio morfológico, luego de internalizar las nanopartículas, observándose proyecciones citoplasmáticas, lo cual podría indicar que las células adquieren un estado activado. La activación celular fue confirmada por citometría de flujo con un aumento significativo de la expresión de CD86 en superficie (Fig. 25B). Finalmente, analizamos la secreción de la citoquina mL-1 β incluyendo como control positivo

LPS+ADN. En la Figura 25C se observa un aumento estadísticamente significativo de esta citoquina en el sobrenadante de cultivo de células incubadas con Np, en comparación con células sin estimular y con el control positivo.

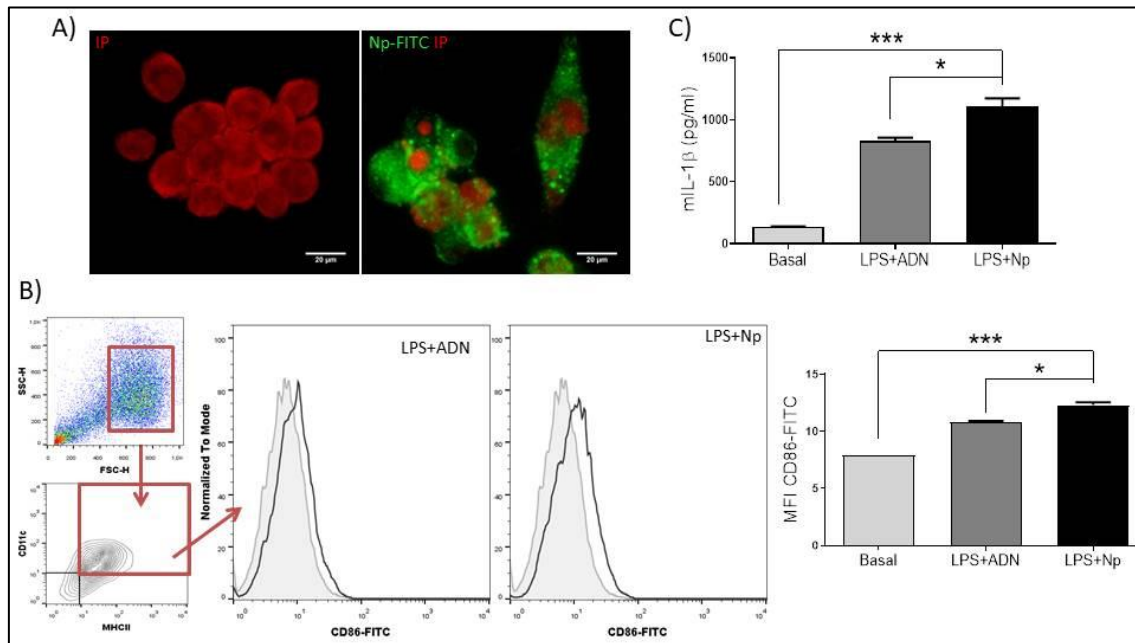


Figura 25: Caracterización de la activación de células dendríticas JAWS II estimuladas con Np-FITC. A) Microscopía de epifluorescencia comparando estado el basal con las estimuladas con 0.5 mM de Np-FITC. B) Estrategia de gates por citometría de flujo para la selección de población $CD11c^+MHCII^+CD86^+$ y de intensidad de fluorescencia media (MFI). C) Cuantificación de $mIL-1\beta$ por ELISA en sobrenadante de cultivo luego de 24 horas de estímulo. Las distintas condiciones experimentales se llevaron a cabo por duplicado, se grafica la media con su desviación estándar (ANOVA * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$).

Estos resultados nos permiten concluir que la concentración adecuada de Np para estimular *in vitro* las distintas líneas celulares es 0.5 mM debido a que induce una mayor activación celular con la producción y liberación de $IL-1\beta$ sin producir daño celular evaluado con la menor liberación de LDH.

2.5 Activación de la vía intracelular del inflamosoma

En todas las células presentadoras de antígenos, ya sean células dendríticas, macrófagos o monocitos, utilizadas y mencionadas anteriormente se detectó la producción y liberación de la citoquina pro-inflamatoria $IL-1\beta$ cuando estas son incubadas en presencia de Np y se produce su internalización.

Para estudiar la activación del inflamosoma se utilizó la línea celular reportera para la proteína adaptadora ASC que forma parte del complejo multiproteico y tiene como función clivar y activar a la caspasa-1. Las células reporteras THP-1-ASC-GFP presentan la proteína ASC fusionada a la proteína verde fluorescente GFP, de esta manera cuando se ensambla el inflamosoma puede observarse la condensación y localización del complejo ASC-GFP, de tamaño micrométrico y apreciable al microscopio óptico como puntos brillantes verde, denominados specks. Por lo tanto, en las células que se encuentran en un estado basal no se debería detectar ninguna señal de fluorescencia, mientras que si se estimula con LPS (prime o cebado celular) se induce la expresión de la proteína ASC:GFP dependiente de NF- κ B, y se observa fluorescencia difusa en todo el citoplasma. La formación de los specks de ASC es una lectura altamente confiable como indicador de la activación del inflamosoma. En la Figura 26A, se muestran los controles negativos (medio), control de expresión de ASC (LPS), control positivo (3 horas con 1 μ g/mL LPS de *E. coli*. y luego una transfección con ADN o se estimula con ATP 5 mM durante 3 horas) y el estímulo de LPS+Np. Se cuantificó la inducción de la activación del inflamosoma mediante el recuento de specks en relación a células totales por campo (Fig. 26B). Observamos un aumento significativo en el número de *specks* en los controles positivos y con LPS+Np respecto al estado basal únicamente con medio de cultivo. Posteriormente, cuantificamos hIL-1 β por ELISA en los sobrenadantes de cultivo de las mismas células (Fig. 26C) y encontramos que en las mismas condiciones en las que observamos un elevado número de *specks*, los niveles de hIL-1 β se hallaron significativamente elevados. De este modo, se muestra una correlación entre la formación de los *specks* y el aumento en la producción y secreción de hIL-1 β en el sobrenadante de cultivo cuando las células son estimuladas con las Np.

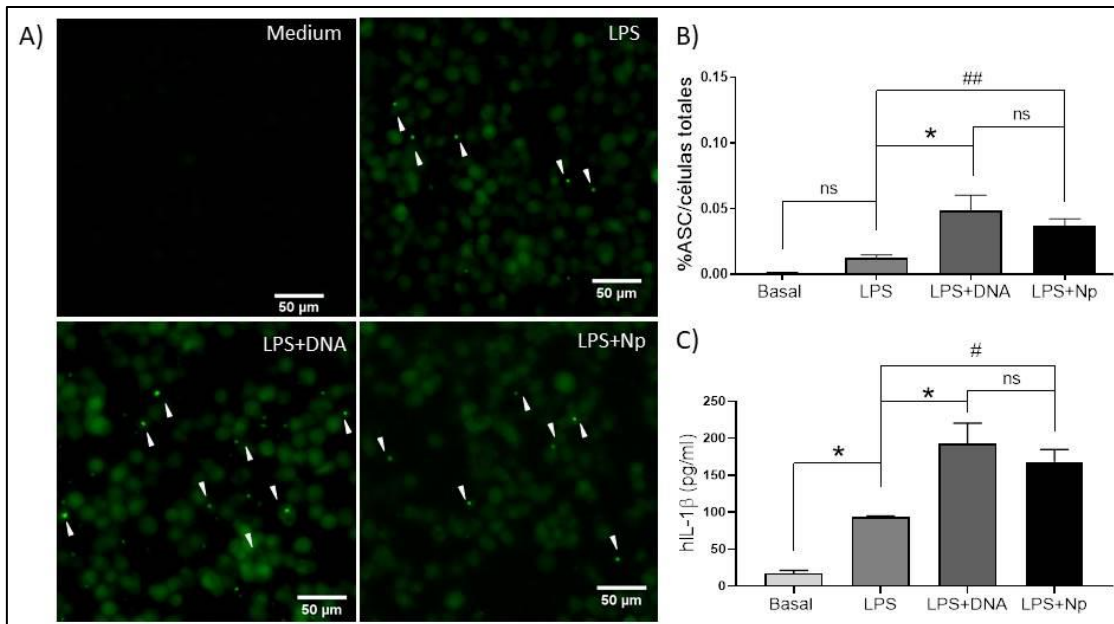


Figura 26: Activación del inflamosoma en células reporteras THP-1-ASC-GFP por microscopía de epifluorescencia. A) Microscopía de fluorescencia con las flechas blancas indicando los specks, se muestran imágenes representativas; B) cuantificación de specks en relación a las células totales por campo y C) cuantificación hIL-1 β por ELISA en el sobrenadante de cultivo. Las distintas condiciones experimentales se realizaron por triplicado, se grafica la media con su desviación estándar (ANOVA * $P < 0.05$; t-Student # $P < 0.05$; ## $P < 0.01$).

Sobre la misma línea celular, se realizó un análisis similar por citometría de flujo, para alcanzar una mayor significancia estadística en la cuantificación de células activadas fluorescentes inflammasoma-dependiente. Dado que la fluorescencia general por célula (medida como la señal de área en la citometría de flujo) en principio no debería cambiar, la señal se vuelve mucho más concentrada en un solo punto dentro de la célula. Esto se mide como una señal disminuida en el ancho del pulso. Al mismo tiempo, la señal detectada en una determinada célula activada por el inflamosoma es más brillante, lo que da como resultado una mayor altura del pulso de la señal. Por lo tanto, los *specks* se pueden cuantificar como aquella población que escapa de la linealidad (GFP-A vs. GFP-W o GFP-H vs. GFP-A), como se observa en la Figura 27A. Encontramos valores significativamente superiores en las células estimuladas con LPS+Np o LPS+ATP, en comparación con los controles de medio o LPS (Fig. 27B). Asimismo, para confirmar que la vía del inflamosoma se encuentra activada en estas condiciones cuantificamos nuevamente los niveles de hIL-1 β en el sobrenadante de cultivo (Fig. 27C). Una vez más observamos valores aumentados en comparación con los controles negativos de las condiciones LPS+Np y LPS+ATP ($p < 0.05$)^{111,132}.

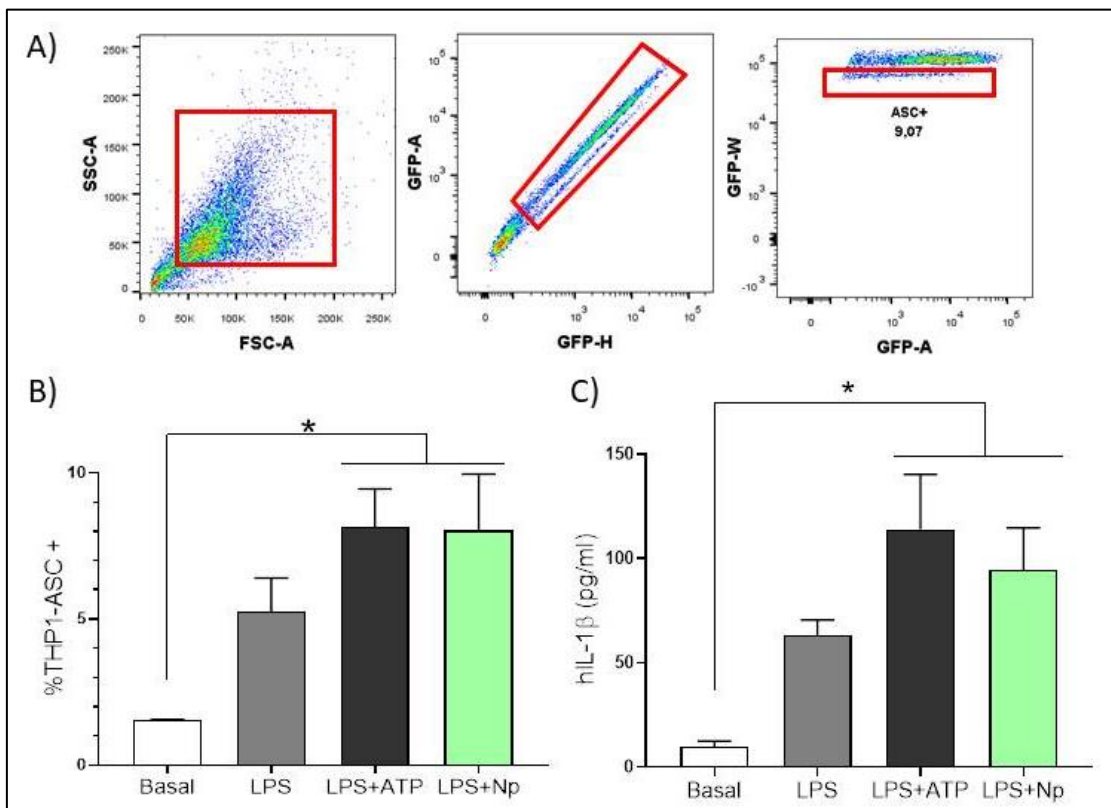


Figura 27: Activación del inflammasoma en células reporteras THP-1-ASC-GFP por citometría de flujo. A) Estrategia de gates para seleccionar las células ASC+, B) cuantificación del porcentaje de células ASC+ y C) cuantificación de hIL-1 β por ELISA en el sobrenadante de cultivo. Las distintas condiciones experimentales se realizaron por triplicado, se grafica la media con su desviación estándar. (ANOVA* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$. t-Student # $P < 0.05$; ## $P < 0.01$).

2.6 Mecanismo de acción de las nanopartículas

Evidenciada la activación del inflammasoma con las Np, estudiamos con mayor profundidad qué vía se encuentra involucrada. Anteriormente mostramos que las Np se localizan en los fagosomas luego de ser fagocitadas por células presentadoras de antígeno. Si bien las Np son estables a pH levemente ácido (apenas por debajo del fisiológico), sostenemos que en este entorno intra-lisosomal la Np se desarma, probablemente de manera parcial, y las cargas positivas que presentan los polímeros desestabiliza al lisosoma a causa de una posible despolarización de la membrana. Esto genera la ruptura parcial de su membrana permitiendo la liberación del contenido al citosol, en el cual se encuentran proteasas de la familia de las catepsinas^{97,106,119}. Este proceso se denomina permeabilización de la membrana lisosomal^{96,133,134}.

Como mencionamos anteriormente, la activación del inflamosoma y la formación del complejo enzimático cliva a la pro caspasa-1 a su forma activa, caspasa-1. Esta enzima proteolítica es la responsable de la maduración de la citoquina pro-IL-1 β y pro-IL-18 a sus formas pro-inflatorias y biológicamente activas: IL-1 β e IL-18. Además, la caspasa-1 es capaz de clivar a gasdermina D (GSDMD) en sus dominios: GSDMD-C y GSDMD-N. El producto GSDMD-C se encuentra en el citosol mientras que GSDMD-N se localiza en la membrana citoplasmática al anclarse a los fosfolípidos de membrana para formar poros que funcionan como canales que permiten la secreción de las citoquinas anteriormente mencionadas. La secreción de IL-1 β e IL-18 induce rápidamente la activación de una respuesta inflamatoria. A su vez, la IL-1 β actúa de manera autocrina aumentando el estímulo y la producción de IL-1 β al unirse al receptor IL-1R^{108,135}.

Para estudiar la vía de activación del inflamosoma involucrada se utilizaron distintos inhibidores. Anteriormente, mostramos que la internalización es fagocitosis-dependiente, mediante el empleo de citocalasina D; aquí incluimos en los ensayos CA-74Me (inhibidor de catepsina B), Z-VAD-FMKQ (inhibidor de caspasas) y Anakinra (biológico antagonista del receptor de IL-1). Como sistema de evaluación de la actividad de la vía se cuantificaron los niveles de IL-1 β e IL-18 en el sobrenadante de cultivo celular (ELISA), luego del estímulo con Np en presencia o ausencia de los distintos inhibidores (Fig. 28). Encontramos que los distintos inhibidores suprimen la liberación tanto de la citoquina mIL-1 β como mIL-18 por parte de BMDC y de hIL-1 β en monocitos THP-1, en comparación a la activación sólo con Np.

Estos resultados en conjunto confirman la hipótesis de trabajo planteada, donde la Np produce una desestabilización de la membrana lisosomal y con ello la liberación de proteasas que activan el inflamosoma y caspasa-1 para inducir la producción y secreción de IL-1 β , como responsable de la inmunidad innata para la inducción de un foco inflamatorio *in vivo*.

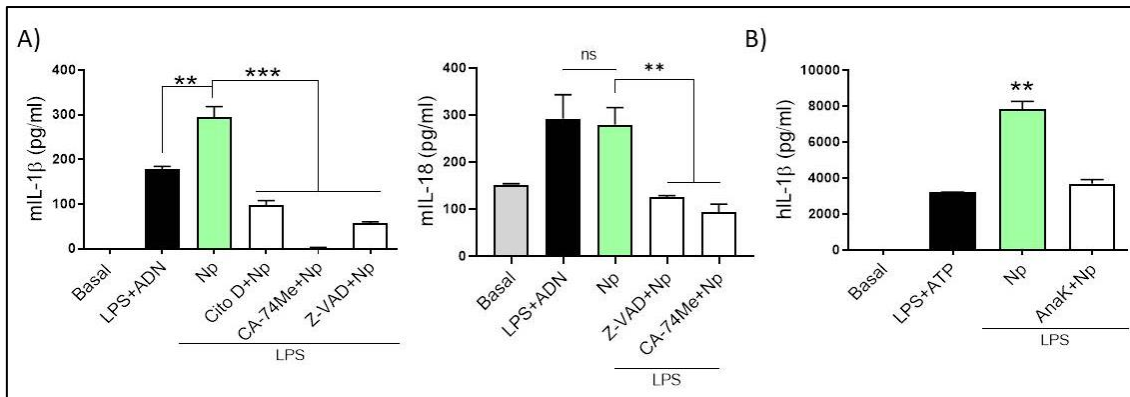


Figura 28: Análisis de la vía de activación del inflammasoma con el uso de inhibidores en células presentadoras de antígeno. Cuantificación de IL-1 β e IL-18 por ELISA en el sobrenadante de A) BMDC y B) células monocíticas humanas THP-1; se utilizó como control positivo LPS+DNA y LPS+ATP respectivamente. citocalacina D (Cito D) inhibidor de la fagocitosis; CA-74Me inhibidor de catepsina B; Z-VADfmk inhibidor de caspasa y Anakinra (AnaK) antagonista del receptor de interleuquina-1 β (IL-1R). Las distintas condiciones experimentales se llevaron a cabo por triplicado, se grafica la media con su desviación estándar. (ANOVA* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$).

Dado que la proteína adaptadora ASC es común a varios inflammasoma, incluido el sensor NLRP3, y está asociada a la activación de la vía canónica del inflammasoma que permite el ensamblado del complejo multiproteico entre el sensor intracitosólico y caspasa-1, activándose y clivando a las citoquinas proinflamatorias IL-1 β , evaluamos la secreción de IL-1 β empleamos BMDM proveniente de ratones KO para el inflammasoma NLRP3 $^{-/-}$, las enzimas Casp1/11 $^{-/-}$ y Casp11 $^{-/-}$ y para la proteína formadora de poros GSDMD $^{-/-}$.

Luego de incubar ON los BMDM con 0.5 mM de Np, se cuantificó mIL-1 β y m-TNF- α en el sobrenadante de cultivo. Como control se utilizaron ratones wild-type C57BL/6 (B6). A través de estos ensayos pudimos evidenciar que la producción de mIL-1 β se inhibe significativamente y es directamente dependiente de NLRP3 $^{-/-}$ y de casp1/11 $^{-/-}$ con el estímulo de LPS+Np. Las células sólo estimuladas con Np o LPS no inducen mIL-1 β (Fig. 29A). Asimismo, la supresión hallada en animales casp1/11 $^{-/-}$ es dependiente de caspasa-1 dado que en células provenientes de ratones casp11 $^{-/-}$ observamos secreción de mIL-1 β similar a los ratones wild-type. En la Figura 29B se muestran los niveles de mTNF- α en BMDM expuesto a LPS, Np y LPS+Np. Como se puede observar en los animales KO y wild-type los niveles de mTNF- α son significativamente superiores en las condiciones de cultivo con LPS o LPS+Np. Las

condiciones basales y Np mostraron valores basales de esta citoquina, mientras que al comparar los niveles en las condiciones LPS y LPS+Np no observamos diferencias significativas. Estos hallazgos confirman nuevamente que la Np no induce TNF- α .

También hallamos, llamativamente, que la producción y liberación de mL-1 β es independiente de gasdermina D (ratones GSDMD^{-/-}). Estos resultados sugieren que la enzima caspasa-1 está implicada en la vía de activación y que puede existir una vía alternativa a la formación del poro en la membrana por parte de gasdermina D, por la cual se libera la citoquina al medio extracelular. Paralelamente se evaluó la integridad celular por cuantificación de la liberación de la enzima lactato deshidrogenasa (LDH) como señal de muerte celular en el sobrenadante de cultivo y observamos que en todas las condiciones experimentales los valores son reducidos y comparables entre los controles sin estímulo y con LPS+Np (Fig. 29C).

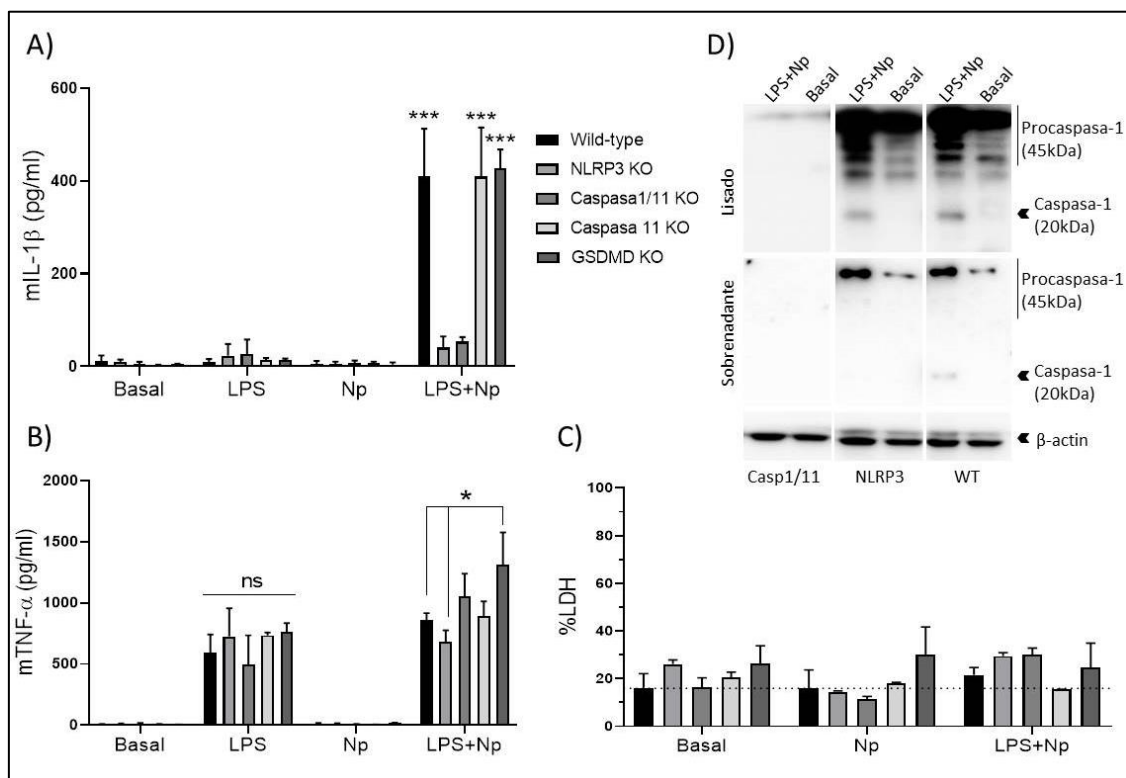


Figura 29: Análisis de la activación del inflamosoma por Np en células provenientes de ratones knock-out en NLRP3, caspasa-1 y caspasa-1/11 y gasdermina D. Cuantificación de mL-1 β A) y TNF- α B) por ELISA y LDH (ensayo enzimático) en los sobrenadantes de cultivos de médula ósea de ratones KO y wild-type. D) Inmunoblotting de sobrenadantes y lisados celulares para la detección de caspasa-1 activa (banda de 20 kDa), se analizó β -actina como control de carga de proteínas. Las distintas condiciones experimentales se llevaron a cabo por

*triplicado, se grafica la media con su desviación estándar y los gráficos representan al menos 2 experimentos independientes. (ANOVA * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$).*

Finalmente, analizamos por inmunoblotting lisados celulares y sobrenadantes de cultivo de los mismos ensayos para concluir sobre la activación de las caspasas. Se empleó un anticuerpo específico de la subunidad p20 de caspasa-1. En la Figura 29D se muestran los diferentes resultados y podemos observar que en el sobrenadante de cultivo de BMDM deficientes en NLRP3 no se observó la banda correspondiente a la caspasa-1 activa (20 kDa), mientras que en lisado celular se observa la banda correspondiente a la enzima activa, con una intensidad levemente menor comparada al control WT. Estos resultados indican que caspasa-1 se estaría induciendo por una vía independiente de NLRP3 y que no se secreta. En las células proveniente de animales salvajes, Np induce la activación de caspasa-1 la cual se secreta al medio, probablemente junto a IL-1 β por los poros que se forman en la membrana. A su vez, la formación de poros sería independiente de gasdermina D. Como era de esperar no se observó la banda proteica correspondiente a caspasa-1 en animales deficientes en caspasa-1/11.

Por lo tanto, en su conjunto estos resultados confirman que las Np inducen la activación del inflamosoma NLRP3, este proceso es dependiente de la fagocitosis, luego de la misma se libera parte del contenido lisosomal que contiene catepsina B y aquí se induce la activación de NLRP3 seguida de caspasa-1. Finalmente, se produce la inducción y secreción de IL-1 β a través de los mecanismos dependientes e independientes de poros formados por gasdermina D y esto facilita la inducción de procesos inflamatorios.

Conclusión y discusión

Los resultados presentados en este capítulo demuestran las propiedades fisicoquímicas y biológicas de las nanopartículas PAH/Tpp y PAH/Tpp-FITC ($R=0.6$). Las Np PAH/Tpp autoensamblantes presentaron carga superficial negativa con un tamaño de 200 nm y características hidrodinámicas estables durante meses, tanto en agua como en medio de cultivo a 25°C y 37°C. Además, las Np resultaron no ser tóxicas al exponer distintas líneas celulares. La exposición de células fagocíticas (macrófagos y células dendríticas) a las Np generó cambios morfológicos que luego se confirmó que estaban asociados a la activación celular. Por el contrario, células no fagocíticas (células epiteliales colónicas) que recubren la mucosa intestinal no internalizan a las Np y las monocapas celulares no se vieron afectadas frente a su exposición.

Los cambios morfológicos mencionados dependieron del tamaño y naturaleza de la nanopartícula, e indujeron un aumento significativo en la expresión de CD14, CD86 y en la secreción de IL-1 β , dependiendo del tipo celular analizado. Los macrófagos activados son células con capacidad fagocítica aumentada y se encontró que las nanopartículas inducen la polarización hacia la población M1, lo cual se define como una célula activada que puede inducir una respuesta humoral Th1^{109,110,120,136,137}. En células dendríticas se evidenció que las nanopartículas inducen activación celular con un aumento de CD86 en superficie. Asimismo, se encontró un aumento de CD103, que podría estar involucrado en los mecanismos que inducen la migración desde tejidos mucosales periféricos hacia ganglios linfáticos drenantes y contribuir a la inmunidad adaptativa del tipo 1 con diferenciación de linfocitos hacia las poblaciones Th1. Dichas células dendríticas son capaces de inducir un perfil Treg, además a través de presentación cruzada de antígenos pueden inducir la expansión de linfocitos T CD8⁺ específicos, dependiendo del contexto de activación^{100,138}.

El tamaño de estas nanopartículas se encuentra en el rango de muchos microorganismos, entre ellos los virus, por lo cual no resulta sorprendente que estas Np hayan sido las que estimularon con mayor eficiencia células de la inmunidad innata.

Se encuentra reportado en la bibliografía que los sistemas particulados tienen la capacidad de activar la inmunidad innata a través del inflamosoma. Para que las Np puedan ser detectadas por alguno de los receptores que conforman el inflamosoma deben ingresar a la célula, debido a que no se han descrito receptores de superficie para partículas poliméricas. La endocitosis y la fagocitosis cumplen un papel fundamental en la fisiología de las células. La captación de macromoléculas y la vehiculización intracelular en fagosomas son fundamentales para su degradación o reciclado de receptores y estos procesos están involucrados en muchas cascadas de señalización. La ruta endocítica involucra mecanismos dependientes o independientes de clatrina, macropinocitosis y de la fagocitosis^{139,140}. La capacidad de internalizar nanopartículas depende de su tamaño y carga. Aquí demostramos que las Np fueron internalizadas por fagocitosis y que se localizaron en endosomas y fagolisosomas. Sin embargo, el polímero no fue internalizado por macrófagos y tampoco indujo activación celular. Posteriormente se demostró que el contenido de las vesículas es liberado al citosol, y con éste la cathepsina B. Esta enzima es la que activa al complejo multiproteico inflamosoma prosiguiendo con la activación de la caspasa-1 y posterior clivaje de la pro-IL-1 β a su forma biológicamente activa IL-1 β ^{96,141-143}. Finalmente esta citoquina activada es secretada al medio extracelular a través de mecanismos dependiente e independiente de la formación de poros de gasdermina D. Por lo tanto, estos resultados además demuestran que las Np son capaces de inducir la presentación cruzada de antígenos en células dendríticas y en macrófagos.

El empleo de ratones deficientes en distintos componentes de las vías del inflamosoma nos permitió confirmar que NLRP3 y caspasa-1 están directamente involucrados en la activación celular, producción y secreción de IL-1 β . Este mecanismo NLRP3-dependiente es uno de los principales sensores de daño en membranas. Participa también en procesos relacionados con la acción de toxinas bacterianas que inducen una despolarización de la membrana que promueve el movimiento de los iones de K⁺ a través de canales específicos, y esto activa el inflamosoma. Si bien, tanto la caspasa-1 como la caspasa-11 pueden ser activadas por el inflamosoma NLRP3, la producción y liberación de IL-1 β solo dependió de caspasa-1. En cambio, la proteína formadora de poros gasdermina D no parece participar en la vía de secreción de la

citoquina ya que la liberación de IL-1 β no se vio modificada en los animales GSDMD^{-/-} (Fig. 29).

Si bien la mayoría de las citoquinas contienen una secuencia señal para dirigir su salida celular a través de vesículas secretoras, la IL-1 β carece dicha señal¹⁴⁴. Cuando la caspasa-1 cliva la pro-IL-1 β remueve la parte cargada negativamente lo que le permite reubicarse en la membrana. Este proceso facilita la liberación de la citoquina de manera rápida cuando es dependiente de GSDMD o de manera lenta independientemente de GSDMD. Se han descrito diferentes vías no convencionales independientemente de GSDMD como son el tráfico vesicular intracelular (exocitosis de lisosomas o autofagosomas), liberación de microvesículas y endosomas. Por ejemplo, los cuerpos multivesiculares (MVB, de sus siglas en inglés) los cuales están cargados con endosomas que contienen la citoquina, una vez que se libera MVB al medio extracelular se lisan y se libera la citoquina soluble¹⁴⁵⁻¹⁴⁷. La secreción de IL-1 β independiente de GSDMD inducida por las Np se asocia sólo con niveles elevados de la citoquina soluble y no con LDH elevada, lo cual podría indicar que las células activadas no se encuentran en un estadio de muerte celular relacionado con la piroptosis^{144,148}.

Por lo tanto, las células estimuladas con las Np inducen la activación canónica del inflamosoma y secretan IL-1 β e IL-18 para instaurar un foco inflamatorio (Fig. 30)^{118,149}.

Por otro lado, se ha reportado que la activación del inflamosoma en células de la inmunidad innata, principalmente células dendríticas, induce la capacidad de migrar a órganos linfoides para interactuar con linfocitos T y expandir clones de LT para generar LT efectores y de memoria central. Se ha descrito que la activación del inflamosoma se encuentra involucrado en estos procesos¹⁵⁰. A su vez, se ha demostrado que la IL-1 β es capaz de activar a las NK y que el IFN- γ secretado promueve una respuesta celular Th1-dependiente¹⁵¹. Por lo tanto, con nuestros hallazgos *in vitro* junto con la información disponible en la literatura, nos permite concluir que las nanopartículas PAH/Tpp pueden actuar como un vehículo protector del inmunógeno, que además lo dirigen al sitio inmune adecuado, pero que

adicionalmente tienen propiedades inmunoestimuladoras que las convierte en adyuvantes.

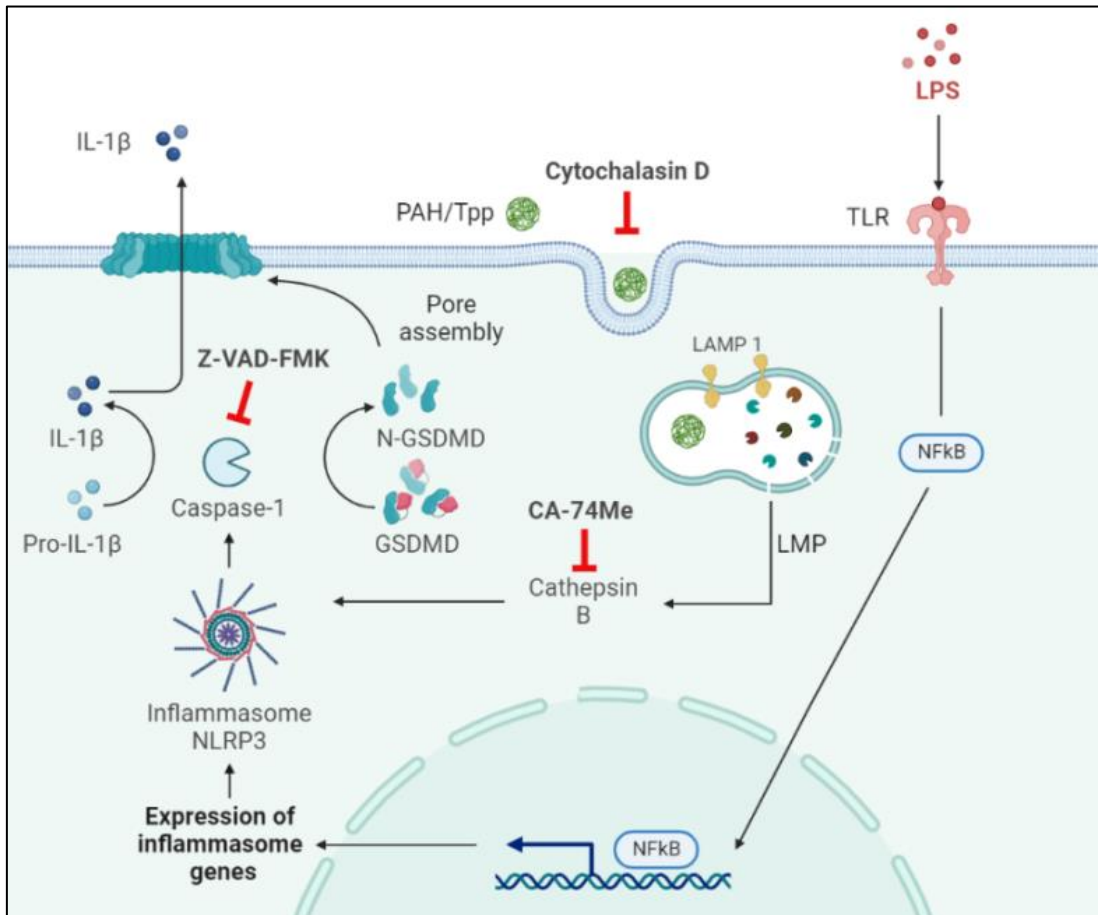


Figura 30: Mecanismo de activación de la Np. Se produce la internalización de la Np, la desestabilización del fagolisosoma con la siguiente liberación de cathepsina B al medio intracelular para la posterior activación del inflammasoma NLRP3 a través de la vía canónica. La caspasa-1 cliva la pro-IL-1β, pro-IL-18 (no se muestra en el gráfico) y gasdermina D para inducir la secreción de las citoquinas pro-inflamatorias a través de los poros de gasdermina.

CAPÍTULO 2

**Caracterización *in vivo* de Np-PAH/Tpp y
de su poder adyuvante**

Introducción

Durante largas décadas la investigación y el desarrollo de adyuvantes han sido principalmente empíricos, pero en décadas recientes el mejor conocimiento de la respuesta inmune, y en especial de la inmunidad innata, han impulsado marcadamente el diseño y desarrollo de los mismos. A finales de la década de 90, los trabajos de Janeway y Medzhitov revelaron como los receptores tipo toll o TLR, detectan componentes conservados y vitales únicamente producidos por microorganismos (MAMP, PAMP y DAMP). Estos receptores al tener contacto con su ligando producen la activación celular, principalmente en células presentadoras de antígeno induciendo un proceso inflamatorio, y termina en una estimulación de células T y B antígeno específica. En la década posterior al descubrimiento de los TLR, se demostró que otros PRR innatos como RIG-1 (*retinoic acid-inducible gene 1*), STING (*Stimulator of Interferon Genes*) y NLR (*Nucleotide-binding Oligomerization Domain (NOD)-Like Receptor*) como el inflamosoma NLRP3 descrito en el capítulo anterior, representan una parte central en la inducción de la respuesta inmune. Debido a ello, los ligandos de estos receptores también se están investigando como posibles adyuvantes de vacunas sistémicos o mucosales^{21,24}.

Asimismo, también se los está explorando en diferentes estrategias de inmuno intervención que van más allá de prevenir un proceso infeccioso a través de las vacunas profilácticas. Se trata de vacunas terapéuticas o inmunoterapias dirigidas a revertir las alergias, enfermedades tumorales y enfermedades autoinmunes, donde la inmunidad adaptativa B y T-dependiente son centrales.

Los inmunógenos recombinantes o altamente purificados se emplean muy frecuentemente en diferentes tipos de vacunas. Estos inmunógenos carecen con frecuencia de PAMP, lo que significa que carecen de la capacidad para activar a la respuesta inmune innata. Es por ello que su aplicación en procesos inmunoestimulatorios requiere de la co-administración de adyuvantes capaces de activar o potenciar la inmunidad innata para luego inducir una inmunidad adaptativa

específica ¹⁵². Además, si se trata de procedimientos de inmunointervenciones mucosales, se requiere vehículos que los mantenga en su forma biológicamente activa y los dirija al sitio de interés para promover la activación del sistema inmune.

En este trabajo hemos generado evidencias que las nanopartículas pueden cumplir con estas propiedades: vehículo y adyuvante. Existe bibliografía que apoya este concepto y que demuestra que este tipo de nanopartículas son capaces de generar mecanismos efectores protectores y memoria inmune ¹⁵³⁻¹⁵⁵.

Por lo tanto, la activación de la inmunidad innata permite instaurar un foco inflamatorio que promueva una inmunidad adaptativa específica y protectora, e inclusive es capaz de regular la diferenciación de células B de memoria en el centro germinal ¹⁵⁶⁻¹⁵⁸.

El mecanismo protector más importante en las vacunas para procesos infecciosos se basa en la acción de anticuerpos neutralizantes de alta afinidad. Esto requiere la activación de inmunidad T-dependiente y la generación de linfocitos T de memoria, principalmente memoria sistémica. En sitios periféricos o mucosales, las células T de memoria residente de tejido brindan una protección superior en comparación con las células T de memoria circulante ^{36,37,159}. Las células T residentes de memoria (CD45⁻CD69⁺CD62L⁻) (TRM) son poblaciones expandidas clonalmente que residen permanentemente en tejidos periféricos incluyendo mucosas, órganos linfoides y no linfoides. Se mantienen independientemente de las células T de memoria circulante y tienen la capacidad de responder rápidamente a la reexposición a antígenos específicos ³⁹. Esto determina que una propiedad adicional de las vacunas sea inducir linfocitos B y T de memoria residentes en tejidos de manera de controlar más eficientemente procesos infecciosos o no infecciosos que ocurren en las mucosas ¹⁶⁰⁻¹⁶².

Por lo tanto, es fundamental al momento de diseñar vacunas mucosales comprender los mecanismo por los cuales los adyuvantes pueden generar memoria sistémica y mucosal ¹⁶³.

En este contexto, y con el objetivo de profundizar la caracterización de las propiedades biológicas de las nanopartículas, investigamos su capacidad de potenciar la inducción de la respuesta inmune cuando son empleadas como vehículo y adyuvante junto a un inmunógeno.

Objetivo

Caracterización *in vivo* de las nanopartículas PAH/Tpp: Determinar su distribución tisular frente a diferentes vías de administración sistémica y mucosal y caracterizar los mecanismos inmunes inducidos en ratones.

Resultados

1. Poder adyuvante de las nanopartículas al administrarlas por vía sistémica

Para investigar si las nanopartículas de PAH/Tpp de 200 nm caracterizadas en el capítulo anterior, podrían tener la capacidad de aumentar y/o mejorar la respuesta inmune hacia un inmunógeno empleamos como antígeno de concepto a la ovoalbúmina bovina (OVA EndoFit™) libre de LPS.

En primera instancia, se evaluó la presencia de LPS en los componentes utilizados para la formulación de las nanopartículas (PAH y Tpp). Empleando la línea celular reportera HEKTLR4, la cual sobre-expresa el TLR4 y secreta la enzima fosfatasa alcalina (SEAP) cuando se activa la vía, evaluamos la actividad enzimática en el sobrenadante de cultivo al exponer la línea celular al componente a analizar. Observamos niveles similares en el control de medio, PAH, Tpp y Np (Fig. 31A). Posteriormente evaluamos el porcentaje de encapsulación de OVA ($pI=5.51$)¹⁶⁴ por las Np, y encontramos que cuando se formula Np-OVA con 100 $\mu\text{g/mL}$ de proteína final se encapsuló cerca de un 40% de proteína (Fig. 31B).

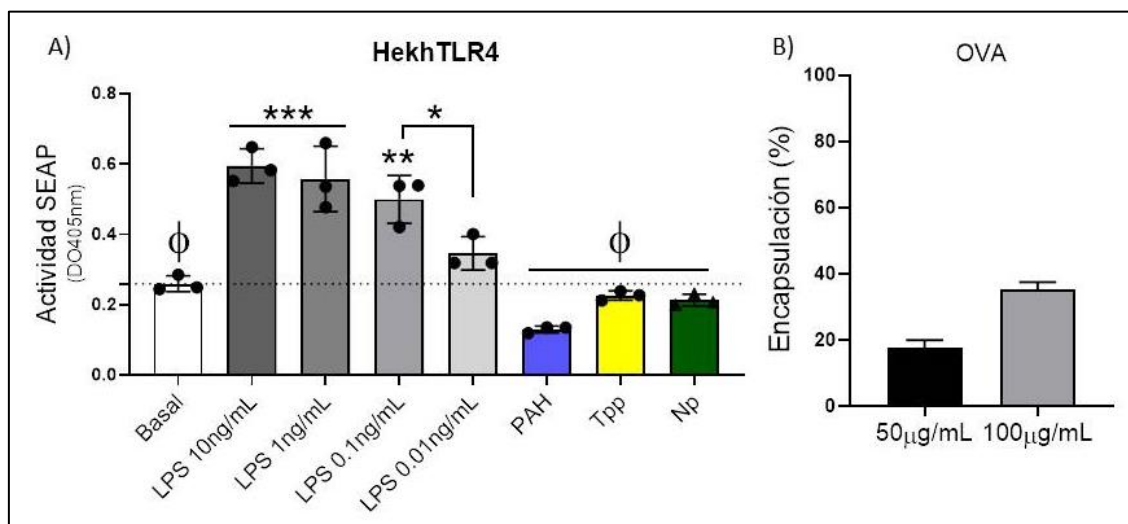


Figura 31: Análisis de la presencia de LPS en la Np y sus componentes y el porcentaje de encapsulación de OVA por las Np. A) Medida de actividad de la fosfatasa alcalina (SEAP) en sobrenadante de cultivo de HekhTLR4 con distintas concentraciones de LPS y los principales componentes de las Np y OVA. B) Porcentaje de encapsulación de la proteína OVA por las Np. Las distintas condiciones experimentales se llevaron a cabo por triplicado, se grafica la media con su desviación estándar (ANOVA * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$, $\Phi P < 0.05$ en comparación con los estímulos de LPS).

Luego de descartar la presencia de LPS en las soluciones a utilizar, se procedió a la formulación de la Np con OVA (Np-OVA) para luego administrarla por vía intraperitoneal. Ratones Balb/c de 5 semanas de edad recibieron 200 μ L de la solución que contenía 100 μ g de OVA por dosis. Para evaluar el poder adyuvante de las Np se incluyeron lotes control: Alum+OVA para comparar con un adyuvante conocido como el hidróxido de aluminio, y OVA para comparar con la respuesta basal frente al inmunógeno. En la Figura 32A se incluye el esquema del protocolo de inmunización aplicado.

El monitoreo del peso de los animales mostró que no se redujo durante todo el procedimiento (Fig. 32A). Para evaluar la respuesta humoral IgG específica se realizaron ELISA indirectos sensibilizando las fases sólidas con polímero PAH, Np, OVA y Np-OVA (Fig. 32B). Se observó que los animales inmunizados con Np-OVA solo produjeron anticuerpos específicos para OVA; no se detectaron IgG específica de PAH o Np. Al analizar la respuesta OVA-específica en los diferentes lotes observamos que los animales que recibieron Np-OVA o Alum+OVA presentaron niveles estadísticamente superiores a los que recibieron sólo OVA (Fig. 32C). Finalmente, el análisis de los isotipos específicos de OVA reveló niveles de IgG2a específicos significativamente aumentados en comparación con los niveles de IgG1 específicos en animales inmunizados con Np-OVA (Fig. 32D).

Estos resultados indican que la administración de Np-OVA mejora la respuesta de anticuerpos específicos al comparar con animales que sólo recibieron el inmunógeno; asimismo la respuesta de IgG específica fue similar al emplear Np-OVA o Alum+OVA, aunque la distribución de isotipos específicos favorece una respuesta Th1-dependiente en los animales que recibieron Np-OVA.

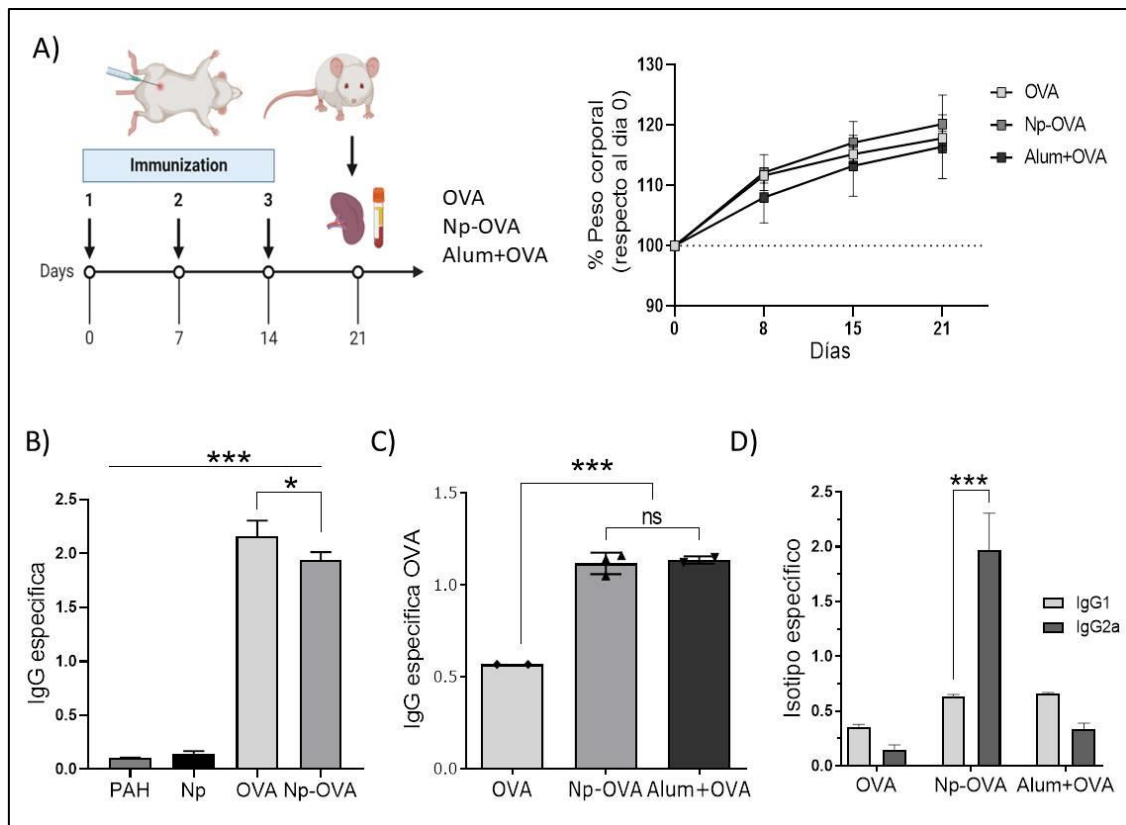


Figura 32: Respuesta humoral luego de inmunización sistémica empleando Np-OVA. A) Esquema de inmunización por vía intraperitoneal con una concentración final de 500 µg/mL de OVA, (n=5 ratones Balb/c por condición) y monitoreó del peso. B) Detección por ELISA de IgG específica en suero de animales inmunizados con Np-OVA, la placa de ELISA se sensibilizó con las siguientes condiciones: PAH, Np, OVA o Np-OVA. C) Detección por ELISA de IgG específica de OVA en suero de animales provenientes de los lotes OVA, Np-OVA y Alum+OVA y D) IgG1 e IgG2a OVA específica en los distintos animales inmunizados. Las distintas condiciones experimentales se llevaron a cabo por triplicado, se grafica la media con su desviación estándar (ANOVA* $P < 0.05$; *** $P < 0.001$).

Para profundizar el estudio de la respuesta inmune específica se evaluó la secreción de las citoquinas Th1 y Th2 (mIFN- γ , mL-5 e mL-13) en esplenocitos expandidos con OVA durante 72 horas. Se puede observar en la Figura 33A que los cultivos de esplenocitos de los animales que fueron inmunizados con Np-OVA produjeron niveles significativamente superiores de mIFN- γ en comparación con esplenocitos de animales que recibieron OVA o Alum+OVA. El análisis de las citoquinas Th2, mL-5 e mL-13, mostro que los lotes que recibieron OVA o Np-OVA secretaron cantidades menores que las células provenientes de animales inmunizados con Alum+OVA, sin embargo no se encontró una diferencia significativa (Fig. 33B). Posteriormente, analizamos por citometría de flujo intracitoplasmática la presencia de

linfocitos T esplénicos CD4⁺ o CD8⁺ productores de mIFN- γ . Hallamos mayores frecuencias de linfocitos T CD4⁺IFN- γ ⁺ y LT CD8⁺IFN- γ ⁺ en bazos de ratones inmunizados con Np-OVA (P<0.001) en comparación a los que recibieron OVA o Alum+OVA (Fig. 33C y D).

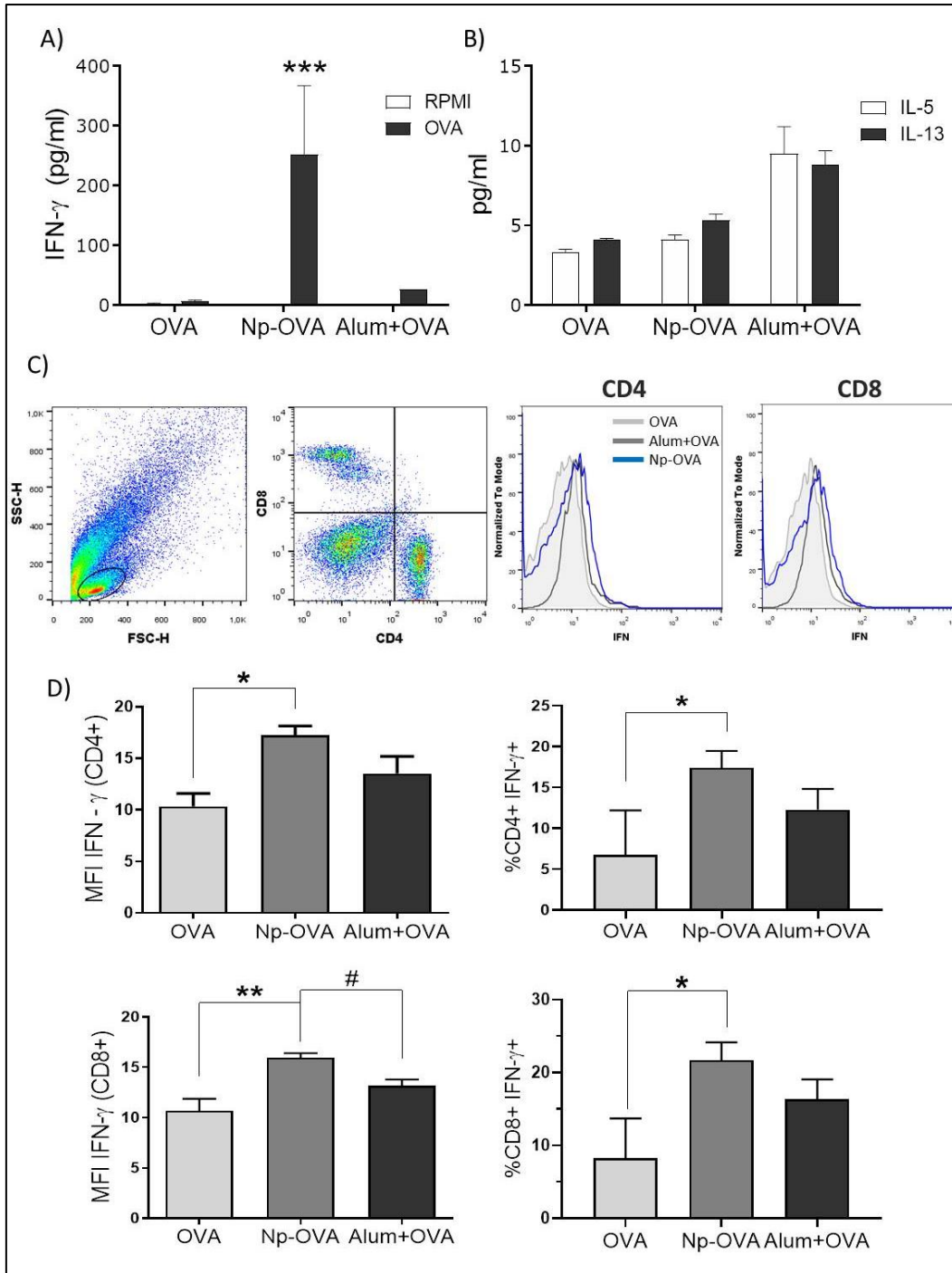


Figura 33: Respuesta celular en ratones inmunizados por vía intraperitoneal con Np-OVA. Cuantificación de A) mIFN- γ y B) mL-5 e mL-13 en el sobrenadante de cultivo de esplenocitos luego de 72 horas de estímulo con OVA por ELISA. C) Citometría de flujo y estrategia de gates

para seleccionar las poblaciones de linfocitos T $CD4^+IFN-\gamma^+$ y $CD8^+IFN-\gamma^+$, con la representación y comparación de los histogramas. D) Frecuencia de linfocitos $CD4^+IFN-\gamma^+$ y $CD8^+IFN-\gamma^+$ e intensidad de fluorescencia media (MFI). Las distintas condiciones experimentales se llevaron a cabo por duplicado, se grafica la media con su desviación estándar. (ANOVA* $P<0.05$; ** $P<0.01$; *** $P<0.001$. t-Student # $P<0.05$).

Por lo tanto, estos resultados en conjunto indican que las Np inducen una activación de la inmunidad adaptativa dependiente de linfocitos T con un perfil Th1. Pero además, estos hallazgos confirman lo mostrado en el capítulo anterior donde se evidenció que las Np es fagocitada e induce la ruptura del lisosoma con la siguiente liberación del contenido, entre ellas las enzimas activadoras del inflammasoma y probablemente Np y OVA⁶⁵. El hecho de que OVA (inmunógeno extracelular) pueda ser liberada al citosol y que observemos expansión de linfocitos T $CD8^+$ solo se puede explicar por mecanismos de presentación cruzada de antígenos¹⁶⁵. Probablemente estas Np poliméricas de PAH inducen por sí solas la presentación cruzada en macrófagos y células dendríticas.

En conjunto, estos hallazgos nos permiten plantear la hipótesis del empleo de este adyuvante en la formulación de **vacunas preventivas** para procesos infecciosos originados por microorganismos bacterianos o virales, donde se requiere inmunidad humoral con anticuerpos IgG bloqueantes e inmunidad celular IFN- γ -dependiente o en **vacuna terapéuticas** para enfermedades alérgicas, donde se requiere la inmunomodulación de procesos inflamatorios mucosales tipo 2 mediante una inmunidad IFN- γ -dependiente y anticuerpos IgG bloqueantes, o para procesos tumorales, donde se requiere inmunidad anti-tumoral CD8 e IFN- γ -dependiente además de IgG para citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos.

2. Empleo de Np-OVA como vacuna mucosal

2.1 Administración intranasal

Para emplear las Np como vehículo que proteja al inmunógeno en una vacuna mucosal, evaluamos en primera instancia su integridad en estos tejidos donde las condiciones fisicoquímicas son más adversas y predominan mecanismos de degradación, en comparación con la vía sistémicas. Además, empleando Np

fluorescente, evaluamos la capacidad de las Np de distribuirse en órganos o tejidos comprometidos y necesarios para montar una respuesta inmune.

2.1.1 Distribución tisular de las nanopartículas

Los animales recibieron 40 μ L de Np-FITC por instilación nasal y luego de 30, 60, 90 y 120 minutos post-administración se extrajeron los siguientes tejidos: mucosa nasal, ganglios cervicales y mediastínicos y tejido pulmonar. El análisis de la fluorescencia por citometría de flujo (Fig. 34A) mostró que a tiempos cortos (30 y 60 minutos) las Np-FITC se mantienen íntegras en la mucosa nasal y en ganglios cervicales. A los 60 minutos todavía se mantiene en ganglios cervicales (sitio inductivo de la mucosa respiratoria), mientras que a los 120 minutos se detectaron células fluorescentes en ganglios mediastínicos y tejido pulmonar, en una población celular restringida. Dado que la PAH-FITC no ingresa a las células, el hecho de observar células fluorescentes indica que las Np-FITC fueron internalizadas. Estos resultados demuestran que las Np son resistentes al pasaje a través de la mucosa respiratoria y alcanzan los bronquios en estado nativo, o que son transportadas por células. El hecho de que se encuentren en células de los ganglios regionales indica que probablemente las mismas tengan la capacidad de activar células de la inmunidad adaptativa.

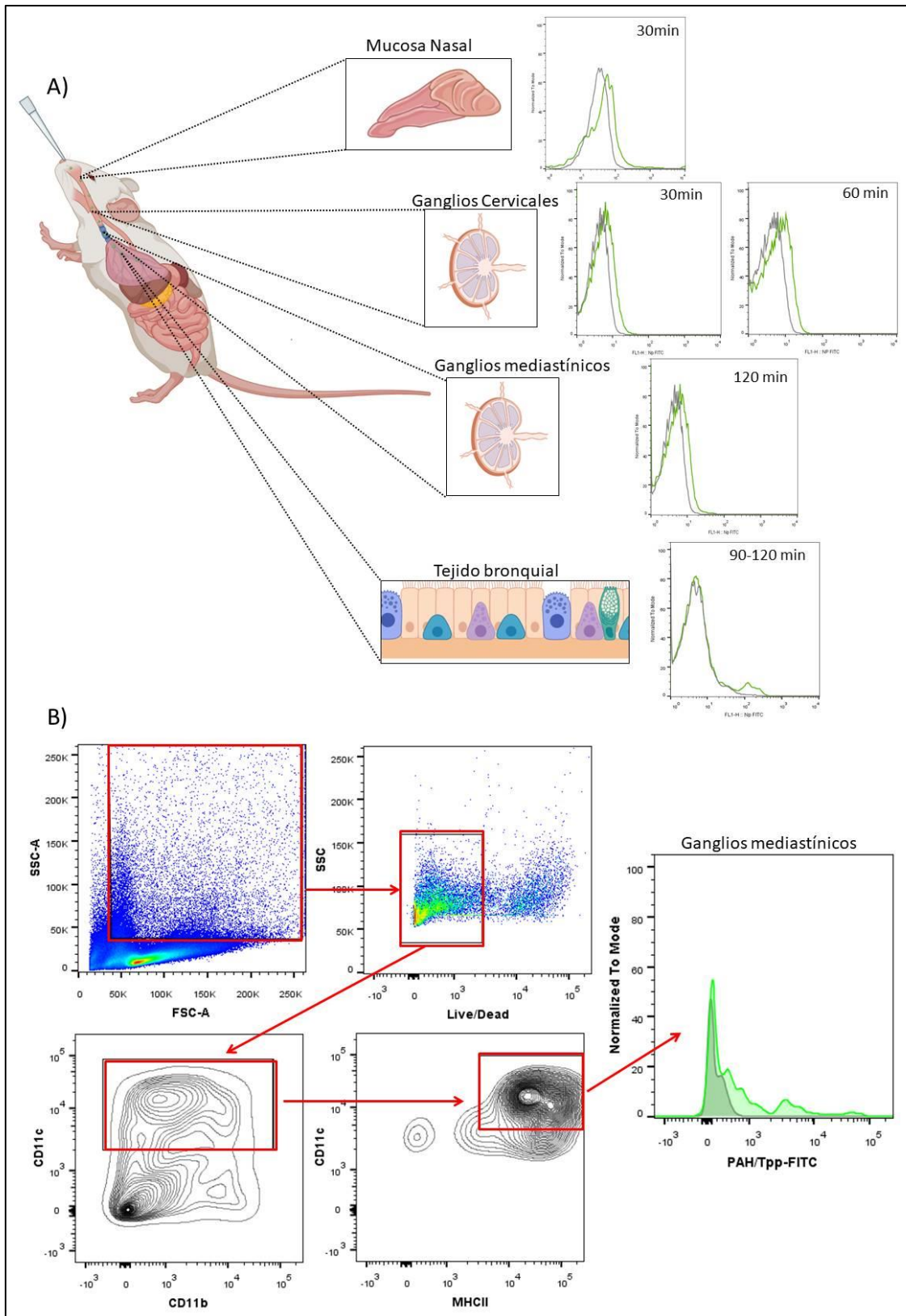


Figura 34: Monitoreo de la fluorescencia de Np-FITC administradas por la vía intranasal. A) Esquema de administración por instilación y análisis de diferentes tejidos y órganos a distintos tiempos por citometría de flujo luego 30, 60, 90 y 120 minutos post inoculación. En los histogramas las curvas grises corresponden al control y las curvas verdes a los inoculados con

Np-FITC. B) Análisis de la frecuencia de células CD11c⁺CD11b⁺MHCII⁺ con presencia de Np-FITC por citometría de flujo, se indica la estrategia de gates.

En el capítulo anterior demostramos como las Np pueden activar células dendríticas e inducir la expresión de CD86. Existe en la literatura clara evidencia que la activación se acompaña de una mayor capacidad migratoria de las células desde tejidos periféricos (células dendríticas inmaduras) a órganos linfoides secundarios (células dendríticas maduras). En el experimento de tracking de la Np-FITC analizamos por citometría de flujo la fluorescencia en la población celular CD11c⁺CD11b⁺MHCII⁺ presentes en los ganglios mediastínicos a los 120 minutos (Fig. 34B). El hallazgo de células fluorescentes en estos órganos nos permite suponer que las Np-FITC que se absorben en la mucosa nasal, migran a los ganglios submaxilares a través de las células dendríticas y de ahí a los ganglios mediastínicos, o alternativamente, las Np-FITC resisten el pasaje hasta los bronquios y en ese tejido son traslocadas para dirigirse a los ganglios mediastínicos transportadas por las células dendríticas⁵⁰.

2.1.2. Administración intranasal y poder adyuvante de las nanopartículas

Para evaluar la capacidad carrier y adyuvante de las nanopartículas, se administraron Np-OVA por vía intranasal a ratones Balb/c por instilación en cada narina de 20 µL de solución de Np conteniendo 10 µg de OVA por dosis. Se empleó como lote control animales que recibieron únicamente OVA.

En la Figura 35A se muestra el esquema con el protocolo de inmunización y el monitoreo del peso durante el proceso.

Previo al sacrificio, se midió la respuesta de hipersensibilidad retardada o DTH para evaluar la respuesta celular *in vivo* a las 48 horas post exposición al antígeno. En este caso se inyectó una solución de 20 µg de OVA y solución salina como control, por vía subcutánea en los pulpejos de las patas traseras derecha e izquierda respectivamente. Luego de 48 horas se midió el grosor de las patas con un calibre y se comparó la inflamación de la pata que recibió el antígeno con la que recibió la solución salina. Si bien no existe una diferencia significativa, se pudo observar una tendencia en el aumento en aquellos ratones que fueron inmunizados con Np-OVA (Fig. 35B). Para

estudiar la respuesta celular *in vitro* se cuantificó mIFN- γ en el sobrenadante del cultivo de esplenocitos estimulados con OVA. Detectamos niveles significativamente superiores en aquellos animales que recibieron Np-OVA con respecto a los que recibieron únicamente OVA. Además, se cuantificaron mL-5 e mL-13 y no observamos diferencias significativas al comparar los sobrenadantes de esplenocitos provenientes de ratones que recibieron OVA o Np-OVA. Las células estimuladas *in vitro* con Np no mostraron niveles de mIFN- γ con respecto a las células sin estimular (Fig. 35C). Finalmente, en la Figura 35D se muestran los resultados de la respuesta humoral específica al analizar diferentes isotipos en suero, lavado broncoalveolar (BAL) y saliva. Encontramos niveles aumentados de IgG específica a OVA en suero ($p < 0.001$) y en BAL ($p < 0.05$) de animales que recibieron Np-OVA, mientras que la IgA específica en saliva y en BAL mostró una tendencia al aumento en animales que recibieron Np-OVA respecto a los que sólo recibieron OVA.

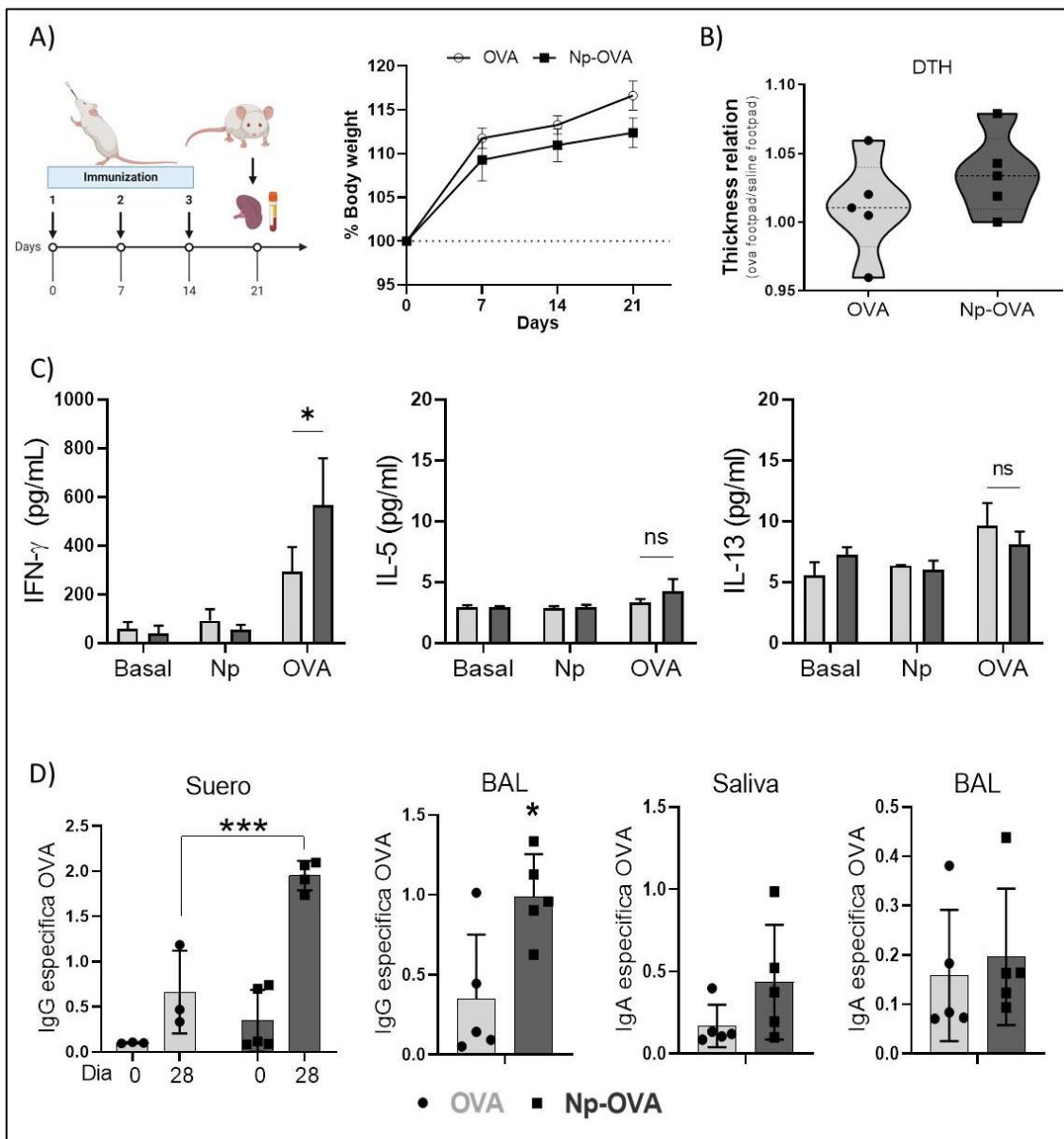


Figura 35: Análisis de la inmunidad humoral y celular en ratones inmunizados con Np-OVA por la vía intranasal. A) Esquema de inmunización con $n=5$ ratones Balb/c por condición, 20 μg de OVA en 40 μL finales (OVA 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$). B) Medida de DTH luego de 48 horas. C) Respuesta celular, cuantificación de $m\text{IFN-}\gamma$, $m\text{IL-5}$ e $m\text{IL-13}$ mediante ELISA en el sobrenadante de cultivo de esplenocitos luego de 48 horas de estímulo con OVA. D) Cuantificación de IgG e IgA específicos por ELISA en suero, lavado broncoalveolar (BAL) y saliva. (ANOVA* $P<0.05$; ** $P<0.01$; *** $P<0.001$).

2.1.3. Análisis de la frecuencia de linfocitos T de memoria residentes de tejido

Como parámetro para evaluar la memoria inmune determinamos la frecuencia de linfocitos T residentes de tejido^{39,166}.

Para ello, aplicamos un protocolo de inmunización intranasal ligeramente modificado (2 dosis separadas por 15 días) donde se combinaron las vías sistémica o intraperitoneal (IP) con la intranasal (IN). Como control se inocularon animales con 2 dosis IP de Np-OVA. Dos días antes del sacrificio se realizó una inmunización por la vía intranasal sólo con OVA (boost) (Fig. 36A).

El análisis de la inmunidad humoral y celular bajo este protocolo de inmunización reveló niveles séricos de IgG específicos de OVA significativamente superiores en ratones que recibieron el esquema IP+IN con respecto a IP+IP, o en comparación con los animales sin inmunizar. Además, se observa un valor superior de IgG específica luego de la segunda dosis ($p < 0.001$). Al analizar los isotipos específicos, nuestros hallazgos indican que la administración combinada de Np-OVA por la vía sistémica o combinada generan una respuesta Th1-dependiente con IgG2a específica significativamente mayor que IgG1 específica. Notablemente, la combinación de las vías sistémica y mucosal arrojó los mayores valores de IgG2a ($p < 0.05$). Al analizar la presencia de IgG específica en BAL también detectamos que la combinación de vías indujo valores significativamente mayores de IgG e IgG2a específica con respecto a la vía sistémica o IgG1 (Fig. 36B). Finalmente, los niveles de IgA específica de OVA en BAL fueron mayores en el esquema de combinación de vías con respecto a la vía sistémica ($p < 0.01$).

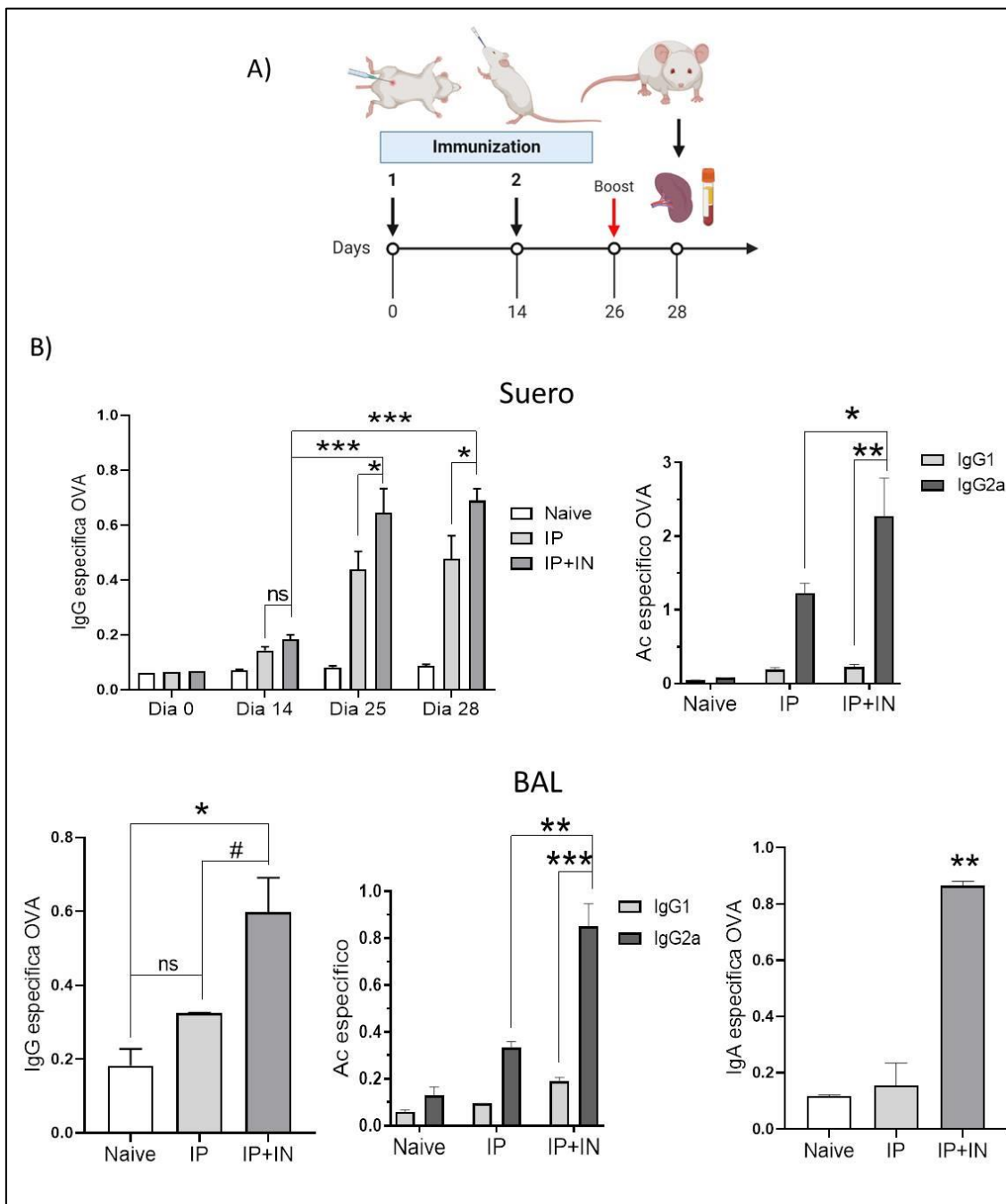


Figura 36: Respuesta inmune humoral en ratones Inmunizados por las vías sistémica y/o mucosal con Np-OVA. A) Esquema del protocolo de inmunización ($n=5$ ratones Balb/c por condición). B) Cuantificación por ELISA de los niveles de IgG, IgA, IgG1 e IgG2a específicos de OVA en suero y en BAL. (ANOVA* $P<0.05$; ** $P<0.01$; *** $P<0.001$. t-Student $p\#<0.05$).

Habiendo corroborado la inducción de inmunidad mucosal y que se logró una mayor eficiencia combinando vías procedimos al análisis de linfocitos T de memoria residente en pulmón. Para este experimento aplicamos un procedimiento que nos permitió evidenciar estas células en la mucosa bronquial. A los minutos previos al

sacrificio se depletaron las células CD45⁺ mediante la inoculación intravenosa de anticuerpos anti-CD45 de ratón. Empleamos ascitis conteniendo dichos anticuerpos monoclonales para eliminar aquellas células CD45⁺ en circulación. El entrecruzamiento de CD45 en ausencia de los TCR induce la muerte celular¹⁶⁷. Con la suspensión de células de pulmón se incubó con un anticuerpo anti Alexa-fluor-647 de ratón. En la Figura 37A se muestra la estrategia de gates, seleccionando células CD45 negativas residentes de pulmón. Para evaluar la frecuencia de las diferentes subpoblaciones T de memoria se combinó CD4, CD8 y CD45 con las marcas de superficie CD69 (característico de células residentes de tejido) y CD62L (las células de residentes son CD62L⁻). Por lo tanto, definimos las TRM de pulmón como CD4⁺CD45⁻CD69⁺CD62L⁻ y CD8⁺CD45⁻CD69⁺CD62L⁻. En la Figura 37B se muestra la frecuencia hallada de estas poblaciones de TRM en animales que recibieron los distintos esquemas de inmunización. Hallamos un aumento significativo de TRM CD4⁺ y CD8⁺ en los ratones que recibieron Np-OVA en el esquema combinado IP+IN en comparación con la administración sistémica.

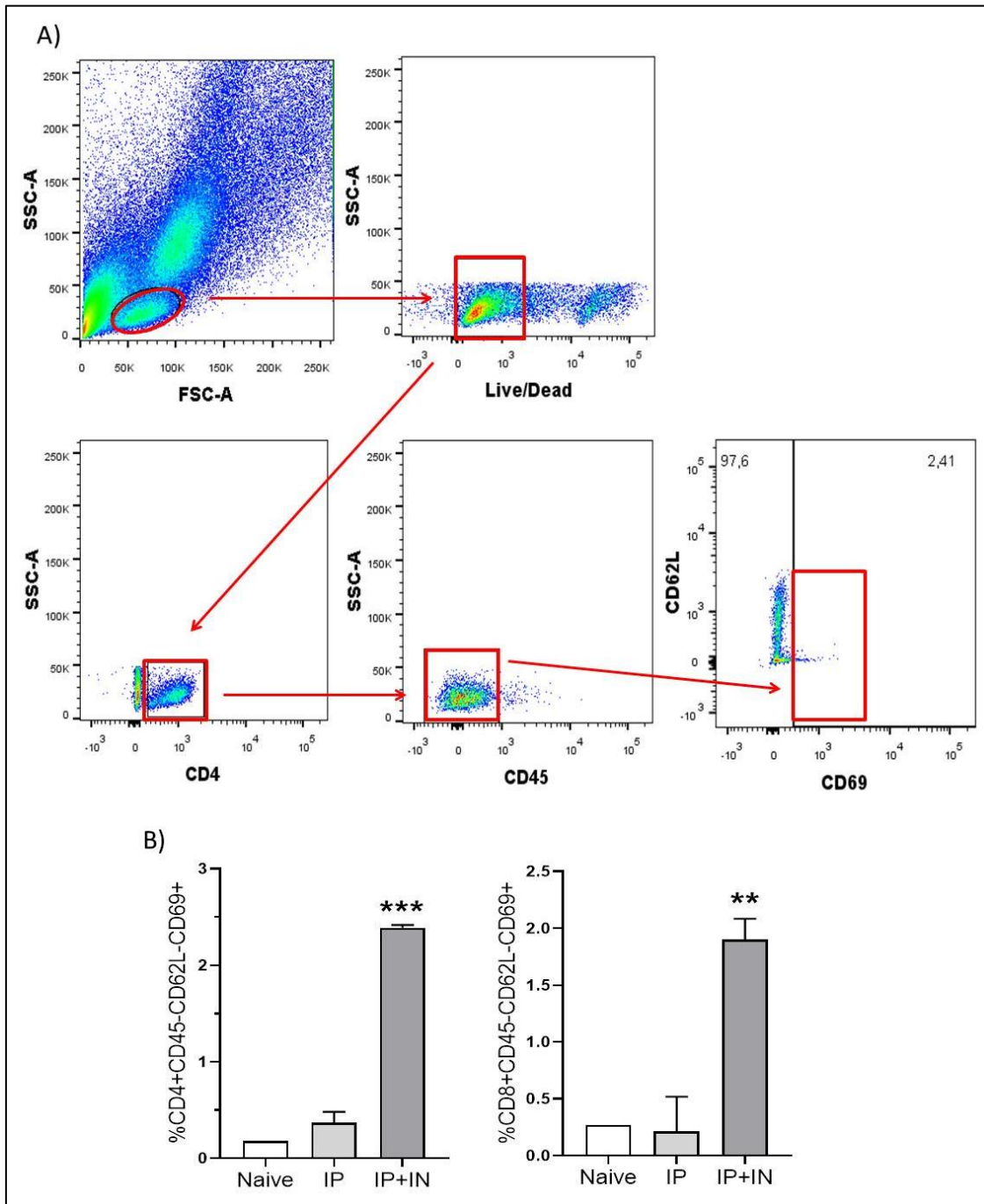


Figura 37: Análisis de la frecuencia de linfocitos T residentes de tejido en pulmón. A) Estrategias de gates por citometría de flujo para seleccionar linfocitos T de memoria residentes $CD4^+CD45^-CD69^+CD62L^-$ y $CD8^+CD45^-CD69^+CD62L^-$. B) Cuantificación de la frecuencia de los TRM. (ANOVA* $P<0.05$; ** $P<0.01$; * $P<0.001$)**

Estos hallazgos indican que el empleo de la vía intranasal combinada con la sistémica indujo un marcado aumento de linfocitos de T de memoria residentes en pulmón, junto a IgG e IgA específicos, además de mediadores sistémicos de inmunidad humoral y celular. Estos resultados en su conjunto nos permiten confirmar que las nanopartículas presentan propiedades adecuadas como vehículos y adyuvantes que las hace aptas para ser empleadas en procedimientos de inmuno intervención sistémicos e intranasales específicos del inmunógeno.

2.2 Administración intragástrica

2.2.1 Distribución tisular de las nanopartículas

En forma similar al tracking intranasal, empleamos Np-FITC para monitorear la integridad y distribución tisular en el tracto gastrointestinal de las Np luego de ser administrada por la vía intragástrica a las 2, 4 y 6 horas post administración en distintas porciones y compartimentos intestinal, y en órganos linfoides secundarios.

En la Figura 38 se muestra el esquema de administración, órganos y tejidos analizados a distintos tiempos. En este ensayo encontramos fluorescencia en el compartimento epitelial del intestino a las 2 horas (duodeno); a las 4 y 6 horas se evidenció un aumento de la fluorescencia en la lámina propia del duodeno, y en los ganglios mesentéricos y en las Placas de Peyer.

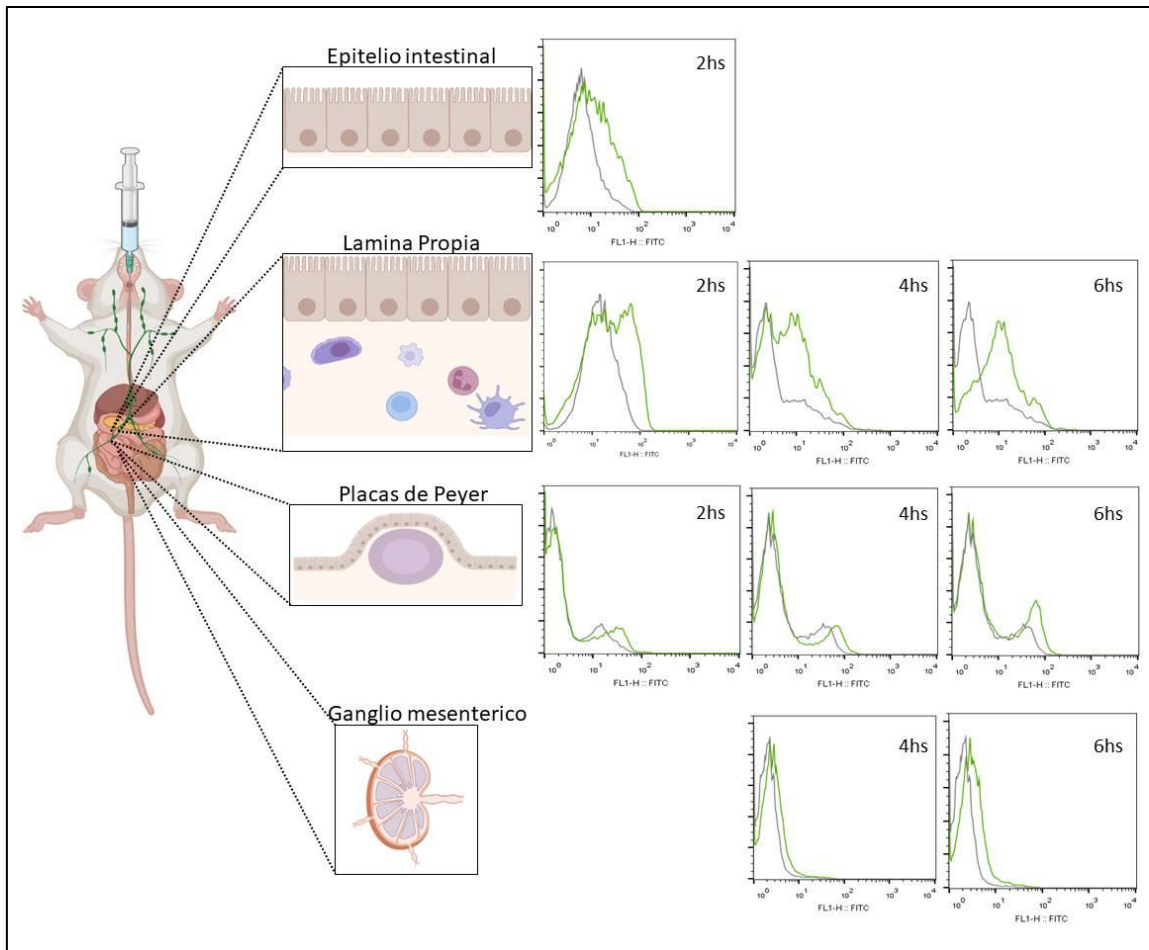


Figura 38: Monitoreo de la fluorescencia en distintas porciones del tracto gastrointestinal de ratones que recibieron Np-FITC por la vía intragástrica. Se analizó la fluorescencia por citometría de flujo luego de 2, 4 y 6 horas post inoculación ($n=2$ ratones Balb/c por condición). Los histogramas grises corresponden al control y los histogramas verdes a los inoculados con Np-FITC.

Asimismo, se detectaron células dendríticas $CD11c^+CD11b^+MHCII^+ FITC^+$ en ganglio linfáticos mesentéricos (MLN) luego de 4 horas de la administración intragástrica (Fig. 39).

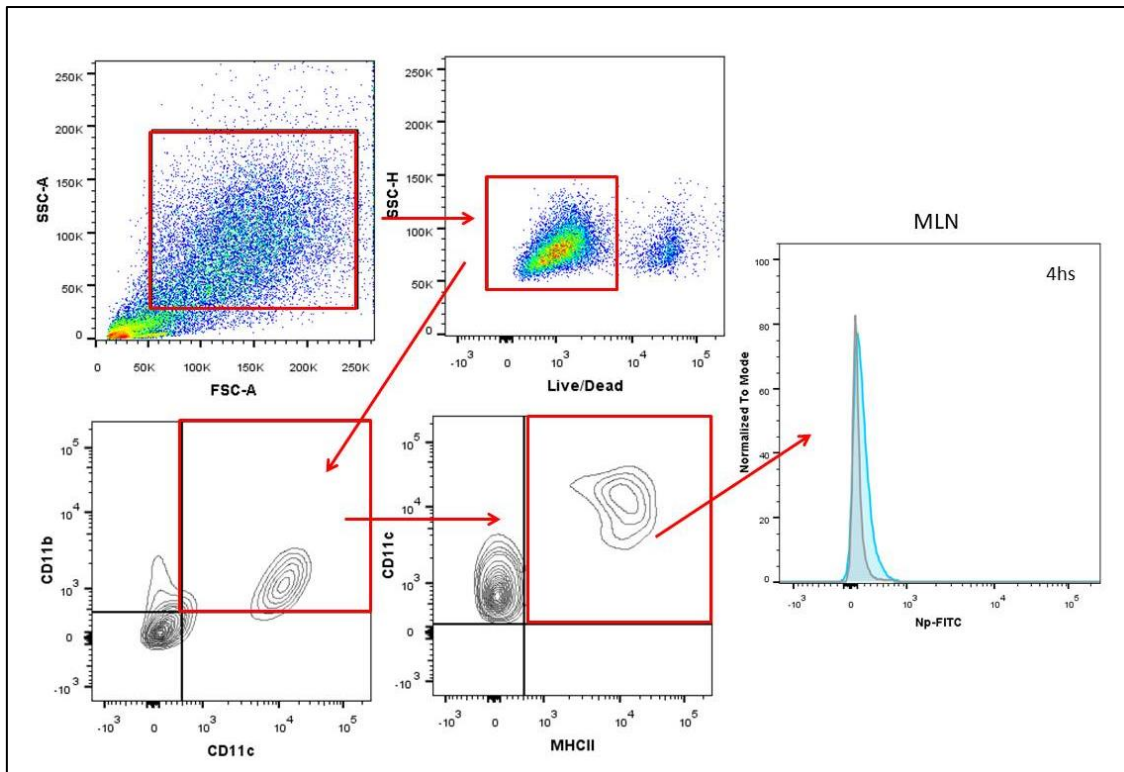


Figura 39: Monitoreo de macrófagos y células dendríticas en el tracto gastrointestinal post administración de Np-FITC por la vía intragástrica. Estrategia de gate por citometría de flujo para células dendríticas $CD11c^+CD11b^+MHCII^+$ en ganglios linfáticos mesentéricos, histograma con curva gris animales control y celeste luego de las 4 horas de inoculación (MLN).

Estos resultados indican que las Np mantienen su integridad en el tracto gastrointestinal llegando a órganos linfoides secundarios y Placas de Peyer, además se distribuyen en los sitios inductivos y efectores mucosales.

2.2.2 Administración intragástrica y poder adyuvante de las nanopartículas

Con la finalidad de demostrar el poder adyuvante de las Np por la vía intragástrica se administraron Np-OVA u OVA como control (100 μ g de OVA en 200 μ L de solución) una vez por semana durante tres semanas, agrupados en dos lotes de ratones. Se monitoreó el peso de los animales semanalmente y se evaluó la respuesta humoral y celular (Fig. 40A). Se pudo observar que los animales aumentaron de peso durante el protocolo de inmunización y hallamos un aumento de IgG e IgG2a específicos de OVA que no alcanzó la significancia estadística al comparar los lotes de ratones inmunizados con Np-OVA con OVA (Fig. 40B). La relación IgG2a/IgG1 fue mayor en los animales que recibieron NP-OVA en comparación con los que recibieron

OVA. Sin embargo, por citometría de flujo encontramos que las Np indujeron un incremento significativo de células dendríticas CD11c⁺CD11b⁺MHCII⁺CD80⁺ y CD11c⁺CD11b⁺MHCII⁺CD86⁺ en ganglios mesentéricos (MLN) y en Placas de Peyer (PP). Además, encontramos mediante el uso de la misma técnica células dendríticas en MLN con un aumento en la expresión de CD103 y CD8 α (Fig. 40C y D)

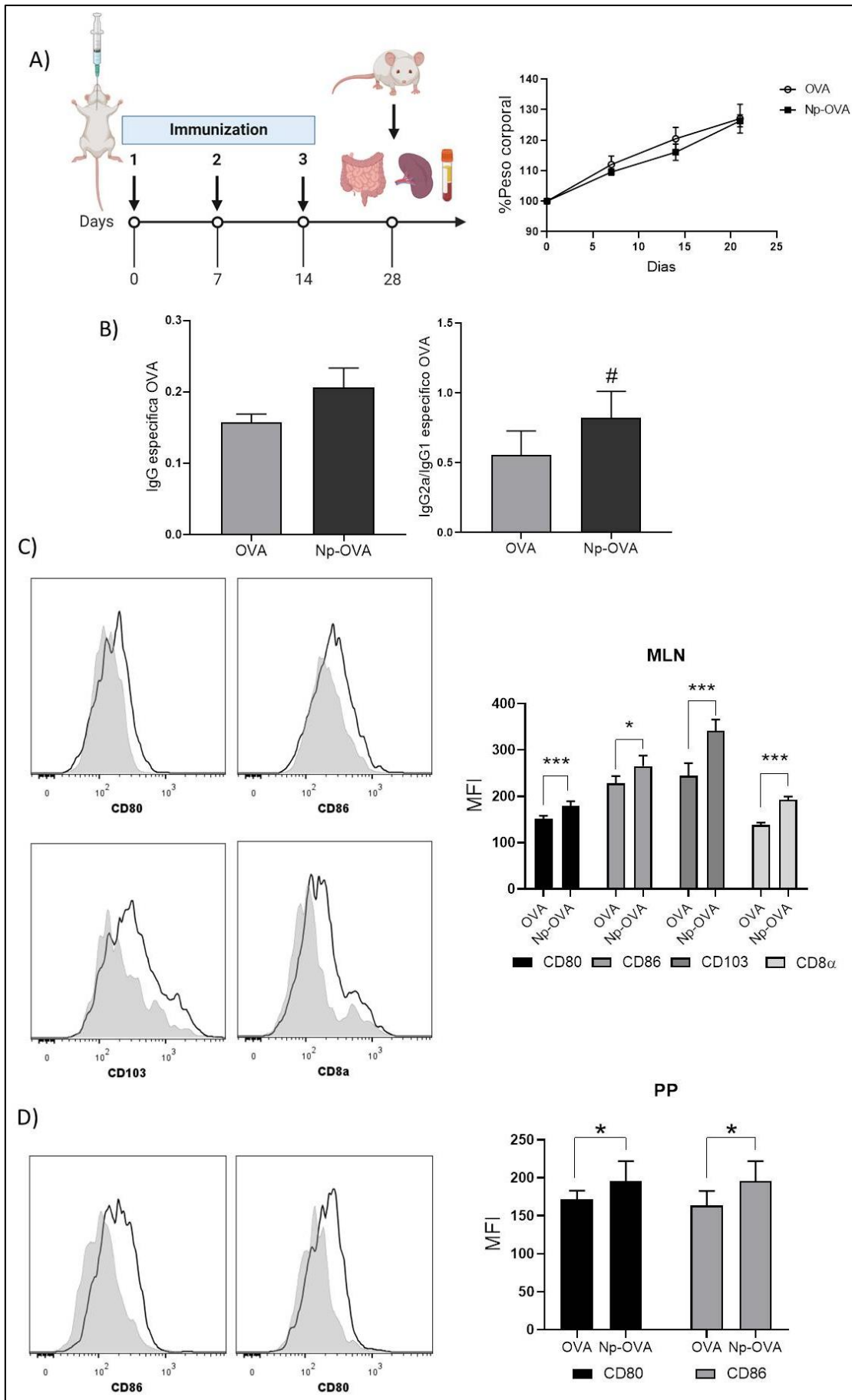


Figura 40: Inmunización intragástrica de ratones con Np-OVA y análisis de la respuesta inmune. A) Esquema de inmunización y monitoreo del peso de los animales. B) Detección de isotipos específicos de OVA en suero por ELISA. Análisis de células dendríticas en C) ganglio mesentérico (MLN) y D) Placas de Peyer (PP). (ANOVA* $P<0.05$; ** $P<0.01$; *** $P<0.001$, t-Student # $P<0.05$).

En el ganglio, las células dendríticas residentes que presentan CD8 α en superficie tienen la capacidad de estimular las células T específicas. Las CD8 α tienen como función primaria mantener la tolerancia hacia autoantígenos, pero cuando estas se activan pueden diferenciarse hacia un perfil Th1¹⁶⁸ y realizar presentación cruzada. Por otro lado, las células dendríticas que expresan CD103 en superficie tienen la capacidad de migrar desde el intestino hacia el ganglio drenante donde programan y activan células T para que migren nuevamente a la mucosa¹⁶⁹.

2.3. Administración sistémica de nanopartículas y mecanismos de inducción de la inmunidad innata

Para comprender el rol de la activación del inflamósoma NLRP3-dependiente se estudió *in vivo* la administración de Np intraperitoneal en animales C57B6 wild-type (WT) y deficientes en componentes de la vía del inflamósoma NLRP3^{-/-}, caspasa-1^{-/-} y IL-1^{-/-}.

En la Figura 41A se muestra el esquema de inmunización aplicado (50 μ g de OVA en 500 μ L de Np, 100 μ g/mL). Como control se utilizaron animales que solo fueron inmunizados con OVA. Al analizar la producción de anticuerpos séricos (Fig. 41B) observamos un aumento de IgG específica de OVA en los animales WT. Sin embargo, los animales NLRP3^{-/-} y caspasa-1^{-/-} mostraron un descenso significativo en los niveles de anticuerpos, mientras que no parece ser dependiente del IL-1R, al igual que se mostró previamente en BMDM *in vitro*.

Al analizar la inmunidad celular en estos ratones se detectó que la secreción de mIFN- γ por esplenocitos expandidos *in vitro* con el candidato Np-OVA está suprimida en ratones NLRP3^{-/-} y caspasa-1^{-/-}. Nuevamente en los ratones IL-1R^{-/-} esta citoquina no se encuentra afectada (Fig. 41C). Por lo tanto, estos resultados *in vivo* se correlacionan con los hallazgos *in vitro* en BMDM mostrados en el capítulo anterior.

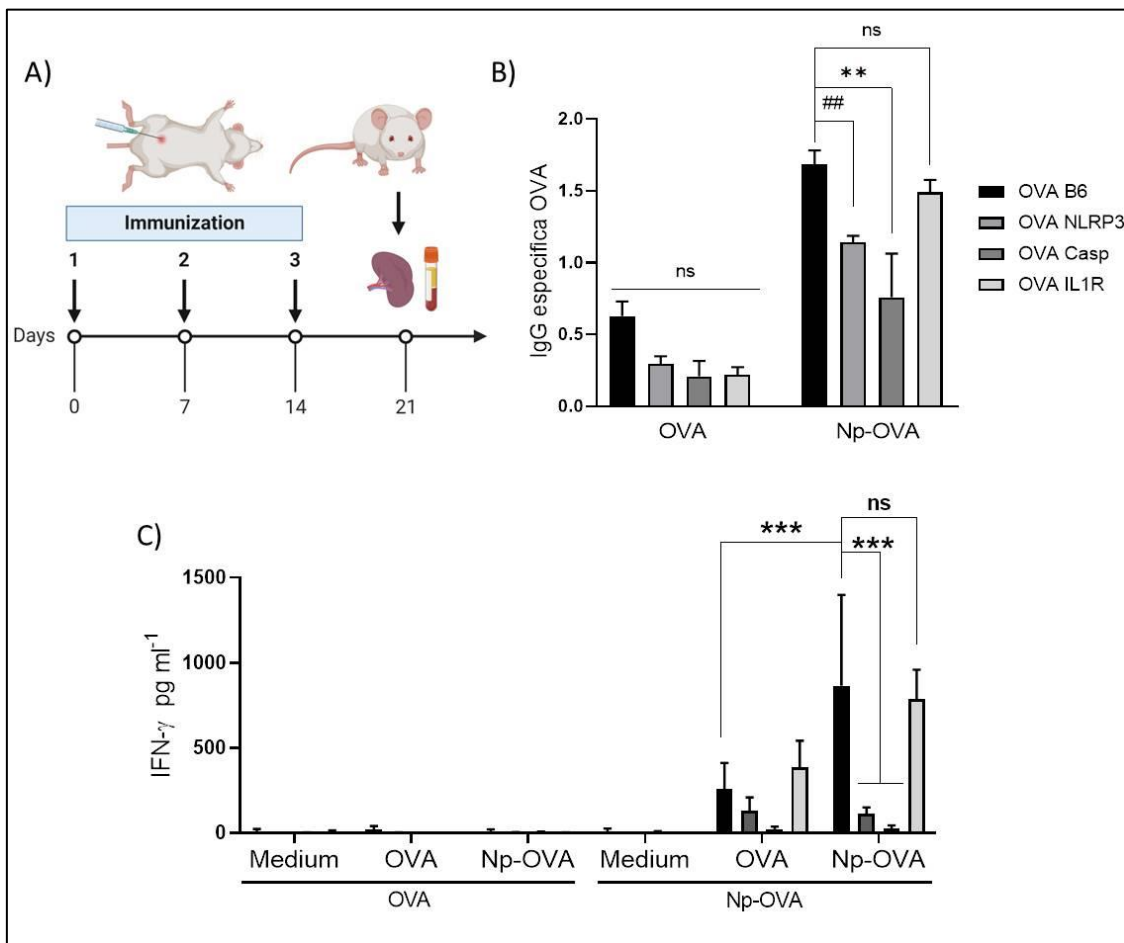


Figura 41: Inmunización de animales salvajes (C57B6) y deficientes en componentes de la vía del inflammasoma (NLRP3^{-/-}, caspasa-1^{-/-} y IL-1R^{-/-}) y análisis humoral y celular. A) Esquema de inmunización empleado. B) Detección de anticuerpos específicos de OVA en suero y C) Cuantificación de los niveles de mIFN-γ en el sobrenadante de cultivo de esplenocitos luego de 72 horas de cultivo y estimulados con OVA o Np-OVA. Las distintas condiciones experimentales se llevaron a cabo por duplicado (ANOVA* P<0.05; **P<0.01; ***P<0.001).

En conclusión, la vía de activación canónica del inflammasoma NLRP3 mediante caspasa-1 está involucrada en la producción de IL-1β y la consiguiente activación de la inmunidad innata y adaptativa Th1-dependiente.

Conclusión y discusión

La literatura refleja que las vacunas más eficientes y de duración más prolongada son aquellas que estimulan el sistema inmune a través de TLR^{24,163}, como lo son la vacuna contra la fiebre amarilla (YF-17D)^{170,171} y contra la BCG^{172,173}. Dichas vacunas presentan distintos ligandos que son reconocidos por lo menos por cuatro TLR diferentes (siendo los TLR2, TLR3, TLR4, TLR7 y TLR9 los más tradicionales) y otros receptores como RIG-1, MAD-5 y CD-209. Las sales de aluminio, adyuvante más utilizado desde hace mucho tiempo en humanos, no presenta las características de la vacuna YF-17D ni de la BCG, pero puede activar la vía innata a través del NLRP3 para generar un foco inflamatorio con características más próximas a un perfil Th2¹⁵².

En nuestro trabajo demostramos que la administración de las Np junto a un inmunógeno, por vía sistémica y/o mucosal induce un aumento en la respuesta inmune específica contra el antígeno. Además, las Np logran mantener su integridad en el tráfico transmucosal y dirigen al inmunógeno a los sitios inductivos de interés en las mucosas intranasal y gastrointestinal. Estos hallazgos implican que al ser captadas por las CPA, éstas son activadas y migran a los ganglios drenantes. Posteriormente también las detectamos en los sitios efectores o lámina propia de cada mucosa. Estos resultados indican que las mismas podrían ser empleadas como vehículo y adyuvante en las formulaciones vacunales que se presentarán en el siguiente capítulo. A su vez, las Np no indujeron respuesta humoral o celular específica contra ellas mismas, ni contra el polímero empleado en su síntesis. La activación de la inmunidad innata por la vía del inflamosoma con la secreción de IL-1 β es dependiente del sensor NLRP3 y de caspasa-1, la cual se demostró que no sólo es importante para inducir un proceso inflamatorio, sino una inmunidad adaptativa IFN- γ -dependiente. En este trabajo no demostramos, como se ha reportado en la bibliografía que la IL-1 β secretada por las CPA actúa sobre las NK para inducir la producción y secreción de IFN- γ en estadios tempranos de su maduración, siendo este mecanismo el responsable de generar la señal 3 de diferenciación en la activación T hacia un perfil Th1^{151,174,175}.

La administración sistémica y mucosal de Np indujo la expansión linfocitos T CD8⁺ específicos y de células dendríticas CD11c⁺CD11b⁺MHCII⁺, lo cual indica que se produce una presentación cruzada de antígenos en las CPA. Aun así, nos resta confirmar que la inmunidad T CD8⁺IFN- γ ⁺ es promovida por estas células dendríticas por realizar presentación cruzada. Si bien podría ser un efecto exclusivo generado por estas subpoblaciones de células dendríticas, también podría ocurrir que las Np promueven la presentación cruzada en cualquier tipo de CPA, debido a que luego de la fagocitosis las Np promueven la desestabilización del fagolisosoma y permiten que los antígenos se transloquen al citosol por medio de la permeabilización de la membrana lisosomal (LMP) en células dendríticas y macrófagos. En este proceso también se liberan enzimas como las pertenecientes a la familia de las catepsinas, siendo una de ellas, catepsina B la responsable de activar el inflamosoma. Específicamente deberíamos confirmar que la desestabilización del lisosoma que contiene a las Np-OVA, liberan a la OVA al citosol para que sea procesado y presentado en el contexto MHC I por la vía biosintética para poder activar a los linfocitos T CD8 específicos ^{176,177}.

Además demostramos que la administración mucosal de las Np induce un aumento en la frecuencia de linfocitos TRM CD4⁺ y TRM CD8⁺ en tejido bronquial. Este hecho resulta crucial al momento de evaluar la duración de la inmunidad humoral y celular inducida por las Np administradas por vía mucosal.

Al igual que el hidróxido de aluminio, la nanopartícula PAH/Tpp tiene la capacidad de activar el inflamosoma NLRP3. Sin embargo, las nanopartículas inducen una respuesta Th1-dependiente con producción de IFN- γ y proliferación de células T CD8⁺, lo cual resulta crítico en nuestro trabajo para las aplicaciones que se le darán a las Np como distintos candidatos vacunales o inmuno intervenciones ¹⁷⁸⁻¹⁸⁰ (Capítulo 3). Pero resulta importante resaltar que las Np promueven la producción y secreción de anticuerpos IgG e IgA específicos en sangre y en mucosas con potencial poder neutralizante y una respuesta celular con la inducción de linfocitos T CD4⁺IFN- γ ⁺ y CD8⁺IFN- γ ⁺ en bazo. Para elaborar la hipótesis que nos permitió plantear las aplicaciones que se mostrarán en el capítulo siguiente, son esenciales estos mecanismos efectores inducidos por Np-OVA.

CAPÍTULO 3

**Aplicaciones, candidato vacunal para
enfermedades infecciosas y no infecciosas**

Introducción

El uso de vacunas preventivas tiene como finalidad generar memoria inmune y preparar al organismo para enfrentar futuras exposiciones a un determinado microorganismo. El empleo de vacunas constituye el procedimiento más eficaz para prevenir las enfermedades infecciosas y representa el principal aporte de la inmunología a la salud humana. Es destacable que en los últimos años, y por el mejor conocimiento de la inmunopatogénesis de muchas enfermedades crónicas, se ha podido avanzar en el diseño de vacunas terapéuticas para enfermedades alérgicas, oncológicas y autoinmunes. En las mismas, lo que se busca es revertir un proceso ya instaurado para recuperar la homeostasis fisiológica e inmune.

Como hemos demostrado en los capítulos anteriores las nanopartículas PAH/Tpp demostraron capacidad para activar células presentadoras de antígeno a través de la vía intracelular del inflamósoma dependiente de NLRP3, y la consiguiente secreción de IL-1 β , para luego inducir una inmunidad Th1-dependiente. Los isotipos IgG Th1 junto con los linfocitos CD4⁺ y CD8⁺ productores de IFN- γ constituyen los mecanismos efectores principales que mediarían protección en los diferentes escenarios que se aborda este capítulo^{39,181-183}.

1- Aplicación de un candidato vacunal para inducir protección frente a *Brucella suis*

La brucelosis es una enfermedad zoonótica causada por la bacteria *Brucella spp.* patógena, de las cuales *Brucella abortus*, *B. melitensis* y *B. suis* afectan con mayor frecuencia a humanos. La brucelosis es una enfermedad endémica en América Latina principalmente en Perú y en Argentina¹⁸⁴. La bacteria Gram negativa *Brucella suis* ingresa al hospedador a través del contacto con carne cruda o alimentos que no fueron correctamente pasteurizados y pueden ingresar por vía aérea mediante aerosoles o por productos provenientes de animales infectados a través del contacto con lesiones en la piel o por la conjuntiva¹⁸⁵. A su vez, se reportan frecuentemente casos de

infección en los laboratorios siendo los accidentes laborales y la generación de aerosoles durante la toma de muestras los más relevantes ¹⁸⁶.

Brucella es un patógeno intracelular facultativo que establece su nicho replicativo principalmente en macrófagos. Una vez que ingresa la bacteria al organismo se disemina rápidamente por vía sistémica. La inducción de inmunidad específica es central para su control siendo la respuesta humoral, mediada por anticuerpos neutralizantes, de gran importancia en las etapas tempranas de la infección para evitar la adhesión de la bacteria a la superficie de las mucosas ^{187,188}. La adhesión a la matriz extracelular en las células del huésped es también esencial para el proceso de infección. La bacteria presenta varias adhesinas como el auto transportador trimétrico Btaf, el cual es un buen candidato para utilizarse en las formulaciones de nuevos candidatos vacunales ^{76,189,190}.

Sin embargo, para la generación de una nueva vacuna no alcanza con sólo inducir una respuesta humoral, dado que para generar memoria duradera se requiere una respuesta T-dependiente. Aquí proponemos el diseño de una vacuna preventiva mucosal contra brucelosis empleando la proteína Btaf como inmunógeno y las nanopartículas PAH/Tpp como carrier y adyuvante. Evaluaremos la inmunidad humoral, celular y las poblaciones de linfocitos T de memoria inducidas ^{76,191,192}.

2- Aplicación de un candidato vacunal para inducir protección frente al Sars-CoV-2

Luego que en diciembre de 2019 se publicaran los primeros casos de neumonía causada por un coronavirus y en enero del 2020 se identificó al virus emergente causante de la enfermedad, SARS-CoV-2, en marzo del 2020 se declaró la pandemia de COVID-19. Desde ese momento la crisis sanitaria, económica y social producida por la infección del SARS-CoV-2 altero completamente la vida en nuestro planeta y llevó a mantener condiciones de confinamiento y asilamiento que duraría más de un año, hasta que se autorizaran bajo condiciones de emergencia las primeras vacunas a finales del 2020. Desde ese momento las vacunas contra el SARS-CoV-2 han permitido controlar la transmisión viral, las hospitalizaciones y las muertes hasta que emergieron

las distintas variables virales que significaron la principal amenaza para el desarrollo y éxito de las vacunas y severidad de la infección natural. El desarrollo de vacunas contra COVID-19 ha sido desde enero 2020 un hecho inédito en la historia de la biomedicina, y de la vacunología en particular, por los tiempos en que se realizó y además porque fue la primera vez que se vacunó durante una pandemia generada por un virus emergente. Las vacunas desarrolladas y autorizadas para su uso poblacional se basan en el empleo de vectores adenovirales (Aztraseneca, Sputnik y Johnson & Johnson)^{125,193,194}, ARNm encapsulados en liposomas (Pfizer/BioNtech y Moderna)^{195,196}, virus inactivado (SinoVac's y Sinopharm)^{197,198} y vacunas a subunidades proteicas (Soberana y Abdala, NovaVax, etc)¹⁹⁹. Estas vacunas en su totalidad son sistémicas (intramusculares). Las vacunas mucosales se encuentran en fase clínica y no se han autorizado o aprobado aún para su uso poblacional.

El SARS-CoV-2 se asemeja más al SARS-CoV que al MERS-CoV en la secuencia del ARNm²⁰⁰ pero todos pertenecen a la familia de los betacoronavirus que presentan un genoma ARN de polaridad positiva que codifica para cuatro proteínas estructurales: Spike (S), envoltura (E), nuclear (N) y de membrana (M)^{201,202}. La infección aguda se inicia en las mucosas orofaríngeas por donde ingresa principalmente el virus y de progresar la replicación viral se traslada al tracto respiratorio inferior, causando daño en bronquios y generando una neumonía que puede evolucionar a una insuficiencia respiratoria. Durante el síndrome agudo respiratorio se genera una excesiva producción de angiotensina II lo que provoca una mayor permeabilidad en la vasculatura pulmonar^{203,204}. La infección celular comienza con la unión de la glicoproteína Spike del virus al receptor ACE2, principalmente en células del epitelio nasal y pulmonar²⁰⁵.

En bibliografía se han descrito péptidos de las proteínas S, N y M que inducen una activación en el sistema inmune^{206,207}. Sin embargo, la proteína S, por su función biológica, ha sido seleccionada en todas las vacunas desarrolladas como el target para inducir una respuesta humoral y celular protectora. La proteína S presenta una conformación muy particular, que la hace muy a fin a su receptor celular y de esta manera posibilita al virus ingresar a las células del huésped para que se inicie su replicación. La proteína Spike presenta en la cubierta del virus una estructura trimérica

y está compuesta por dos subunidades: la S1 que se une al receptor ACE2 a través del dominio de unión al receptor (RBD) y la S2 que le permite fusionarse a la membrana de la célula huésped ²⁰⁸. Para incrementar la eficiencia de unión de RBD a ACE2, y de esta manera facilitar el ingreso del virus a la célula blanco, proteasas del huésped, como las proteasas ancladas a membrana TMPRSS2 y furina o la catepsina lisosomal, clivan a la proteína S en S2 y S1/S2 y de esta manera incrementan la infectividad de la partícula viral (Fig. 42) ^{209,210}. El hecho que la evolución natural del virus acumule mutaciones en esta proteína, y en RBD en particular, y que estas mutaciones generen variantes proteicas con mayor afinidad por ACE2, ha generado variantes virales con mayor capacidad de transmisión entre humanos. La máxima expresión de este fenómeno se ha visto con la variante viral Omicron que desde mediados del 2021 ha generado picos de infección muy superiores a los generados por las variantes virales predecesoras. El genoma de Omicron presenta más de 50 mutaciones en comparación con la variante ancestral o Wuhan, concentrando más de 30 en la proteína S, no sólo en RBD sino en otros dominios relacionados con la disposición espacial de RBD para unirse a ACE2 ²¹¹.

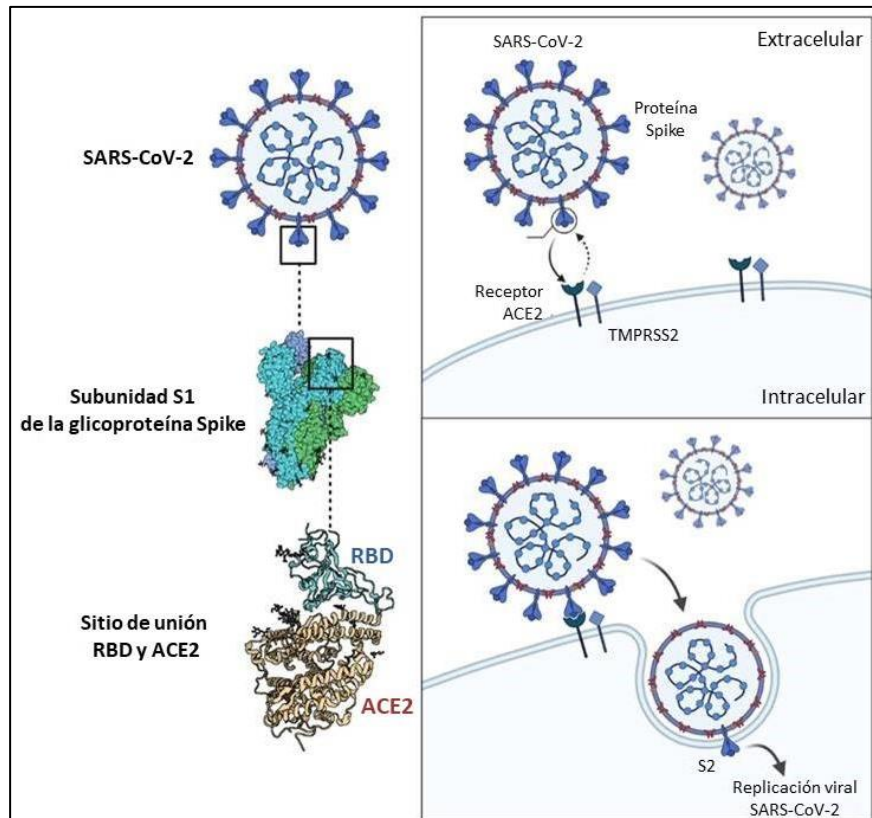


Figura 42: Mecanismo de infección del SARS-CoV-2 a través del reconocimiento de ACE2 en la célula blanco. (Adaptación de Ali A. Rabaan et al. 2023)

Por lo tanto, se ha considerado como mecanismo inmune principal de protección la generación de anticuerpos bloqueantes dirigidos a la proteína S, de manera de evitar la invasión de las células del huésped, y de esta manera controlar la diseminación del virus y su transmisión entre personas. Dado que las variantes virales concentran sus mutaciones en la proteína S, también se ha observado que los anticuerpos bloqueantes inducidos por las vacunas dirigidas a la proteína S o RBD de la variante Wuhan presentan un menor poder neutralizante frente a las mismas. Esto ha determinado cambios en las estrategias de diseño de vacunas COVID-19 y la implementación, desde septiembre 2022, de las vacunas de segunda generación o bivalentes, dirigidas a las variantes virales Wuhan y Omicron BA.4/5. Recientemente se ha aprobado por parte de las agencias regulatorias FDA y EMA las vacunas monovalentes dirigidas a la variante Omicron XBB²¹²⁻²¹⁵.

Esto significa que la capacidad de las vacunas de generar anticuerpos específicos neutralizantes constituye un mecanismo protector altamente eficaz. La evolución viral en la población ha determinado que aparezcan variantes que evaden la respuesta de anticuerpos neutralizante y que presenten un enorme poder de transmisión, lo cual ha determinado que rápidamente desplacen a las variantes virales predominantes. Sin embargo, y dado que la inmunidad celular T-dependiente está principalmente dirigida a controlar la enfermedad severa (neumonía), estas variantes virales emergentes no han afectado el poder de las vacunas de controlar la COVID-19 severa. Por esta razón, y a pesar de haber surgido variantes virales muy distintas a la variante ancestral, las vacunas de primera generación han mostrado una elevada eficiencia en evitar la enfermedad severa. Sin embargo, y para controlar también la transmisión viral, se han aprobado como mencionamos anteriormente las vacunas bivalentes y las vacunas monovalentes dirigidas a Omicron. Asimismo, es importante resaltar que la aplicación de dosis refuerzo incrementa la afinidad de los anticuerpos específicos y la capacidad neutralizante de los mismos, por lo cual la eficiencia de las vacunas COVID-19 en el control de transmisión viral no se marcadamente afectada.

Por lo tanto, y dado que el SARS-CoV-2 va a continuar circulando en la población, existe la necesidad de seguir desarrollando vacunas para la aplicación de

dosis de refuerzo o para esquemas iniciales de vacunación. Seguramente la anualización de las dosis de refuerzo justificará la actualización de las vacunas COVID-19 y la generación de vacunas de tercera generación, entre las cuales se encuentran las vacunas mucosales.

3- Candidato vacunal terapéutico para el tratamiento de la alergia alimentaria a las proteínas de la leche vaca

Las alergias alimentarias son definidas como enfermedades inflamatorias causadas por una reacción inmune dirigida a proteínas contenidas en los alimentos. Esta definición permite distinguir a estos desordenes de las numerosas enfermedades asociados con efectos adversos inducidos por alimentos que no comparten la etiología inmunológica. En esta última categoría se encuentra por ejemplo la intolerancia a la lactosa, debido a la ausencia de la enzima lactasa.

El enfoque básico actual de la prevención y el tratamiento de las enfermedades alérgicas se basa en dos pilares fundamentales: prevenir el contacto con el alérgeno causante de la enfermedad y el empleo de fármacos que eviten o contrarresten las acciones de los mediadores inflamatorios como los agonistas beta-adrenérgicos, anti-histamínicos y otras drogas anti-inflamatorias. Sin embargo, estas opciones no corrigen el defecto inmune de base y están dirigidas a evitar la exposición al estímulo que promueve los mecanismos inmunes, o modular el efecto final en la célula blanco. Los nuevos conceptos en terapias o prevención de las enfermedades alérgicas están enfocados en corregir el defecto inmune y restaurar la tolerancia específica, o incrementar el umbral de exposición al alérgeno que genere síntomas, de manera que la exposición natural al alimento no genere una reacción inflamatoria. Para esto, se utiliza la estrategia de administrar el alérgeno en forma controlada o junto a un inmunomodulador que promueva una respuesta Th1-dependiente capaz de revertir la respuesta Th2 que gobierna las reacciones alérgicas.

Debido a la creciente prevalencia de las enfermedades alérgicas y de las anafilaxias existe la necesidad de desarrollar nuevos procedimientos terapéuticos que corrijan el defecto inmunológico de base. Para ello, se requiere conocer cuáles son los

mecanismos inmunopatogénicos y la etiología de la enfermedad. Las alergias alimentarias en su mayoría son mediadas por mecanismos IgE-independientes, aunque algunas pueden ser mixtas (IgE-dependientes e independientes)²¹⁶⁻²¹⁹. Sin embargo, las IgE-dependientes son el principal foco de estudio ya que son las que pueden generar las anafilaxias o reacciones alérgicas severas que pueden poner en juego la vida de los pacientes. En los últimos años se han dilucidado distintos mecanismos etiopatogénicos, por los cuales se producen reacciones exacerbadas frente a antígenos comunes del medio ambiente e inoctrinos, en individuos susceptibles. Se han reportado diferentes fallas en los mecanismos de tolerancia que serían los responsables en estos pacientes de generar procesos inflamatorios con una inducción exacerbada de la respuesta inmune mediada por citoquinas tipo 2 y la consiguiente síntesis de IgE. Las citoquinas tipo 2 (IL-4, IL-5, IL-13, IL-33, etc.) promueven un entorno inflamatorio y son responsables de la activación y diferenciación de linfocitos B a células plasmáticas productoras de IgE, maduración de mastocitos, basófilos y eosinófilos, secreción de moco y otros mecanismos que median las reacciones inflamatorias alérgicas²²⁰⁻²²².

La desregulación de la respuesta del sistema inmune está implicada en muchas patologías incluidas la autoinmunidad, el cáncer y la alergia^{223,224}. Una de las principales inmunoterapias para tratar las alergias alimentarias consiste en exponer al paciente al alérgeno en bajas dosis e ir aumentando de manera gradual durante un tiempo prologando hasta que la exposición al alérgeno, o desafío con el alérgeno, no induzca reacciones alérgicas. Este procedimiento se puede realizar mediante administraciones sistémicas o mucosales y se puede llegar a una desensibilización o tolerancia completa. En la desensibilización, la falta de respuesta frente a la exposición al alérgeno sólo se mantiene si se continúa con la administración del alérgeno de manera controlada; mientras que en la tolerancia, al discontinuar el tratamiento el paciente mantiene la no respuesta frente a la exposición natural o frente a desafíos controlados. Las razones por las cuales, dependiendo del paciente, se alcanza un estado u otro no son del todo comprendidas. En ambos casos, los mecanismos de no respuesta están principalmente mediados por linfocitos T regulatorios (Treg), que controlan las células de la inmunidad innata y de la adaptativa a través de mecanismos mediados por contacto célula-célula (CTLA-4) o por factores solubles (IL-10, TGF- β e IL-

35)⁸². Mediante el empleo de un modelo murino IgE-dependiente de alergia alimentaria hemos desarrollado distintos procedimientos de este tipo^{81,82,225,226}.

Otra variante de inmunoterapia consiste en inmunomodular induciendo mecanismos contra-regulatorios de los Th2 que gobiernan las reacciones alérgicas, a través de la inducción de mecanismos alérgeno-específicos Th1-dependientes. En otras palabras, se inducen linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ específicos productores de IFN- γ , citoquina contra-regulatoria de las citoquinas Th2. El descubrimiento de adyuvantes agonistas de receptores tipo toll, como CpG o MPL (3-O-deacyl-4'-monofosforil lípido A), que activan células presentadoras de antígenos y producen la liberación de citoquinas tipo 1 (IFN- γ e IL-12) que promueven la diferenciación de células Th1, pueden ser utilizados junto al alérgeno en la formulación de una vacuna terapéutica para la inmunomodulación de las alergias²²⁷⁻²²⁹. Este tipo de terapias han sido diseñadas en modelos experimentales de alergia alimentaria administrando adyuvantes tipo 1 por vías mucosales^{81,225}.

Por lo tanto, las inmunoterapias basadas en la inducción de los mecanismos de tolerancia o de inmunomodulación alérgeno-específicas se emplean para corregir el defecto de base y controlar la aparición de reacciones alérgicas frente a la exposición al alérgeno. Mediante desafíos orales con el alérgeno de interés se puede evidenciar que estos procedimientos incrementan el umbral de inducción de reacciones inflamatorias.

En este trabajo empleamos la proteína de leche de vaca β -lactoglobulina (alérgeno de la leche bovina) y las nanopartículas como vehículo/adyuvante pro-Th1 para un procedimiento inmunomodulatorio correctivo de la alergia alimentaria a leche de vaca en un modelo murino de alergia alimentaria.

Objetivos

-Estudiar las nanopartículas PAH/Tpp en la formulación de un candidato vacunal preventivo mucosal contra *Brucella suis* y sistémico contra SARS-CoV-2.

-Estudiar las nanopartículas PAH/Tpp en una vacuna terapéutica mucosal para la inmunomodulación de alergias IgE-dependientes en un modelo animal pre-clínico de alergia alimentaria.

Resultados

1- Candidato vacunal mucosal contra *B. suis*.

Para formular una vacuna contra brucelosis se empleó la proteína Btaf de *Brucella suis*. El inmunógeno se obtuvo libre de LPS en forma recombinante a partir de cultivos de *E. coli* en el Instituto de Estudios de la Inmunidad Humoral (IDEHU-UBA-CONICET) a través de un trabajo en colaboración con el Dr. Pablo Baldi y la Dra. Mariana Ferrero. Se evaluó la encapsulación de Btaf ($pI=10.71$, calculado con el servidor <http://isoelectric.org/>) en la Np tal como se describió anteriormente, empleando distintas concentraciones proteicas. Obtuvimos el mayor porcentaje de encapsulación para 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de proteína con un 35.8% en el volumen final de la formulación de Np-Btaf (Fig. 43).

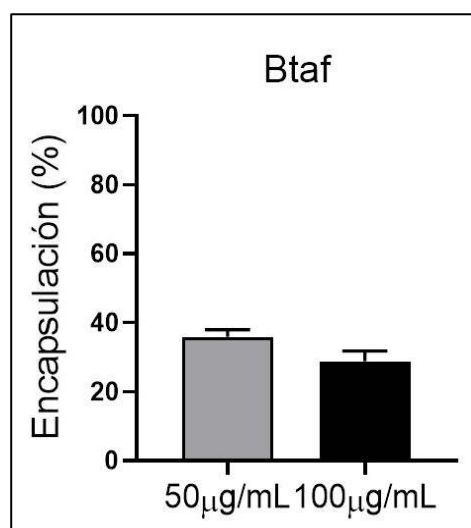


Figura 43: Porcentaje de encapsulación de Btaf en la Np

Se empleó esta formulación en una administración intranasal por instilación en cada narina un volumen de 20 μL de solución de Np conteniendo 10 μg de Btaf por dosis en ratones Balb/c de 5 semanas, siguiendo el esquema de inmunización que se observa en la Figura 44A. Se empleó como control un grupo de animales que recibieron únicamente la Np o Btaf. Se realizó un monitoreo del peso de los animales semanalmente durante todo el proceso (Fig. 44B) y de los niveles de anticuerpos específicos en suero y en BAL (Fig. 44C). Los resultados indican que los animales inmunizados con Np-Btaf se mantuvieron el peso en forma similar a los controles y que los niveles de IgG específica sérica en los animales inmunizados con Np-Btaf fue significativamente superior a los controles. Además, el análisis de los isotipos

específicos mostró que se inducen principalmente IgG2a en suero. En cuanto a la respuesta celular encontramos niveles aumentados de mIFN- γ en el sobrenadante de cultivo de esplenocitos expandidos con Btaf de los animales que fueron inmunizados con el candidato Np-Btaf, en comparación con células estimuladas provenientes de ratones que solo recibieron Np o Btaf. La cuantificación de los niveles de mIL-5 e mIL-13 no mostraron diferencias con respecto a los controles (Fig. 44D).

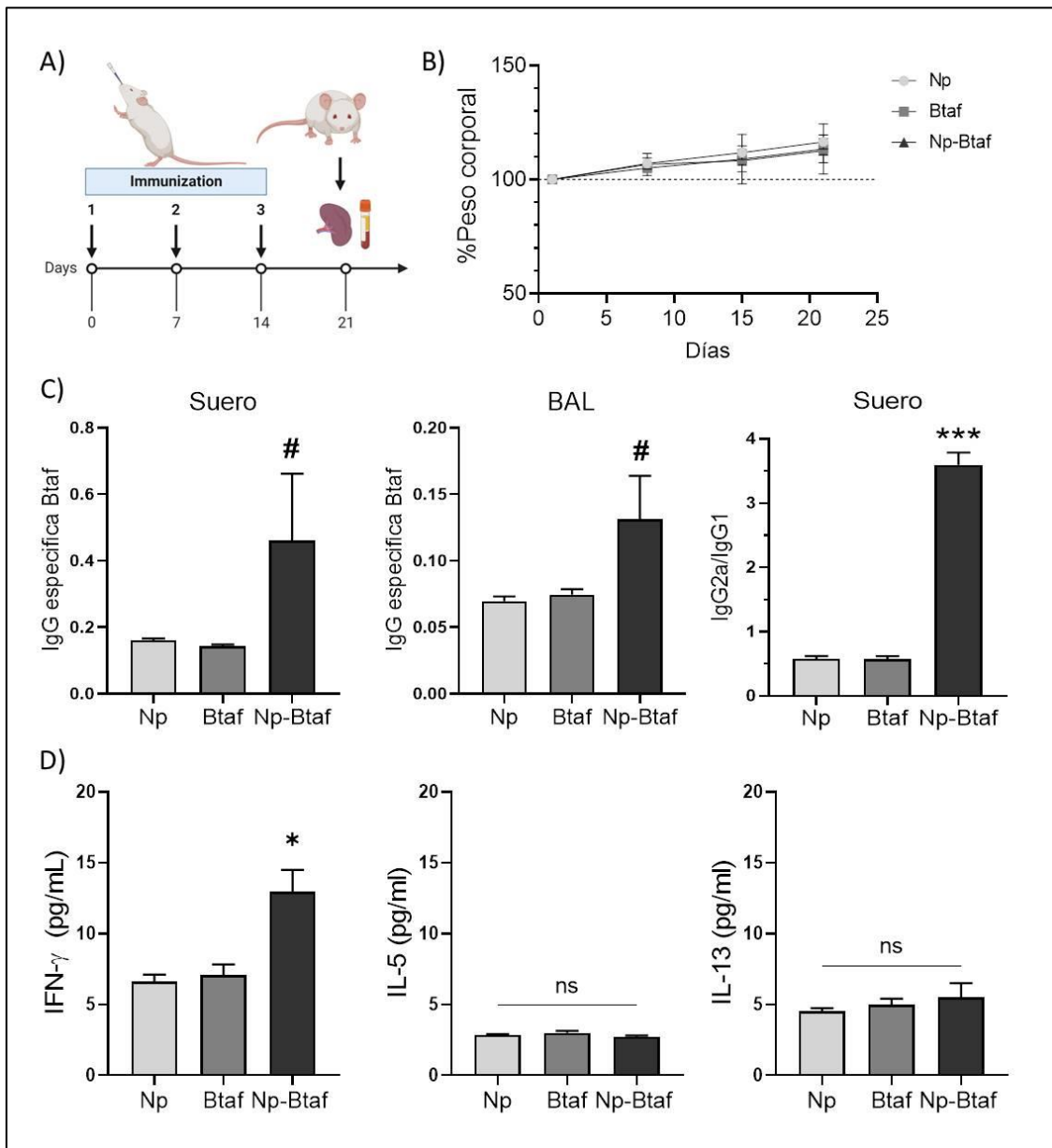


Figura 44: Análisis de las respuestas humoral y celular del candidato vacunal contra *Brucella suis*. A) Esquema de inmunización semanal de 3 dosis (Btaf 500 μ g/mL) ($n=5$ ratones por condición). B) Monitoreo del peso de los animales luego de cada inmunización. C) Cuantificación de IgG específica a Btaf en suero (dilución 1/100) y en BAL (dilución 1/2) por ELISA indirecto. D) Cuantificación de los niveles de mIFN- γ , mIL-5 e mIL-13 por ELISA de captura

*en el sobrenadante de cultivo de esplenocitos luego de 72 horas de cultivo estimulados con Btaf. El experimento fue realizado por duplicado (ANOVA*** $P < 0.001$. t-Student # $P < 0.05$).*

Estos resultados indican que la administración del candidato vacunal Np-Btaf por vía intranasal, promueve la respuesta inmune (humoral y celular tanto mucosal como sistémica) Th1-dependiente.

Posteriormente se evaluó la memoria inmune promovida por el candidato mucosal lo cual se extrajeron los ganglios cervicales y se analizó la frecuencia de poblaciones linfocitarias CD4 y CD8 de memoria central (Tmc) y memoria efectora (Tme) por citometría de flujo (Fig. 45A). Encontramos que las frecuencias de linfocitos T naïve ($CD44^-CD62L^+$) no varían al comparar los lotes control con el inmunizado con Np-Btaf. Al evaluar las subpoblaciones T de memoria sólo encontramos un aumento significativo en los linfocitos T $CD4^+$ efectores ($CD44^+CD62L^-$) y de memoria central ($CD44^+CD62L^+$) en aquellos animales inmunizados con Np-Btaf. Con respecto a las células $CD8^+$ observamos una tendencia al aumento en células Tmc, sin alcanzar significancia estadística. En cambio no observamos diferencia en células Tme (Fig. 45B).

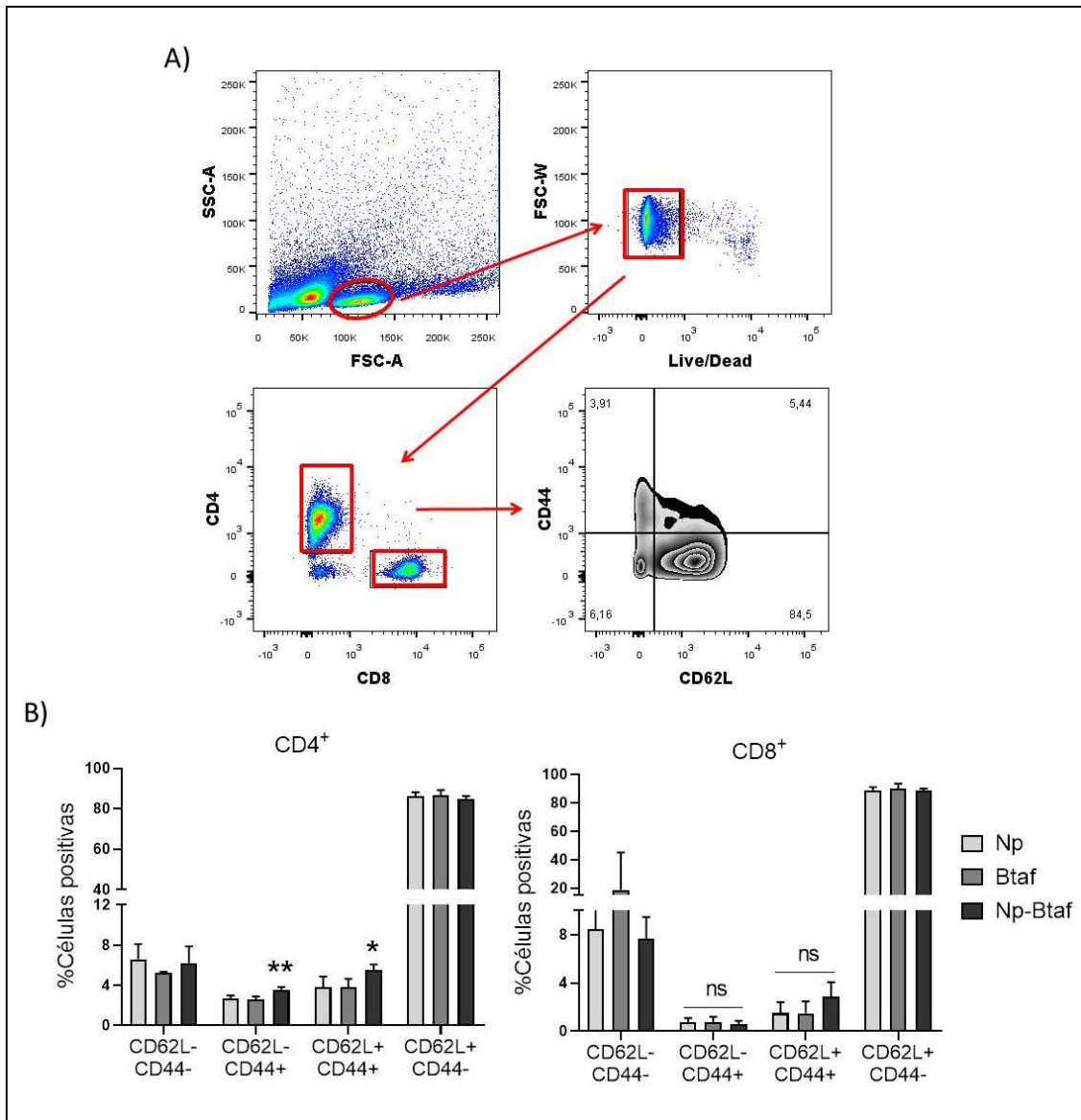


Figura 45: Análisis de frecuencia de linfocitos T efectoras y de memoria en ganglio cervical. A) Estrategia de gates por citometría de flujo para la selección de células T naïve (CD62L⁺CD44⁻), células T de memoria efectoras (CD62L⁻CD44⁺) y de memoria central (CD62L⁺CD44⁺). **B)** Cuantificación de la frecuencia de poblaciones celulares (ANOVA * P<0.05; **P<0.01).

Estos resultados indican que el candidato vacunal Np-Btaf induce un perfil inmunológico Th1 con proliferación de linfocitos T CD4⁺ de memoria central y efectora en los ganglios regionales de la mucosa nasal. Estos hallazgos indican las propiedades adyuvantes de Np en una vacuna intranasal.

2- Candidato vacunal sistémico contra SARS-CoV-2

Para la formulación del candidato vacunal contra el SARS-CoV-2 se utilizó como antígeno la porción RBD de la proteína S del SARS-CoV-2 variante ancestral o Wuhan y las nanopartículas. El antígeno se obtuvo de manera recombinante a partir de cultivos de la levadura *Pichia pastoris*, en el marco del consorcio ARGENVAC, en el laboratorio del IB3 en la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales de la Universidad Nacional de Buenos Aires (UBA-CONICET). Al obtenerse a partir de cultivos de levaduras al inmunógeno se la nombrará como γ RBD (yeast RBD). La optimización de su producción, la caracterización conformacional e inmunogénica y el escalado se realizó en el IB3 bajo la supervisión de la Dra. Cecilia D'Alessio, Dr. Javier Santos y Dr. Alejandro Nadra ⁷⁷.

Se evaluó la presencia de LPS en los componentes vacunales (Np e γ RBD) empleando la línea celular reportera HEKhTLR4 y se obtuvieron niveles basales para ambos componentes (<0.01 ng/mL de LPS) (Fig. 46A).

Posteriormente, evaluamos la capacidad de Np de encapsulación de γ RBD, ($pI=8.55$ ²³⁰) y evidenciamos que el porcentaje de encapsulación no depende de la concentración final de proteína. Concentraciones de γ RBD 50 μ g/mL o 100 μ g/mL en la formulación de Np- γ RBD arrojó valores de encapsulación cercanos al 20% (Fig. 46B).

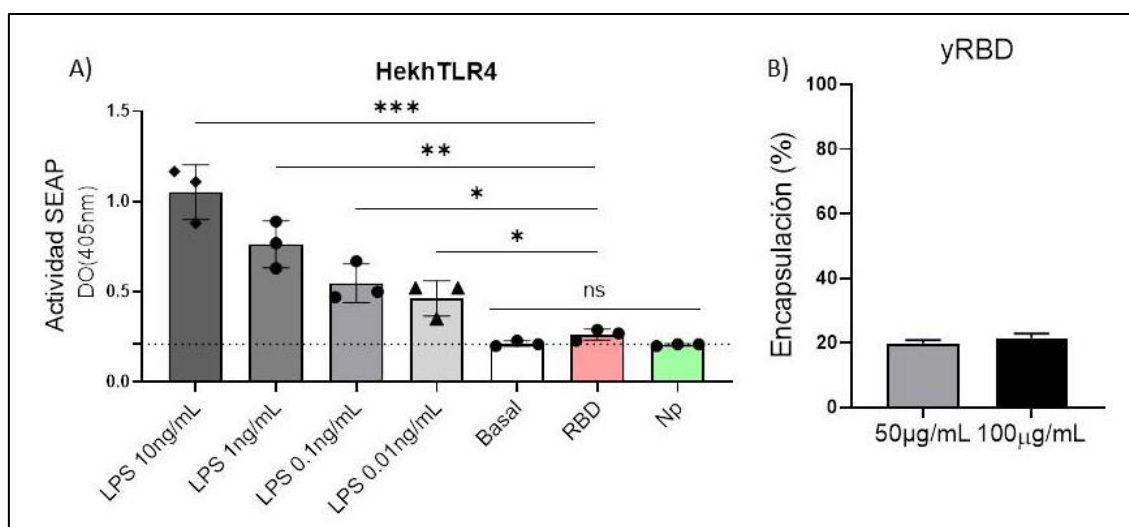


Figura 46: Análisis de la presencia de LPS en γ RBD y el porcentaje de encapsulación en Np. A) Medida de actividad de la fosfatasa alcalina (SEAP) en sobrenadante de cultivo de células reporteras HeKhTLR4 con distintas concentraciones de LPS como control, 0.5 mM Np y 2 μ g de

RBD. B) Porcentaje de encapsulación de la proteína γ RBD por las Np. Las distintas condiciones experimentales se llevaron a cabo por triplicado, se grafica la media con su desviación estándar (ANOVA $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$).*

Seguidamente, se procedió a la inmunización por vía intraperitoneal empleando Np- γ RBD 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (20 μg de γ RBD en 200 μL de Np) por dosis a ratones Balb/c de 5 semanas de edad en un esquema de 3 dosis como se muestra en la Figura 47. Como lotes controles se evaluó la administración de Np, γ RBD o γ RBD con hidróxido de aluminio (Alum+ γ RBD) dado que se trata de un adyuvante ampliamente utilizado y validado (Fig. 47A). En la Figura 47B se muestran los pesos de los animales evaluados luego de cada inmunización. No observamos descensos significativos en el peso de los ratones pertenecientes a los diferentes lotes.

Al analizar la inmunogenicidad de cada candidato vacunal observamos en los animales inmunizados con Np- γ RBD y Alum+ γ RBD un aumento significativo en anticuerpos IgG específicos para γ RBD, tanto en suero como en lavado broncoalveolar luego de finalizado el esquema de inmunización (Fig. 47C). El análisis de la inmunidad celular sistémica mostró porcentajes significativamente elevados de linfocitos T CD8^+ y T CD4^+ productores de $\text{mIFN-}\gamma$. Encontramos un aumento en el número de linfocitos T $\text{CD4}^+\text{IFN-}\gamma^+$ y $\text{CD8}^+\text{IFN-}\gamma^+$ esplénicos en ratones inmunizados con Np- γ RBD en comparación a los ratones inmunizados con Alum+ γ RBD (Fig. 47D).

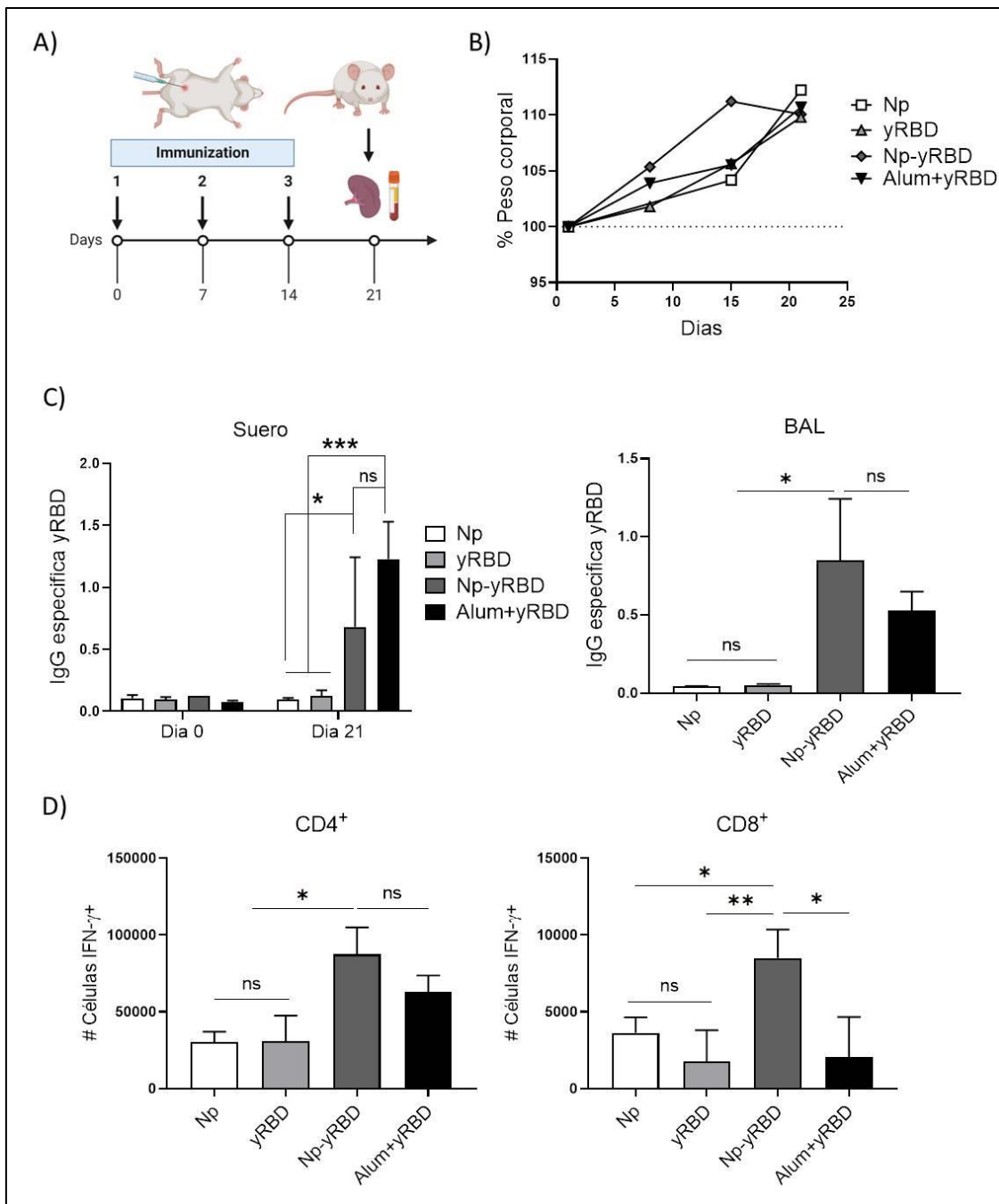


Figura 47: Análisis de la respuesta humoral y celular del candidato vacunal Np-yRBD. A) Esquema de inmunización en ratones Balb/c (n=5 por condición). B) Monitoreo de los pesos de los animales luego de cada inmunización. C) Cuantificación por ELISA de IgG antígeno específica en suero (dilución 1/100) y en lavado broncoalveolar (dilución 1/2). D) Cuantificación del número de linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ productoras de mIFN-γ mediante citometría de flujo. Las distintas condiciones experimentales se llevaron a cabo por duplicado, se grafica la media con su desviación estándar (ANOVA * P<0.05; **P<0.01; ***P<0.001).

Estos resultados preliminares indican que las nanopartículas también muestran poder adyuvante cuando son administradas sistémicamente junto a γ RBD dado que evidenciamos mayor inmunogenicidad humoral y celular específica de γ RBD cuando se combinan con Np en comparación a cuando se administran individualmente. Asimismo, evidenciamos resultados comparables a los obtenidos con Alum+ γ RBD, aunque la frecuencia de linfocitos T CD8⁺IFN- γ ⁺ fue superior con Np. Esto se podría explicar por la capacidad de las Np de inducir presentación cruzada de antígenos en las células presentadoras de antígenos activadas.

2.1 Optimización del candidato vacunal contra SARS-CoV-2.

Luego de observar que la Np indujo un aumento en la respuesta inmune específica tanto humoral como celular, por su poder adyuvante previamente descrito, decidimos optimizar la formulación de la vacuna modificando sus componentes: adyuvante e inmunógeno.

Aplicando el mismo esquema de inmunización mostrado en la Figura 47A, se realizaron administraciones intraperitoneales manteniendo la misma cantidad de antígeno 20 μ g de γ RBD y variando el volumen final de Np 200 μ L y 500 μ L por dosis. Encontramos una mayor producción de IgG específica en suero conforme se aumentó la cantidad de Np (Fig. 48A). En segunda instancia, se administraron 20 μ g y 50 μ g de γ RBD en un volumen final de 500 μ L de Np. De esta manera evidenciamos un comportamiento dosis-respuesta al incrementar la cantidad de γ RBD administrada, y observamos diferencias significativas entre las formulaciones conteniendo Np y el hidróxido de aluminio a una misma concentración de γ RBD (50 μ g), con títulos de IgG superiores en los animales que recibieron al candidato Np- γ RBD (Fig. 48 B). Al evaluar la respuesta celular sistémica en esplenocitos estimulados con γ RBD observamos una concentración significativamente mayor de mIFN- γ en el sobrenadante de cultivo de esplenocitos provenientes de animales inmunizados con Np- γ RBD 50 μ g (Fig. 48C). Por lo tanto, logramos optimizar el protocolo de inmunización incrementando la eficiencia de la inmunogenicidad humoral y celular específicas inducidas.

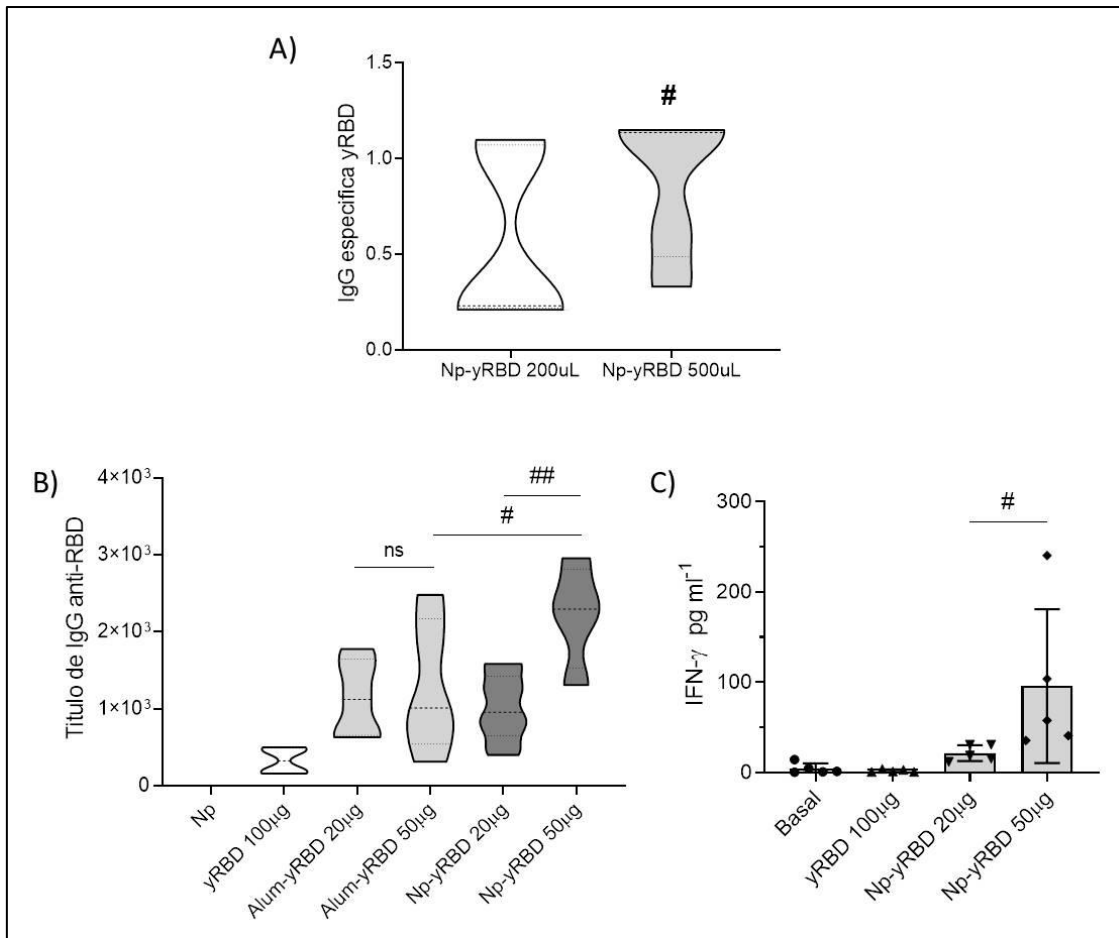


Figura 48: Análisis en el cambio de variables para la formulación vacunal contra SARS-CoV-2.

A) Anticuerpos IgG específicos en suero por ELISA indirecto, comparando 200 µL con 500 µL de Np. B) Cuantificación del título de IgG específicos en suero por ELISA comparando distintas cantidades de yRBD por dosis en 500 µL de Np. C) Cuantificación de los niveles de mIFN-γ por ELISA de captura en el sobrenadante de cultivo de esplenocitos luego de 72 horas de cultivo y estimulados con yRBD. Las distintas condiciones experimentales se llevaron a cabo por duplicado. Se grafica la media con su desviación estándar (ANOVA* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$. t-Student # $P < 0.05$; ## $P < 0.01$);).

Luego de obtener estos resultados decidimos continuar los estudios con la formulación de 50 µg de yRBD en 500 µL de volumen final de Np (100 µg/mL), debido a que obtuvimos mejores parámetros inmunológicos

2.2 Optimización del plan de inmunización empleando Np-yRBD

Para evaluar la inmunogenicidad del candidato vacunal con 50 µg de yRBD en un volumen final de 500 µL de Np por dosis^{231,232}, decidimos aplicar un esquema de 2 administraciones separadas por 21 días. Como controles se administraron Alum+yRBD

50 µg e yRBD 50 µg en 500 µL de solución final. Nuevamente se monitoreó el peso de los animales durante todo el proceso para evaluar seguridad (Fig. 49A). El análisis de la inducción IgG específica en suero y en BAL nos permitió observar que el candidato de Np-yRBD 50 µg indujo títulos de anticuerpos IgG e IgG2a significativamente mayores en comparación al control Alum+yRBD 50 µg (Fig. 49B). El isotipo IgG1 dio mayores títulos en Alum con respecto a IgG2a dado que este adyuvante induce una respuesta humoral Th2 específica¹⁶³.

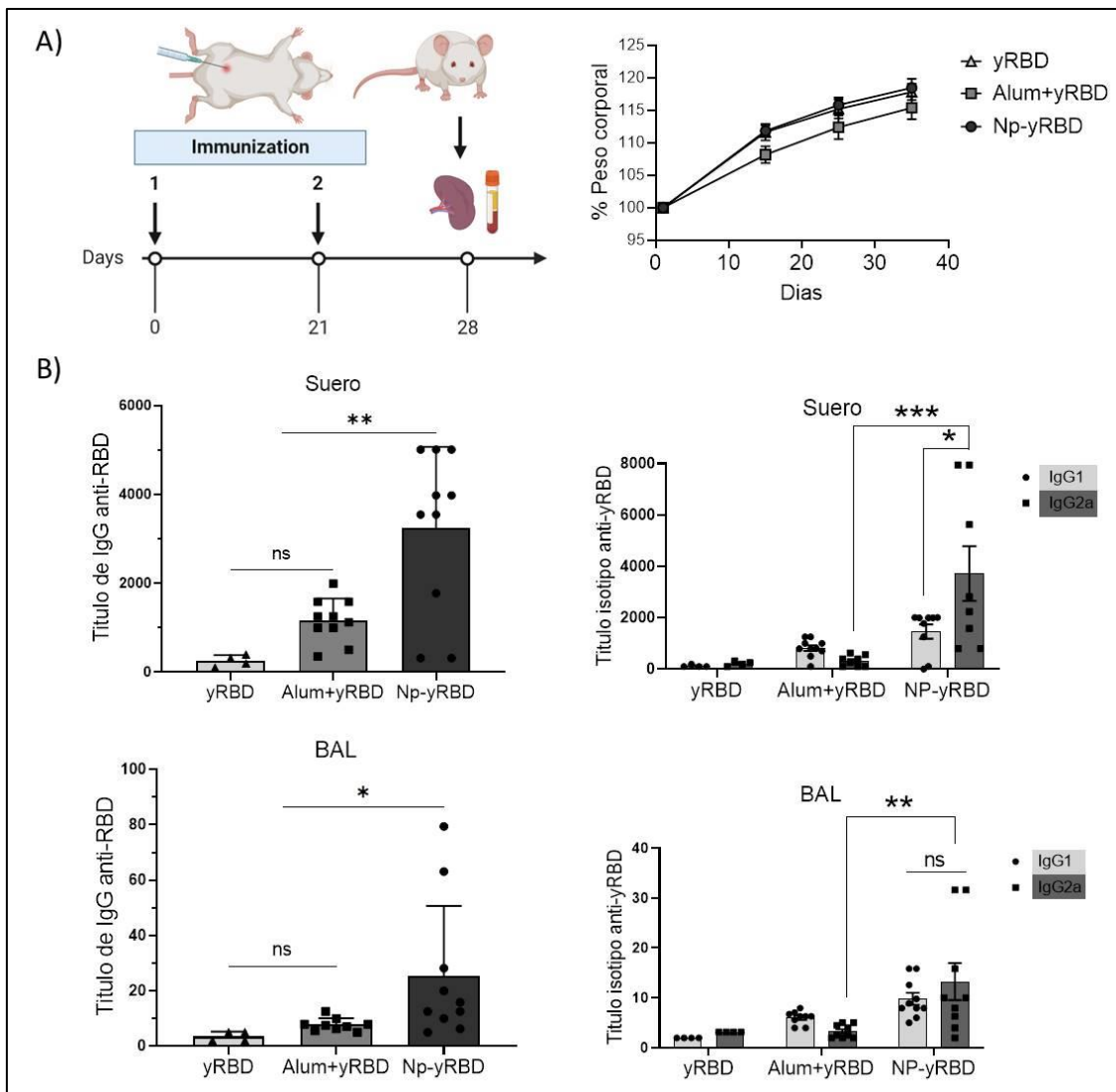


Figura 49: Análisis de la respuesta humoral de Np-yRBD 50µg y Alum+yRBD 50µg. A) Esquema de inmunización en ratones Balb/c y monitoreo del peso durante el procedimiento. B) Cuantificación por ELISA de IgG e isotipos antígeno específicos en suero (panel superior) y en BAL (panel inferior). Las distintas condiciones experimentales se llevaron a cabo por duplicado, se grafica la media con su desviación estándar. (ANOVA* P<0.05; **P<0.01; ***P<0.001. t-Student #P<0.05; ##P<0.01).

También evaluamos la producción de citoquinas Th1 y Th2 en cultivos de esplenocitos. Encontramos un aumento significativo en la producción de mIFN- γ en aquellos animales inmunizados con Np- γ RBD, en cambio para las citoquinas tipo 2 solo se encontró un aumento en mIL-13 en los animales que recibieron Alum+ γ RBD (Fig. 50A). Asimismo, evaluamos respuesta inmune celular inducida por el citometría de flujo en esplenocitos de los animales inmunizados y se evidencio la presencia de IFN- γ intracitoplasmático en células T (Fig. 50B). En este ensayo, encontramos un aumento en la intensidad de fluorescencia media (MFI) en linfocitos T CD4⁺IFN- γ ⁺ y linfocitos T CD8⁺IFN- γ ⁺. Dicho aumento se observó principalmente en linfocitos T CD4⁺ en los animales inmunizados con Np- γ RBD en comparación con hidróxido de aluminio. En cambio, para los linfocitos T CD8⁺ productoras de IFN- γ no se encontró diferencia significativa entre ambos lotes (Fig. 50C).

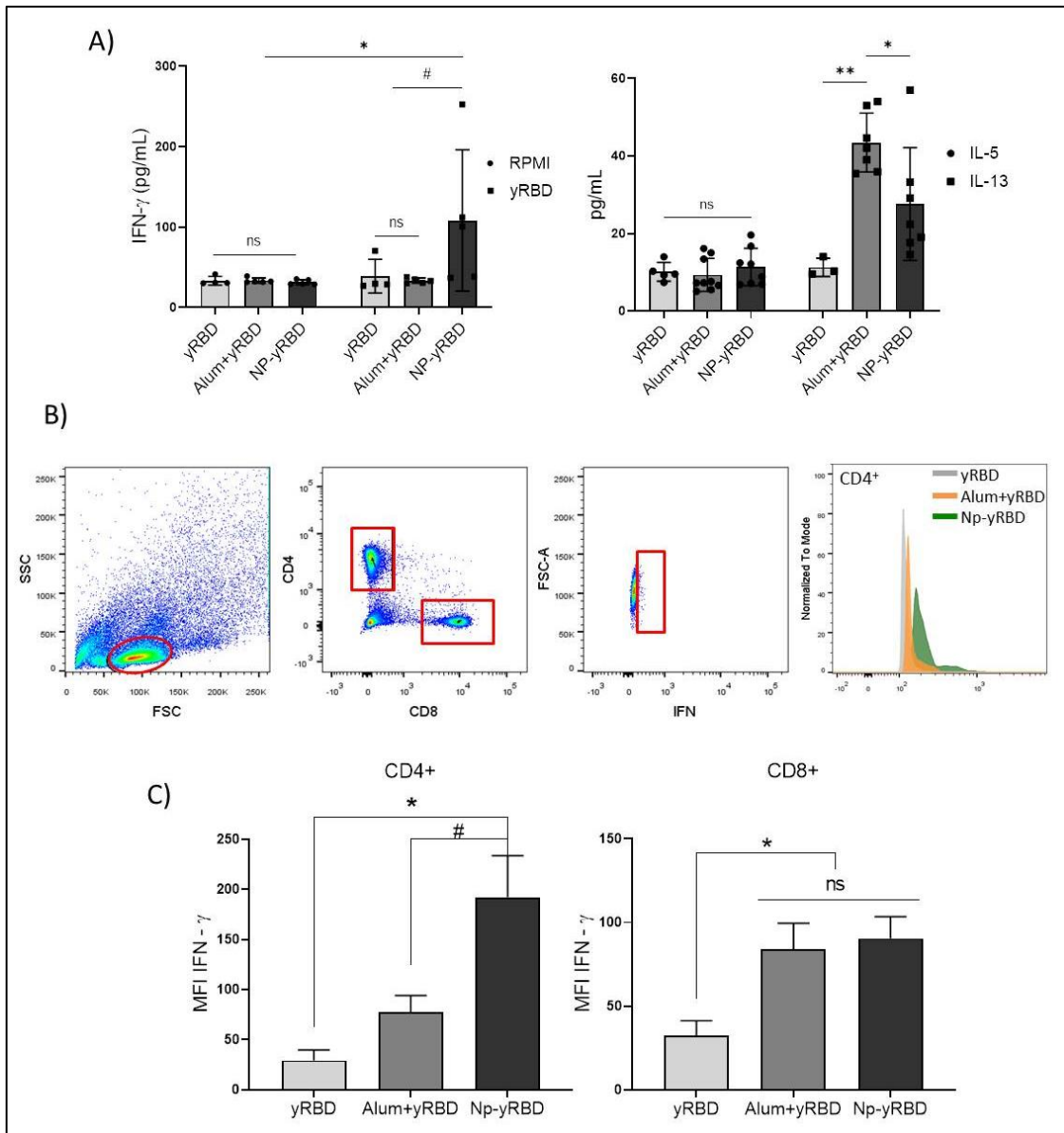


Figura 50: Análisis de la respuesta celular de Np-yRBD 50µg y Alum+yRBD 50µg. A) Cuantificación por ELISA de mIFN-γ, mIL-13 e mIL-5 en sobrenadante de cultivo de esplenocitos estimulados con yRBD. B) Estrategia de gates por citometría de flujo para la selección de linfocitos T CD4⁺IFN-γ⁺ y CD8⁺IFN-γ⁺ y C) Cuantificación de la intensidad de fluorescencia media (MFI). Las distintas condiciones experimentales se llevaron a cabo por duplicado, se grafica la media con su desviación estándar. (ANOVA * P<0.05; **P<0.01. t-Student #P<0.05).

En conjunto, estos resultados confirman lo hallado en el capítulo anterior e indican que las Np inducen una activación de la inmunidad Th1-dependiente, con la expansión de linfocitos T CD4 y CD8 productoras de IFN-γ y la producción de IgG2a específica. Estos hallazgos resultan promisorios para el candidato vacunal Np-yRBD como una vacuna preventiva en un proceso infeccioso viral contra el SARS-CoV-2.

2.2.1 Funcionalidad del candidato vacunal: Ensayo de protección contra SARS-CoV-2 en ratones K18-hACE2.

Para evaluar la eficacia de la protección conferida por el candidato vacunal Np-yRBD realizamos un desafío viral empleando ratones K18 (cepa C57/BL6), los cuales se encuentran modificados genéticamente para expresar el receptor humano ACE2 en células epiteliales mucosales^{233,234}. Dicho receptor, como se mencionó anteriormente, facilita la entrada del virus SARS-CoV-2 a la célula blanco para replicarse y diseminarse en el organismo²³⁵.

Este ensayo se realizó en el ANLIS MALBRAN (Laboratorios BLS3 y BLS3A y el Departamento de Virus Respiratorio) empleando ratones K18-hACE2 de 5-7 semanas de edad provistos por el bioterio del Centro de Medicina Comparada de la Universidad Nacional del Litoral (Dr. Hugo Ortega). Se aplicó el esquema optimizado de inmunizaciones por vía intraperitoneal (2 dosis separadas por 21 días) mostrado en la Figura 49. Dos semanas luego de la última dosis (día 35) se procedió a la infección de los ratones vacunados por instilación intranasal con 10^5 TCID (*Tissue culture infectious dose*) de SARS-CoV-2 variante Wuhan. Al día 39 se sacrificaron los animales para analizar la carga viral mediante RT-PCR en pulmón y lavado nasal (LN), por cuestiones metodológicas y prácticas no se realizó lavado nasal a todos los animales infectados (Fig. 51A).

Los lotes de animales incluyeron los controles con Np, yRBD, Alum+yRBD y Np-yRBD y un lote adicional de animales sin infectar (Fig. 51A). Además los ratones se agruparon por sexo para cada lote (lote de 10 animales, 5 machos y 5 hembras). En este ensayo se emplearon todos los componentes obtenidos bajo condiciones de buenas prácticas de laboratorio en el marco del consorcio ARGENVAC. Los cultivos de *Pichia pastoris* (bioreactor de 75L), obtención y posterior purificación de yRBD se realizaron en la planta de Bioprocesos Industriales del INTI (Dra. María Laura Matos). El posterior control de calidad de los lotes de proteínas producidos fue realizado en los laboratorios IB3 (FCEyN).

Mediante el monitoreo de los pesos de los animales durante el protocolo de inmunización y desafío se observó que únicamente los animales que recibieron

solamente γ RBD mostraron el menor incremento en el peso, antes y después de la infección viral. La dosis de virus empleada no resultó letal para ningún animal en los tiempos de estudio (Fig. 51B). El análisis de los sueros de los animales inmunizados con los dos candidatos vacunales Np- γ RBD y Alum+ γ RBD presentaron anticuerpos IgG específicos para γ RBD luego de las dos inmunizaciones (Fig. 51C).

Encontramos que el candidato vacunal Np- γ RBD logró contener la infección viral en pulmón, en niveles comparables al candidato Alum+ γ RBD. En lavado nasal pudimos observar un efecto más marcado con una menor carga viral en animales inmunizados con Np- γ RBD y Alum+ γ RBD comparado con el control que recibió solo γ RBD (Fig. 51D).

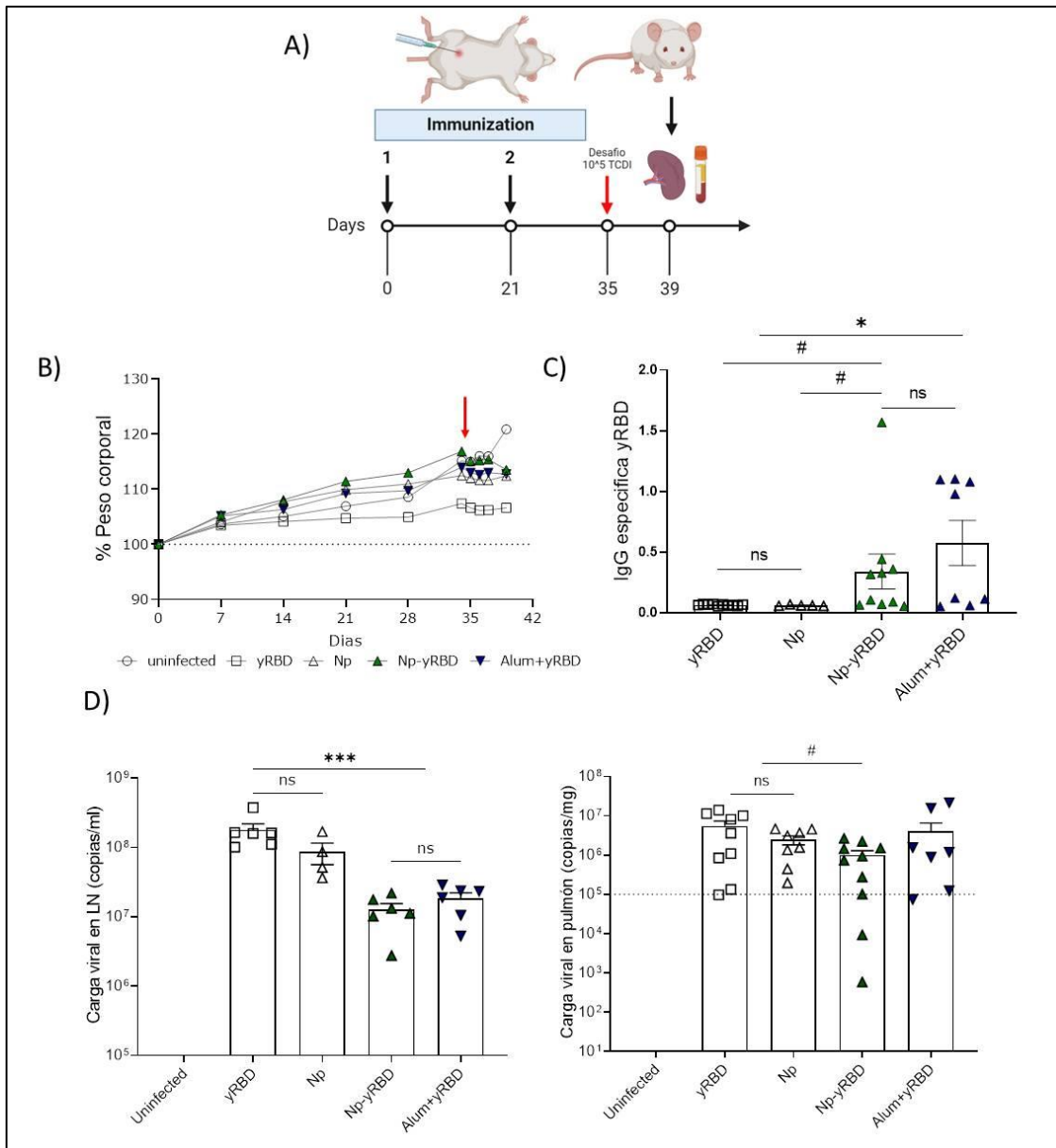


Figura 51: Análisis de la protección del candidato vacunal Np-yRBD al desafío nasal con virus SARS-CoV-2 variante Wuhan en ratones K18-hACE2. A) Esquema de inmunización e infección. B) Monitoreo del peso semanalmente (pre-infección) y diariamente (post-infección). C) Cuantificación por ELISA de IgG específica sérica correspondiente al día 34 (pre-infección). D) Cuantificación de carga viral detectada por RT-PCR en pulmón y lavado nasal. Las distintas condiciones experimentales se llevaron a cabo por duplicado, se grafica la media con su desviación estándar. (ANOVA * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$. t-Student # $P < 0.05$).

A partir de estos resultados podemos concluir que el candidato Np-yRBD logró contener de manera parcial y local, en lavado nasal y pulmón, la infección por el virus SARS-CoV-2 en los ratones K18-hACE2.

2.2.2 Estudios histopatológicos de animales vacunados con Np-yRBD y desafiados con SARS-CoV-2

Los estudios histopatológicos de los animales K18-hACE2 infectados con SARS-CoV-2 fueron realizados en la Universidad Nacional del Litoral en el Centro de Medicina Comparada (UNL-ICIVET-CMC). Para los estudios de toxicidad se tomaron muestras de hígado y pulmón de algunos animales de cada lote. En la Figura 52 se representan en formato *heat map* la severidad de las lesiones observadas y la distribución del daño en cada tejido. Estos datos fueron analizados en conjunto con la carga viral encontrada en pulmón y lavado nasal. Se comparan lotes de animales que recibieron Np o yRBD como controles, con animales que fueron inmunizados con Np-yRBD o Alum+yRBD.

Al considerar las lesiones en hígado, la vacuolización citoplasmática (VC) se observó como lesión severa en un solo animal, el resto de los hallazgos fueron de leves a moderados. La hematopoyesis extramedular (HEM) se asocia directamente con afecciones patológicas y se pudo observar que los animales inmunizados con Np-yRBD fueron los que mostraron con menor frecuencia esta lesión, con una distribución focal, en cambio los demás animales presentaron una distribución multifocal y algunos con un mayor grado de severidad. La esteatosis (E) se encontró de igual manera en animales inmunizados Np-yRBD y Alum+yRBD. Con lo que respecta a la congestión (Co) no se puede alcanzar una conclusión ya que se podría asociar al método de eutanasia y no se encontró infiltrado (I) de ningún tipo celular. En los pulmones, un solo animal inmunizado con Np-yRBD presentó un infiltrado (I) mixto (linfoplasmocitario y neutrofilico). Las lesiones encontradas relativas a la hiperplasia de neumocitos tipo II (HN2) fueron leves a moderadas sin diferencia aparente entre las distintas condiciones de inmunización. En relación a la hemorragia (H) y congestión (Co) no se observó ninguna diferencia entre los grupos y las lesiones se pueden deber al método eutanásico.

(DO) con 50 mg/mL de PLV. Se cuantificaron los signos clínicos en base a los valores ya definidos y se estableció el score clínico individual (Fig. 53C y tabla 3). Como parámetro *in vivo* de la sensibilización IgE se realizó la prueba cutánea y observamos que los animales que recibieron PLV-TC presentaron una mayor hinchazón con coloración azul, debido a la degranulación de mastocitos en la zona de inoculación post-inoculación del alérgeno PLV (Fig. 53D).

Tabla 3: Signos clínicos en animales alérgicos a PLV.

Puntaje	Signos clínicos observados
0	Sin síntomas
1	Rascado de nariz y cabeza y enrojecimiento alrededor de nariz y cabeza
2	Hinchazón alrededor de ojos y boca, pelo erizado, baja actividad general y/o baja actividad con aumento de frecuencia respiratoria
3	Respiración dificultosa, cianosis alrededor de la boca y cola
4	Inactividad, convulsiones
5	Muerte

Como puede apreciarse en la Figura 53, los animales que recibieron PLV+TC mostraron un score clínico significativamente mayor que los animales que sólo recibieron PLV. Asimismo, se obtuvieron muestras de sangre de los ratones y se evaluaron los niveles de los isotipos Th2, IgG1 e IgE, específicos para PLV en suero (Fig. 53E y F). Los ratones sensibilizados mostraron mayores niveles de ambos isotipos específicos con respecto a los ratones de los lotes controles. Además, en los animales sensibilizados con PLV y TC se detectaron altos niveles de citoquinas tipo 2 como mL-13 e mL-5 en comparación con los animales que solo recibieron PLV. Estos resultados indican que los animales sensibilizados por vía intragástrica con PLV+TC indujeron la producción y secreción de IgE e IgG1, citoquinas tipo 2 y la instauración de síntomas compatibles con una alergia cuando fueron desafiados con PLV por la vía oral.

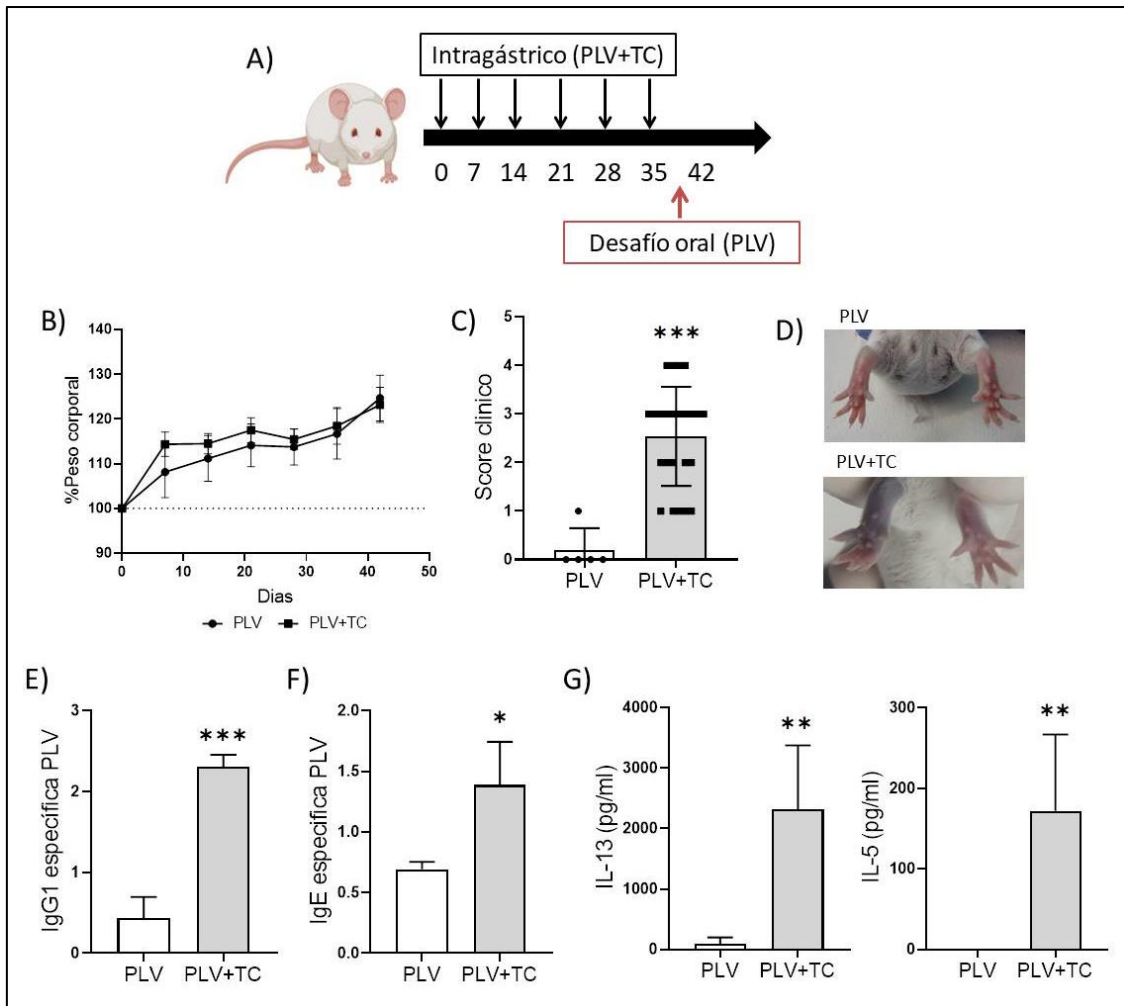


Figura 53: Sensibilización de ratones Balb/c. A) Esquema de sensibilización. B) Monitoreo del peso semanalmente durante la sensibilización. C) Determinación del score clínico (tabla 3). D) Prueba cutánea. Cuantificación por ELISA de IgG1 (E) e IgE (F) específica para PLV. G) Cuantificación por ELISA de citoquinas Th2 mL-13 e mL-5 en sobrenadante de cultivo de esplenocitos estimulados con PLV. (ANOVA * $P < 0.05$; *** $P < 0.001$).

Una vez inducida y establecida la alergia se procedió a la desensibilización administrando β -lactoglobulina encapsulada en la Np (Np- β lacto) por vía intragástrica. Previamente evaluamos la capacidad de encapsulación de β -lactoglobulina ($pI=5.2$ ²³⁹) por parte de la Np. Encontramos que la capacidad de autoensamblado y encapsulación depende de la concentración final de proteína. La situación óptima la hallamos empleando β -lactoglobulina 50 μ g/mL de proteína final, que permitió una encapsulación superior al 60% (Fig. 54).

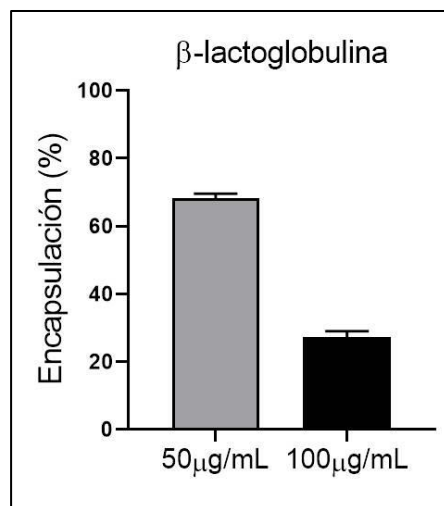


Figura 54: Porcentaje de encapsulación de β -lactoglobulina en la Np.

En base a este dato aplicamos en los tratamientos por vía intragástrica 10 μ g de β -lactoglobulina en 200 μ L de solución (50 μ g/mL), dos veces por semana durante cuatro semanas (Fig. 55A). Decidimos aplicar una primera ronda de tratamiento, realizar un desafío oral (PLV 10 mg) y evaluar el score clínico de los animales, para luego aplicar una segunda ronda de tratamiento.

Luego del tratamiento completo logramos evidenciar una disminución en los síntomas y signos clínicos característicos de la alergia luego de las dos rondas en los animales sensibilizados que recibieron Np- β lacto en comparación a los animales que recibieron PBS (Fig. 55B). Encontramos que la primera ronda de tratamiento con Np- β -lacto indujo un descenso más marcado de los scores clínicos y que la segunda ronda sólo fue efectiva en algunos animales.

Para entender qué mecanismo mediaba esta modulación de los signos clínicos, evaluamos la respuesta Th1 *in vivo* a través de la prueba de hipersensibilidad retardada o DTH. Se inyectó PLV (20 μ g) en la almohadilla de una de las patas traseras y solución fisiológica (SF) en la opuesta. A las 48/72 horas se midió el espesor de las patas y la comparación entre ambas patas reveló que los animales sensibilizados que recibieron como tratamiento Np- β lacto tenían una menor inflamación que los ratones sensibilizados que recibieron PBS como tratamiento (Fig. 55C). El control de tratamiento con β -lactoglobulina también mostró parámetros de inflamación menores. Para evidenciar la presencia de anticuerpos IgE específicos a PLV funcionales en

mastocitos se realizó la prueba cutánea luego del tratamiento y observamos que los ratones sensibilizados que recibieron como tratamiento Np- β lacto mostraban una menor coloración azul en la almohadilla plantar en comparación a los controles sensibilizados (Fig. 55D). También los ratones sensibilizados y tratados con β -lactoglobulina mostraron una prueba cutánea más débil que los ratones sensibilizados y tratados con PBS. Sin embargo, al evaluar los niveles séricos de IgE específica no evidenciamos un descenso significativo al aplicar el tratamiento con Np- β lacto, sólo una tendencia al descenso. En cambio, los niveles de IgG1 específicos descendieron en comparación con el de los ratones sensibilizados ($p < 0.05$). Resultados similares se obtuvieron en los ratones sensibilizados tratados con β -lactoglobulina (Fig. 55E). Por el contrario, hallamos valores significativamente elevados de IgG2a específica de PLV y de β -lactoglobulina en el suero de ratones sensibilizados y tratados con Np- β lacto en comparación con los animales sensibilizados (Fig. 55F). Estos hallazgos sugieren que el tratamiento con Np- β lacto promueve una respuesta inmunomoduladora Th1-dependiente que permite controlar la inmunidad e inflamación tipo-2 inducida por la sensibilización previa con toxina colérica.

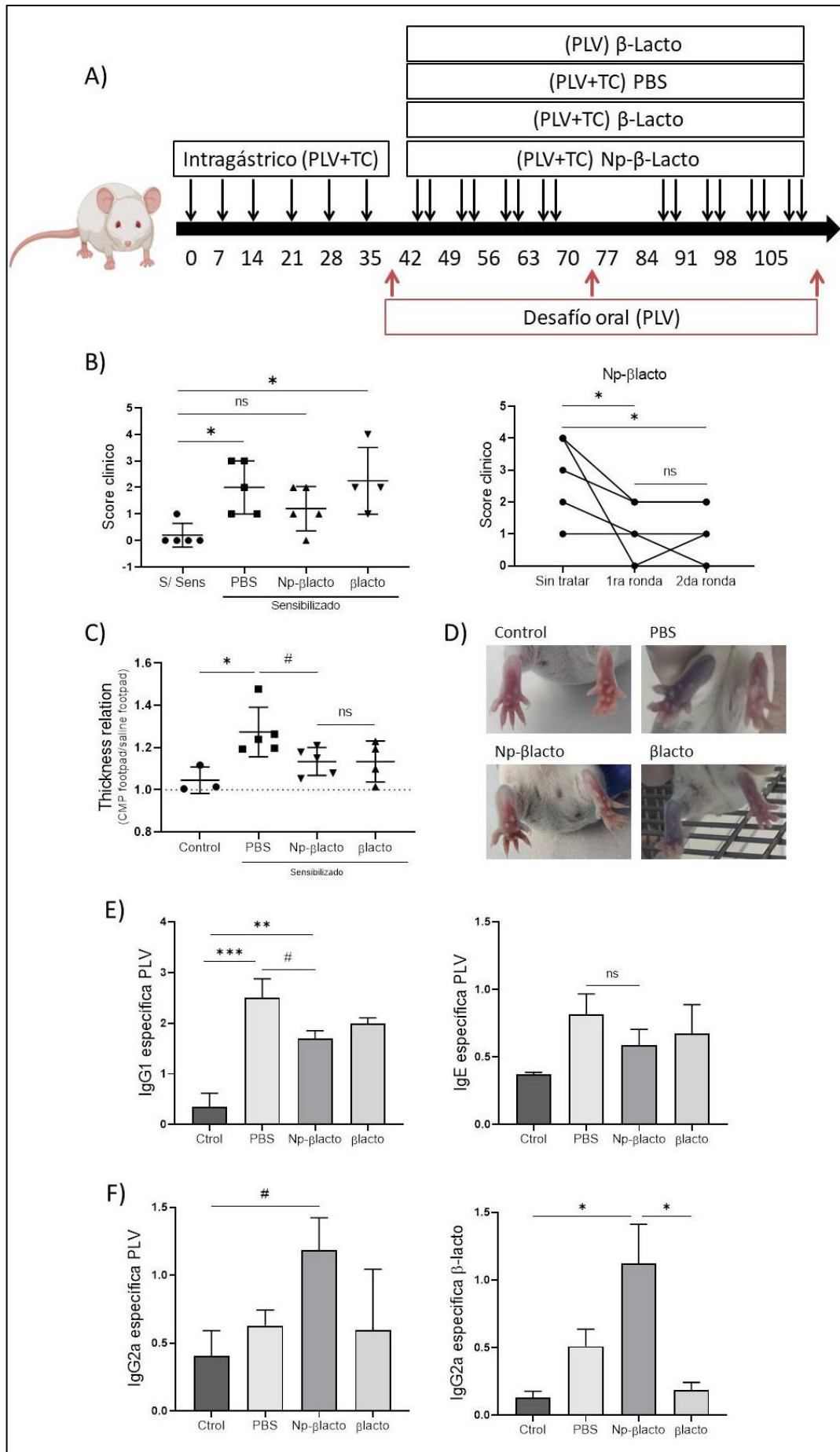


Figura 55: Signos clínicos y respuesta humoral en animales alérgicos tratados con Np- β lactoglobulina. A) Score clínico luego de las dos rondas de tratamiento. B) Determinación de la respuesta de hipersensibilidad retardada (DTH), midiendo la relación del espesor de las patas traseras inoculadas con PLV o SF. C) Prueba cutánea. D) Niveles séricos de IgG1 e IgE específicos de PLV (ELISA y EAST respectivamente) y E) niveles de IgG2a específicos PLV y β -lactoglobulina luego del tratamiento (ELISA). (ANOVA* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$. t-Student # $P < 0.05$).

Para ahondar en la comprensión de los mecanismos regulatorios inducidos por las Np, se analizó la inmunidad celular a través de la cuantificación por ELISA de citoquinas en los sobrenadante de cultivo de esplenocitos estimulados con β -lactoglobulina luego de 72 horas de estímulo. Los resultados indican que luego del tratamiento con PBS, los animales sensibilizados mantienen niveles elevados del mIL-5 e mIL-13. Sin embargo, en los ratones sensibilizados y tratados con Np- β lacto se observó una disminución significativa de estas citoquinas Th2. Llamativamente, no observamos en estos animales una diferencia significativa en la producción de mIFN- γ (Fig. 56A). Al analizar la frecuencia de células dendríticas en lámina propia de intestino delgado observamos un aumento de células dendríticas CD11c⁺CD11b⁺CD8 α ⁺ en animales tratados con Np- β lacto (Fig. 56B y C).

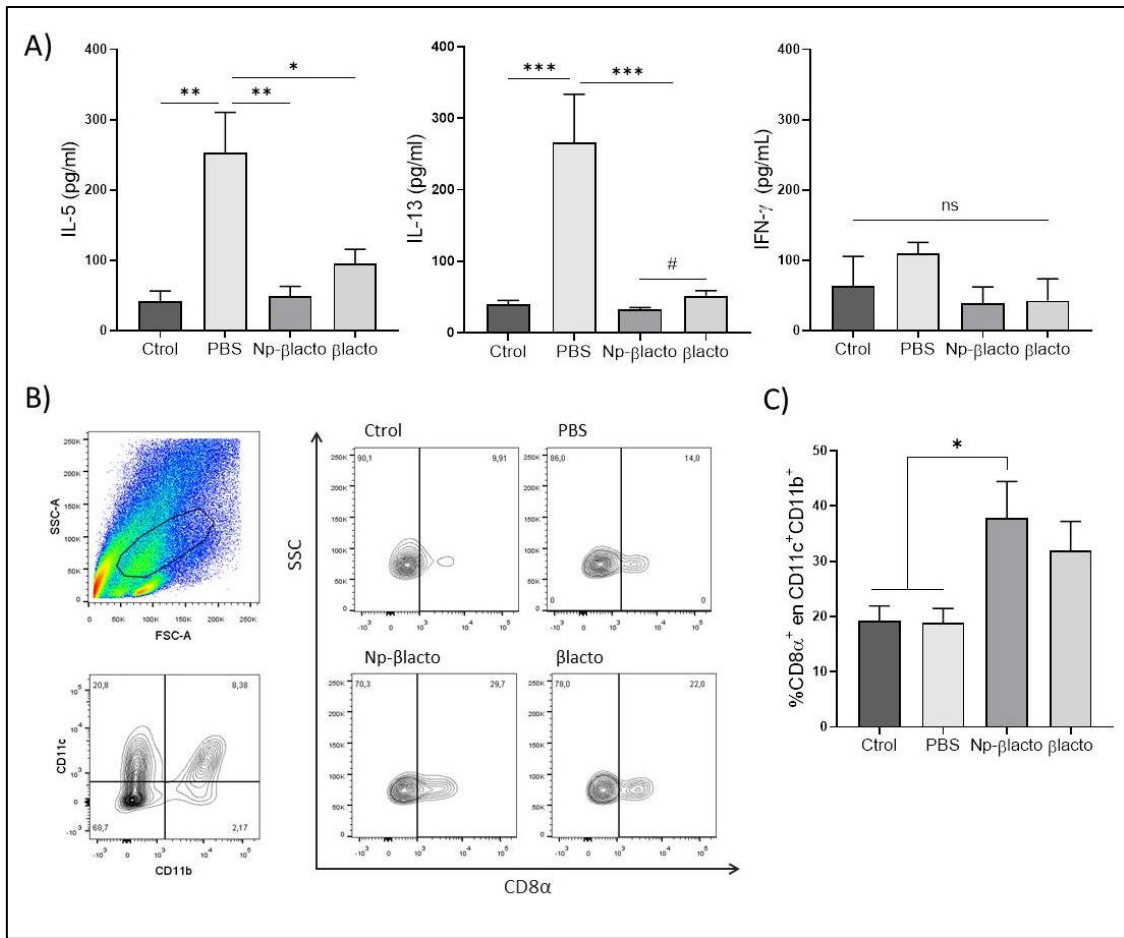


Figura 56: Respuesta celular en animales alérgicos luego del tratamiento con Np-βlacto. A) Cuantificación de los niveles de *mIL-5*, *mIL-13* e *mIFN-γ* en el sobrenadante de cultivo de esplenocitos (ELISA). B) Estrategia de gates para seleccionar células dendríticas $CD8\alpha^+CD11c^+CD11b^+$ en lámina propia. C) Cuantificación y porcentaje de células $CD8\alpha^+$ dentro de la población $CD11c^+CD11b^+$. (ANOVA * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$. t-Student # $P < 0.05$).

Por lo tanto, la administración mucosal de Np-βlacto post-sensibilización alérgica permitió reducir significativamente los síntomas de los animales frente a la exposición al alérgeno nocivo y las pruebas cutáneas, aunque con el protocolo aplicado sólo evidenciamos una tendencia al descenso de los niveles circulantes de IgE. Los niveles elevados de IgG2a indican una inmunomodulación inducida por la vacuna. Estos anticuerpos IgG2a podrían actuar como anticuerpos neutralizantes que evitaron que el alérgeno libre llegue a la IgE en la superficie de las células inflamatorias, lo cual evitó la instauración de las reacciones alérgicas.

Probablemente modificando la dosis de Np-βlacto o el protocolo de administración mucosal nos permitan lograr un descenso significativo en los niveles de IgE circulante y en células sensibilizadas, y un aumento en la secreción de IFN-γ para inducir un perfil de inmunomodulación Th1-dependiente que controle aún más las reacciones alérgicas Th2-dependientes.

Conclusión y discusión

En este capítulo hemos empleado las nanopartículas de polialilamina como vehículo y adyuvante en vacunas preventivas para procesos infecciosos (Brucelosis y COVID-19) y como vacuna terapéutica para procesos no infecciosos (alergia alimentarias IgE-dependientes). Asimismo, las Np fueron utilizadas para la formulación tanto de una vacuna sistémica (COVID-19) como vacuna mucosal (Brucelosis y alergia alimentaria). En todos los casos evidenciamos que las Np estimulan el sistema inmune y generan inmunidad específica, promoviendo un perfil Th1-dependiente.

Brucelosis

Las vacunas comerciales contra *Brucella suis* basadas en cepas atenuadas aprobadas para animales son las únicas que se encuentran en el mercado. Sin embargo, estas vacunas han mostrado problemas de seguridad ²⁴⁰ ya que, por ejemplo, producen abortos en hembras preñadas ²⁴¹, el patógeno sigue siendo infectivo para humanos ^{242,243} e inducen una respuesta inmune que interfiere en el diagnóstico por serología ²⁴⁴. Es por ello que el desarrollo de vacunas acelulares o a base de subunidades proteicas es de carácter urgente debido a que son seguras tanto en la obtención como en la aplicación, son bien definidas en cuanto a la cantidad de antígeno inoculado y no pueden transformarse en patogénicas ⁷⁶. Si bien aún nos debemos un modelo de funcionalidad y protección con el candidato Np-Btaf contra *Brucella suis*, podemos concluir que la inmunización por la vía intranasal generó una inmunidad humoral Th1-dependiente, tanto a nivel sistémico como en la mucosa respiratoria con producción de anticuerpos IgG e IgG2a antígeno específicos. Además, encontramos un aumento en la proliferación de linfocitos T CD4 efectoras (CD44⁺CD62L⁻) y de memoria (CD44⁺CD62L⁺) en los ganglios linfáticos drenantes al sitio de inmunización.

COVID-19

Logramos optimizar la formulación para el candidato vacunal contra el SARS-CoV-2, con 50 µg de γRBD en 500 µL de Np por dosis. Dicha concentración es similar a la que emplearon Limonta-Fernandez y colaboradores en los ensayos pre-clínicos²⁴⁵ y en los ensayos clínicos para el candidato vacunal Abdala, formulada con RBD obtenida en levaduras y sales de aluminio como adyuvante^{231,232}. En cambio, Covovax y Nanovax que también son vacunas acelulares a base de proteína S utilizan el adyuvante Matrix-M. Este adyuvante se basa en una saponina extraída del árbol *Quillaja saponaria* y se formula en conjunto con fosfolípidos y colesterol^{246,247}. Sin embargo estas vacunas utilizan solo 5 µg de proteína por dosis administrada²⁴⁸. En las inmunizaciones con Np-γRBD evidenciamos un aumento la producción de anticuerpos IgG e IgG2a específicos para RBD y en la proliferación de linfocitos T CD4 y CD8 productores de IFN-γ. Finalmente los ensayos funcionales mostraron que la vacuna induce una inmunidad humoral y celular que logró contener la replicación viral en las vías aéreas superiores (lavado nasal) e inferiores (pulmón) del tracto respiratorio. Asimismo, el candidato vacunal mostró parámetros de seguridad aceptables y no observaron daños mayores en órganos blancos.

Alergia alimentaria

Los PAMPs agonistas de TLR4^{81,225}, el oligonucleótido CpG²⁴⁹ agonista de TLR9 y las nanopartículas de PAH/Tpp aquí descritas presentan propiedades adyuvantes que inducen un perfil inmunológico Th1-dependiente. De esta manera la administración mucosal del candidato vacunal Np-βlacto logró modular la alergia alimentaria a las proteínas de la leche en ratones sensibilizados con PLV y toxina colérica. Luego del tratamiento con Np-βlacto se detectaron altos niveles de IgG2a tanto para PLV como para β-lactoglobulina, y no se evidenció una disminución en los niveles de IgE sistémica. Sin embargo, el score clínico y los niveles de IgG1 (isotipo pro-Th2) específico en suero disminuyeron luego de finalizado el tratamiento. En cuanto a la respuesta celular, observamos una disminución en las citoquinas Th2 con niveles de

IL-5 e IL-13 por debajo de los límites de detección ²⁵⁰. Así mismo evidenciamos un aumento en la población de células dendríticas CD8 α ⁺, quienes juegan un rol clave en la diferenciación hacia un perfil Th1 ²⁵¹⁻²⁵³. Es destacable que la modulación de la alergia con Np- β lacto fue más intensa que la tolerancia inducida en el lote de animales sensibilizados que fueron tratados con bajas dosis β -lactoglobulina por vía intragástrica. Con estos resultados se demuestra que los adyuvantes pro-Th1, como los mencionados anteriormente, pueden ser utilizados para el tratamiento de alergias alimentarias y de esta manera disminuir la cantidad de alérgeno utilizado para la desensibilización y reducir la intensidad de los signos clínicos y los efectos adversos que puedan generarse durante el tratamiento.

DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

GENERALES

Esta tesis se enfocó en la caracterización biológica e inmunológica de nanopartículas poliméricas autoensamblantes, con el objetivo de profundizar en el mecanismo de acción de las mismas como vehículo y como adyuvante, y su aplicación como una nueva plataforma vacunal para enfermedades infecciosas (COVID-19 y Brucelosis) y no infecciosas (alergias alimentarias). Los datos surgidos de este trabajo han sido incluidos en dos patentes nacionales e internacionales y en trabajos científicos, de manera que permitirán avanzar en el conocimiento de la respuesta inmune con este nuevo adyuvante y en su aplicación en una novedosa plataforma vacunal para administraciones sistémicas y mucosales.

La síntesis de las nanopartículas resultó ser un procedimiento experimental sencillo, de bajo costo, reproducible y con variables experimentales altamente manejables en función de las características del producto a obtener. Nuestros resultados demostraron que las nanopartículas mantienen sus propiedades en forma estable en el tiempo en distintos medios y temperaturas y que encapsulan proteínas con diferentes puntos isoeléctricos, aunque con diferente eficiencia. Encontramos que las Np son captadas exclusivamente por células presentadoras de antígeno (células dendríticas y macrófagos), se localizan intracelularmente en endosomas tempranos y tardíos, e inducen la disrupción de los mismos con la traslocación de sus componentes al citosol. Su internalización indujo la activación celular y la liberación de las citoquinas pro-inflamatorias IL-1 β e IL-18. Por el contrario, no evidenciamos su internalización por células epiteliales mucosales no fagocíticas. La bibliografía describe la permeabilización de la membrana lisosomal como uno de los mecanismos que promueve la activación del inflamosoma^{96,97}. El empleo de distintos inhibidores nos permitió estudiar una posible vía de activación que incluye a la catepsina B, como principal activador del inflamosoma, y con el uso de células macrofágicas derivadas de médula ósea de ratones que no expresan componentes de la vía del inflamosoma confirmamos que la activación celular dependía del receptor NLRP3 y de caspasa-1, no así de caspasa-11. De esta manera se demuestra que las Np activan por la vía canónica al inflamosoma NLRP3. Sin embargo, observamos que la liberación de IL-1 β no dependía de la formación de poros de gasdermina D, lo que se asocia con una liberación lenta de dicha citoquina y que no induce en la célula muerte celular por piroptosis¹⁴⁴.

Los mecanismos de activación de la inmunidad innata por parte de los adyuvantes se encuentran en constante estudio. Es sabido que las sales de aluminio, como el hidróxido de aluminio, ampliamente utilizado en vacunas para humanos, son capaces de mejorar la eficacia y duración de la respuesta inmune por efecto depot (liberación lenta del mismo) y agregación de antígenos que mejora la absorción y activación de las CPA. Además, se ha demostrado que el alum o hidróxido de alum activa la vía NLRP3 del inflamosoma. Por lo tanto, utilizamos como adyuvantes el hidróxido de aluminio y las Np en la formulación de vacunas preventivas. De esta manera, evaluamos la capacidad adyuvante de las Np y comprobamos que potencian la respuesta inmune por la vía sistémica (inmunización intraperitoneal) y la mucosal (inmunización intranasal e intragástrica). En conclusión, observamos que las Np activan la inmunidad innata a través de la vía del inflamosoma y posteriormente, la inmunidad adaptativa humoral y celular Th1-dependiente. En todos los casos observamos la inducción de anticuerpos específicos IgG e IgG2a en sangre y en las mucosas (lavado broncoalveolar y saliva) y la expansión de linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ productores de IFN- γ . Asimismo, corroboramos *in vivo* que la síntesis de anticuerpos específicos del isotipo Th1 y la producción de IFN- γ son dependientes de NLRP3 y de caspasa-1.

Para el caso de las vacunas mucosales, se requiere un vehículo protector y de direccionamiento de los componentes vacunales a los sitios inmunes de interés para montar una respuesta inmune específica. En este trabajo encontramos que las Np PAH/Tpp son estables y mantienen sus condiciones nativas en el tracto gastrointestinal y en el respiratorio, y que son internalizadas en células presentes en los sitios inductivos. Cabe destacar que la migración de las Np hacia los ganglios linfáticos mesentéricos y mediastínicos, dependiendo de la vía de inoculación, se produce a través de células dendríticas y que las mismas son activadas luego de la internalización de las Np. Este hecho resulta esencial para promover la activación de linfocitos T específicos naive. Según algunos autores, las células dendríticas cargadas con el antígeno pueden migrar y no sólo alcanzar los ganglios mesentéricos sino que también pueden captar antígenos en las Placas de Peyer²⁵⁴. Pero además de mantener su integridad en las mucosas y ser internalizadas por células dendríticas, las Np indujeron inmunidad humoral y celular específicas por las vías intranasal e intragástrica. Esto

significa que las Np además lograron proteger al antígeno. Luego de la inmunización intragástrica se observó un aumento en la frecuencia de células dendríticas CD86⁺CD80⁺ y células CD103⁺CD8α⁺ en órganos linfoides secundarios⁵⁰. Si bien dichas células son características de un perfil tolerogénico, las células dendríticas CD103⁺ presentan la capacidad de migrar del intestino a los ganglios mesentéricos para inducir la expansión, proliferación y diferenciación de linfocitos T a células efectoras, que migran a la mucosa, y células de memoria que migran a médula ósea (memoria sistémica) y a la mucosa (memoria local). En cambio, las células dendríticas CD8α⁺, además de poseer la capacidad de realizar presentación cruzada, inducen un perfil e diferenciación Th1^{168,169,255}.

Dada la importancia de las vacunas mucosales para contener enfermedades que se transmiten por mucosas y generar una inmunidad mucosal más potente, rápida y duradera, junto a una inmunidad sistémica, decidimos evaluar la presencia de isotipos específicos séricos y mucosales, linfocitos T sistémicos y de memoria mucosales. Pero además, observamos que la administración combinada de las vacunas intraperitoneal e intranasal conteniendo ambas a las nanopartículas indujo una inmunidad humoral más potente con la inducción de anticuerpos IgG e IgA específicos en BAL y una mayor frecuencia de linfocitos T CD4 y CD8 residentes de memoria en la mucosa respiratoria (CD45⁻CD62L⁻CD69⁺). Consideramos estos resultados destacables, ya que la memoria celular es fundamental para que el sistema inmune pueda actuar de manera rápida y efectiva sobre una reinfección local. Siguiendo este lineamiento, se puede pensar en utilizar la inmunización mucosal como refuerzo en un esquema de inmunización tradicional o sistémica. Además, el hecho de emplear un vehículo protector permitiría reducir la cantidad de inmunógeno a administrar y dirigirlo al tejido y células de interés. Por otro lado, las Np activan a la misma célula de la inmunidad innata que procesará y presentará los péptidos provenientes del inmunógeno a los linfocitos T específicos.

Por otro lado, observamos que las Np promueven la disrupción de los endosomas, tanto en macrófagos como en células dendríticas, lo cual induce dos efectos en simultáneo: la salida al citosol de las Np para activar la vía canónica del inflamósoma y la translocación del inmunógeno para que sea procesado y presentado

en el contexto de MHC clase I por la vía biosintética. Este proceso de presentación cruzada de antígenos posibilita que un antígeno exógeno (en este caso OVA o γ RBD) activen y expandan linfocitos T CD8. Este mecanismo es fundamental para activar linfocitos T naïve específicos de microorganismos que no invaden células dendríticas. El hecho de haber detectado la expansión de linfocitos T CD8 productores de IFN- γ con las distintas vacunas es un indicativo que este mecanismo es inducido por las mismas.

Evidenciamos que la respuesta adaptativa inducida por las nanopartículas depende de la activación del inflamosoma, pero al igual que el hidróxido de aluminio, no requiere de un agonista de receptores tipo toll (TLR) para desencadenar dicha activación, como si lo necesita a nivel *in vitro* en células presentadoras de antígeno, donde la primera señal para activar el inflamosoma está mediada por LPS y la segunda señal, por las Np. Si a estos adyuvantes individuales se les adiciona un agonista de la inmunidad innata, la formulación vacunal podría estimular y dirigir una activación de la inmunidad innata más eficiente, y así mejorar la respuesta adaptativa final ²⁵⁶. Sin embargo, en este caso habrá que estudiar cuidadosamente la seguridad de las mismas. Esto es lo que ha diseñado GlaxoSmithKline en su adyuvante AS01, que contiene dos componentes adyuvantes en un liposoma: MPL (agonista TLR4) y QS-21 (saponina que activa el inflamosoma NLRP3 y promueve una inmunidad Th1-dependiente)²⁵⁷. El liposoma ingresa a la célula en zonas de membrana plasmática ricas en colesterol, se aloja en los endosomas y finalmente promueve la secreción de IL-1 β e IL-18 ^{27,152}. Vale mencionar que la inmunidad humoral y celular de AS01, al igual que la Np, depende fuertemente de la actividad de catepsina B para activar el inflamosoma ¹²⁴. La particularidad que presenta AS01, como los otros adyuvantes comerciales de GSK, es que las dos moléculas juntas inducen un patrón de activación innato que no puede ser inducido por ninguna de las dos moléculas individualmente, independientemente de la dosis. Es por ello que es importante el uso de liposomas u otros sistemas capaces de encapsular más de un componente y dirigirlo a una misma célula ²⁹.

Los receptores intracelulares como el TLR9 y los NLR activan células innatas como macrófagos y células dendríticas pro-inflamatorias (M1 y CD1) secretoras de IL-12, IL-1 e IL-18. La respuesta innata de estas células genera una activación de la inmunidad adaptativa con inducción y proliferación de células Th1 y Tc1, las cuales

producen y secretan IFN- γ , siendo fundamental no sólo para eliminar células infectadas, sino también promover la activación y reclutamiento de macrófagos al sitio de infección, intensificando la inflamación en el sitio de infección y/o inmunización. La inducción de este tipo de mecanismos efectores es lo deseado en infecciones virales y bacterianas intracelulares. Los resultados obtenidos con el inmunógeno de concepto OVA nos permitió plantear la aplicación de las vacunas preventivas formuladas con Np en dos enfermedades infecciosas como COVID-19 y brucelosis. Asimismo, y por la capacidad de generar inmunidad dependiente de IFN- γ , planteamos aplicar esta vacuna en una inmunoterapia inmunomoduladora para alergia alimentaria. Tanto para el candidato vacunal preventivo, como para el terapéutico se utilizó la Np como adyuvante y como vehículo en una plataforma vacunal para diversas aplicaciones.

Si bien el empleo de modelos experimentales tiene la ventaja que permite evaluar la seguridad, inmunogenicidad y protección, debemos tener en cuenta que tanto COVID-19 como la alergia alimentaria no son enfermedades que se producen naturalmente en la especie ratón. Para el caso de COVID-19, se deben emplear ratones transgénicos para el receptor ACE2 humano bajo el promotor de la citoqueratina 18, de manera que el SARS-CoV-2 pueda invadir células epiteliales mucosales y generar una patología muy similar a la que se observa en pacientes con COVID-19. Para el caso de alergia alimentaria, ésta no se produce en forma espontánea en ratones expuestos al alérgeno y se debe aplicar un procedimiento de sensibilización empleando toxina colérica junto al alérgeno por vía intragástrica. Esto determina que luego la extrapolación al humano pueda tener sus limitaciones. Sin embargo, los estudios pre-clínicos son de gran utilidad y aportan información relevante al momento de plantear una fase clínica. En este trabajo pudimos determinar que las Np no tienen efecto tóxico en hígado o pulmón y fueron capaces de generar inmunidad humoral y celular y protegieron parcialmente ratones K18 desafiados con SARS-CoV-2 variante Wuhan.

Como se mencionó anteriormente, las nanopartículas de PAH/Tpp con propiedades adyuvantes, al igual que el oligonucleótido CpG (agonistas de TLR), induce un perfil inmunológico Th1-dependiente con altos niveles de IgG2a específicos. De esta manera la Np logró modular las reacciones alérgicas IgE-dependientes en ratones expuestos oralmente a proteínas de leche de vaca. Luego del tratamiento con Np se

evidencio una disminución en los signos clínicos, en los niveles de IgG1 en suero y en los niveles de IL-5 e IL-13 en los cultivos de esplenocitos de los animales alérgicos tratados con Np. Por lo tanto, los adyuvantes pro-Th1 pueden ser utilizados como adyuvantes en las formulaciones de vacunas terapéuticas para el tratamiento de alergias alimentarias

En conclusión, con los modelos *in vitro* e *in vivo* aplicados hemos caracterizado una nanopartícula polimérica y autoensamblante de PAH/Tpp, con carga negativa, esférica y con 200 nm de diámetro, con capacidad de encapsular y proteger proteínas de diferente peso molecular y punto isoeléctrico, que activa células fagocíticas de la inmunidad innata y que se puede emplear como plataforma vacunal al formularlas junto a diferentes inmunógeno en vacunas sistémicas y mucosales, preventivas o terapéuticas, dado que inducen inmunidad innata y adaptativa humoral y celular específicas y memoria inmune. La capacidad de promover una respuesta inflamatoria controlada y una inmunidad adaptativa Th1-dependiente las hace altamente promisorias para ser empleadas en vacunas para procesos infecciosos y no infecciosos.

BIBLIOGRAFIA

1. Di Pasquale, A., Preiss, S., Da Silva, F. T. & Garçon, N. Vaccine adjuvants: From 1920 to 2015 and beyond. *Vaccines* **3**, 320–343 (2015).
2. Plotkin, S. A. Vaccines: Past, present and future. *Nat. Med.* **11**, S5 (2005).
3. Liu, M. A. Vaccine developments. *Nat. Med.* **4**, 515–519 (1998).
4. Plotkin, S. History of vaccination. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **111**, 12283–12287 (2014).
5. Plotkin, S. A. & Plotkin, S. L. The development of vaccines: How the past led to the future. *Nat. Rev. Microbiol.* **9**, 889–893 (2011).
6. Yoo, J. H. What We Do Know and Do Not Yet Know about COVID-19 Vaccines as of the Beginning of the Year 2021. *J. Korean Med. Sci.* **36**, 1–17 (2021).
7. Pardi, N., Hogan, M. J., Porter, F. W. & Weissman, D. mRNA vaccines—a new era in vaccinology HHS Public Access. *Nat Rev Drug Discov* **17**, 261–279 (2018).
8. Sardesai, N. Y. & Weiner, D. B. Electroporation delivery of DNA vaccines: Prospects for success. *Curr. Opin. Immunol.* **23**, 421–429 (2011).
9. Zhao, L. *et al.* Nanoparticle vaccines. *Vaccine* **32**, 327–337 (2014).
10. Crommelin, D. J. A., Sindelar, R. D. & Meibohm, B. Pharmaceutical biotechnology: Fundamentals and applications. *Pharm. Biotechnol. Fundam. Appl.* 1–653 (2019) doi:10.1007/978-3-030-00710-2.
11. Nanishi, E., Dowling, D. J. & Levy, O. Toward precision adjuvants: Optimizing science and safety. *Curr. Opin. Pediatr.* **32**, 125–138 (2020).
12. Pulendran, B., Li, S. & Nakaya, H. I. Systems vaccinology. *Immunity* **33**, 516–529 (2010).
13. Pulendran, B. & Davis, M. M. The science and medicine of human immunology. *Science (80-.)*. **369**, (2020).
14. Criado, M. T., Sánchez, S. & Ferreirós, C. M. Vacunología clásica y nuevas tecnologías en el diseño de vacunas. *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.* **26**, 564–572 (2008).
15. Francis E, A. Vaccinology: past achievements, present roadblocks and future promises. *Vaccine* **21**, 593–595 (2003).
16. Callaway, E. & Mallapaty, S. Novavax offers first evidence that COVID vaccines protect people against variants. *Nature* vol. 590 17 (2021).
17. Tian, J. H. *et al.* SARS-CoV-2 spike glycoprotein vaccine candidate NVX-CoV2373 immunogenicity in baboons and protection in mice. *Nat. Commun.* **12**, (2021).
18. Parums, D. V. Editorial: First Approval of the Protein-Based Adjuvanted Nuvaxovid (NVX-CoV2373) Novavax Vaccine for SARS-CoV-2 Could Increase Vaccine Uptake and Provide Immune Protection from Viral Variants. *Med. Sci. Monit.* **28**, 27–29 (2022).
19. Alameh, M. G. *et al.* Lipid nanoparticles enhance the efficacy of mRNA and protein subunit vaccines by inducing robust T follicular helper cell and humoral responses. *Immunity* **54**, 2877–2892.e7 (2021).

20. Gupta, R. K. & Siber, G. R. Adjuvants for human vaccines-current status, problems and future prospects. *Vaccine* **13**, 1263–1276 (1995).
21. Kwissa, M., Kasturi, S. P. & Pulendran, B. The science of adjuvants. *Expert Rev. Vaccines* **6**, 673–684 (2007).
22. Baylor, N. W., Egan, W. & Richman, P. Aluminum salts in vaccines - US perspective. *Vaccine* **20**, 18–23 (2002).
23. Blin, A. *Vaccine adjuvants. Actualites Pharmaceutiques* vol. 58 (2019).
24. Pulendran, B., S. Arunachalam, P. & O'Hagan, D. T. Emerging concepts in the science of vaccine adjuvants. *Nat. Rev. Drug Discov.* **20**, 454–475 (2021).
25. Tom, J. K. *et al.* Applications of Immunomodulatory Immune Synergies to Adjuvant Discovery and Vaccine Development. *Trends Biotechnol.* **37**, 373–388 (2019).
26. Ghosh, T. K. *et al.* TLR-TLR cross talk in human PBMC resulting in synergistic and antagonistic regulation of type-1 and 2 interferons, IL-12 and TNF- α . *Int. Immunopharmacol.* **7**, 1111–1121 (2007).
27. Didierlaurent, A. M. *et al.* AS04, an Aluminum Salt- and TLR4 Agonist-Based Adjuvant System, Induces a Transient Localized Innate Immune Response Leading to Enhanced Adaptive Immunity. *J. Immunol.* **183**, 6186–6197 (2009).
28. Morel, S. *et al.* Adjuvant System AS03 containing α -tocopherol modulates innate immune response and leads to improved adaptive immunity. *Vaccine* **29**, 2461–2473 (2011).
29. Leroux-Roels, G. *et al.* Evaluation of the immune response to RTS,S/AS01 and RTS,S/AS02 adjuvanted vaccines: Randomized, double-blind study in malaria-naïve adults. *Hum. Vaccines Immunother.* **10**, 2211–2219 (2014).
30. Laupèze, B., Hervé, C., Di Pasquale, A. & Tavares Da Silva, F. Adjuvant Systems for vaccines: 13 years of post-licensure experience in diverse populations have progressed the way adjuvanted vaccine safety is investigated and understood. *Vaccine* **37**, 5670–5680 (2019).
31. Bouzeyen, R. & Javid, B. Therapeutic Vaccines for Tuberculosis: An Overview. *Front. Immunol.* **13**, 1–10 (2022).
32. Garbuglia, A. R., Lapa, D., Sias, C., Capobianchi, M. R. & Del Porto, P. The Use of Both Therapeutic and Prophylactic Vaccines in the Therapy of Papillomavirus Disease. *Front. Immunol.* **11**, 1–14 (2020).
33. Bousquet, J. *et al.* Allergen immunotherapy: Therapeutic vaccines for allergic diseases. *Ann. Allergy, Asthma Immunol.* **81**, 401–405 (1998).
34. Chen, K. & Cerutti, A. Vaccination strategies to promote mucosal antibody responses. *Immunity* **33**, 479–491 (2010).
35. Holmgren, J. & Czerkinsky, C. Mucosal immunity and vaccines. *Nat. Med.* **11**, S45 (2005).
36. Jiang, X. *et al.* Skin infection generates non-migratory memory CD8 + T RM cells providing global skin immunity. *Nature* **483**, 227–231 (2012).

37. Gebhardt, T. *et al.* Memory T cells in nonlymphoid tissue that provide enhanced local immunity during infection with herpes simplex virus. *Nat. Immunol.* **10**, 524–530 (2009).
38. Wakim, L. M., Woodward-Davis, A. & Bevan, M. J. Memory T cells persisting within the brain after local infection show functional adaptations to their tissue of residence. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **107**, 17872–17879 (2010).
39. Turner, D. L. & Farber, D. L. Mucosal resident memory CD4 T cells in protection and immunopathology. *Front. Immunol.* **5**, (2014).
40. Reinhardt, R. L., Khoruts, A., Merica, R., Zell, T. & Jenkins, M. K. Visualizing the generation of memory CD4 T cells in the whole body. *Nature* **410**, 101–105 (2001).
41. Pilapitiya, D., Wheatley, A. K. & Tan, H. X. Mucosal vaccines for SARS-CoV-2: triumph of hope over experience. *eBioMedicine* **92**, 104585 (2023).
42. Zens, K. D., Chen, J. K. & Farber, D. L. Vaccine-generated lung tissue–resident memory T cells provide heterosubtypic protection to influenza infection. *JCI Insight* **1**, 1–12 (2019).
43. Hassan, A. O. *et al.* A single intranasal dose of chimpanzee adenovirus–vectored vaccine protects against SARS-CoV-2 infection in rhesus macaques. *Cell Reports Med.* **2**, 100230 (2021).
44. Wu, S. *et al.* Safety, tolerability, and immunogenicity of an aerosolised adenovirus type-5 vector-based COVID-19 vaccine (Ad5-nCoV) in adults: preliminary report of an open-label and randomised phase 1 clinical trial. *Lancet Infect. Dis.* **21**, 1654–1664 (2021).
45. Reddy, S. T., Swartz, M. A. & Hubbell, J. A. Targeting dendritic cells with biomaterials: developing the next generation of vaccines. *Trends Immunol.* **27**, 573–579 (2006).
46. Babensee, J. E. Interaction of dendritic cells with biomaterials. *Semin. Immunol.* **20**, 101–108 (2008).
47. Francica, J. R. *et al.* Star nanoparticles delivering HIV-1 peptide minimal immunogens elicit near-native envelope antibody responses in nonhuman primates. *PLoS Biol.* **17**, 1–28 (2019).
48. Bai, L. *et al.* Natural killer T (NKT)-B-cell interactions promote prolonged antibody responses and long-term memory to pneumococcal capsular polysaccharides. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **110**, 16097–16102 (2013).
49. Vetro, M. *et al.* Preparation and immunogenicity of gold glyco-nanoparticles as antipneumococcal vaccine model. *Nanomedicine* **12**, 13–23 (2017).
50. Santambrogio, L. *et al.* Extracellular antigen processing and presentation by immature dendritic cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **96**, 15056–15061 (1999).
51. Zhang, Y., Li, M., Du, G., Chen, X. & Sun, X. Advancedoral vaccine delivery strategies for improving the immunity. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **177**, 113928 (2021).
52. Zolnik, B. S., González-Fernández, Á., Sadrieh, N. & Dobrovolskaia, M. A. Minireview: Nanoparticles and the immune system. *Endocrinology* **151**, 458–465 (2010).
53. Bachmann, M. F. & Jennings, G. T. Vaccine delivery: A matter of size, geometry, kinetics and molecular patterns. *Nat. Rev. Immunol.* **10**, 787–796 (2010).

54. Lai, S. K., Wang, Y. Y. & Hanes, J. Mucus-penetrating nanoparticles for drug and gene delivery to mucosal tissues. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **61**, 158–171 (2009).
55. Huang, M., Zhang, M., Zhu, H., Du, X. & Wang, J. Mucosal vaccine delivery: A focus on the breakthrough of specific barriers. *Acta Pharm. Sin. B* **12**, 3456–3474 (2022).
56. De Matteis, V. Exposure to inorganic nanoparticles: Routes of entry, immune response, biodistribution and in vitro/In vivo toxicity evaluation. *Toxics* **5**, (2017).
57. Ahamed, M., AlSalhi, M. S. & Siddiqui, M. K. J. Silver nanoparticle applications and human health. *Clin. Chim. Acta* **411**, 1841–1848 (2010).
58. Sharma, G. *et al.* Polymer particle shape independently influences binding and internalization by macrophages. *J. Control. Release* **147**, 408–412 (2010).
59. Irvine, D. J. & Read, B. J. Shaping humoral immunity to vaccines through antigen-displaying nanoparticles. *Curr. Opin. Immunol.* **65**, 1–6 (2020).
60. Jo, E. K., Kim, J. K., Shin, D. M. & Sasakawa, C. Molecular mechanisms regulating NLRP3 inflammasome activation. *Cell. Mol. Immunol.* **13**, 148–159 (2016).
61. Boraschi, D. *et al.* Nanoparticles and innate immunity: new perspectives on host defence. *Semin. Immunol.* **34**, 33–51 (2017).
62. Xia, T., Li, N. & Nel, A. E. Potential health impact of nanoparticles. *Annu. Rev. Public Health* **30**, 137–150 (2009).
63. Gause, K. T. *et al.* Immunological Principles Guiding the Rational Design of Particles for Vaccine Delivery. *ACS Nano* **11**, 54–68 (2017).
64. Yang, E. J., Kim, S., Kim, J. S. & Choi, I. H. Inflammasome formation and IL-1 β release by human blood monocytes in response to silver nanoparticles. *Biomaterials* **33**, 6858–6867 (2012).
65. Hornung, V. *et al.* Silica crystals and aluminum salts activate the NALP3 inflammasome through phagosomal destabilization. *Nat. Immunol.* **9**, 847–856 (2008).
66. Lunov, O. *et al.* Amino-functionalized polystyrene nanoparticles activate the NLRP3 inflammasome in human macrophages. *ACS Nano* **5**, 9648–9657 (2011).
67. He, W. T. *et al.* Gasdermin D is an executor of pyroptosis and required for interleukin-1 β secretion. *Cell Res.* **25**, 1285–1298 (2015).
68. Shi, J. *et al.* Inflammatory caspases are innate immune receptors for intracellular LPS. *Nature* **514**, 187–192 (2014).
69. Kayagaki, N. *et al.* Non-canonical inflammasome activation targets caspase-11. *Nature* **479**, 117–121 (2011).
70. Man, S. M. & Kanneganti, T. D. Regulation of inflammasome activation. *Immunol. Rev.* **265**, 6–21 (2015).
71. Yen, H. J., Hsu, S. H. & Tsai, C. L. Cytotoxicity and immunological response of gold and silver nanoparticles of different sizes. *Small* **5**, 1553–1561 (2009).
72. Demento, S. L. *et al.* Inflammasome-activating nanoparticles as modular systems for

- optimizing vaccine efficacy. *Vaccine* **27**, 3013–3021 (2009).
73. Mamo, T. & Poland, G. A. Nanovaccinology: the next generation of vaccines meets 21st century materials science and engineering. *Vaccine* vol. 30 6609–6611 (2012).
 74. Weischenfeldt, J. & Porse, B. Bone marrow-derived macrophages (BMM): Isolation and applications. *Cold Spring Harb. Protoc.* **3**, 1–7 (2008).
 75. Sheridan, B. S. & Lefrançois, L. Isolation of mouse lymphocytes from small intestine tissues. *Curr. Protoc. Immunol.* (2012) doi:10.1002/0471142735.im0319s99.
 76. Muñoz González, F. *et al.* The BtaF Adhesin Is Necessary for Full Virulence During Respiratory Infection by *Brucella suis* and Is a Novel Immunogen for Nasal Vaccination Against *Brucella* Infection. *Front. Immunol.* **10**, 1775 (2019).
 77. Consortium, A. A. Covalent coupling of Spike’s receptor binding domain to a multimeric carrier produces a high immune response against SARS-CoV-2. *Sci. Rep.* **12**, 692 (2022).
 78. Bienzle, D. *et al.* Preface. in *Jubb, Kennedy & Palmer’s Pathology of Domestic Animals: Volume 1 (Sixth Edition)* (ed. Maxie, M. G.) i–iii (W.B. Saunders, 2016). doi:https://doi.org/10.1016/B978-0-7020-5317-7.00019-9.
 79. Nolte, T. *et al.* Nonproliferative and proliferative lesions of the gastrointestinal tract, pancreas and salivary glands of the rat and mouse. *J. Toxicol. Pathol.* **29**, 1S-124S (2016).
 80. Smaldini, P. *et al.* In vivo evidence of cross-reactivity between cow’s milk and soybean proteins in a mouse model of food allergy. *Int. Arch. Allergy Immunol.* **158**, 335–346 (2012).
 81. Smaldini, P. L., Ibañez, A. E., Fossati, C. A., Cassataro, J. & Docena, G. H. Oral delivery of *Brucella* spp. recombinant protein U-Omp16 abrogates the IgE-mediated milk allergy. *Hum. Vaccines Immunother.* **10**, 2015–2023 (2014).
 82. Smaldini, P. L., Delgado, M. L. O., Fossati, C. A. & Docena, G. H. Orally-induced intestinal CD4+ CD25+ FoxP3+ treg controlled undesired responses towards oral antigens and effectively dampened food allergic reactions. *PLoS One* **10**, 1–14 (2015).
 83. Smaldini, P., Trejo, F., Cohen, J., Piaggio, E. & Docena, G. Systemic IL-2/anti-IL-2Ab complex combined with sublingual immunotherapy suppresses experimental food allergy in mice through induction of mucosal regulatory T cells. *Exp. Allergy Immunol.* (2018) doi:10.1111/all.13402.
 84. Marrugo Padilla, A. *et al.* Carbonylation induced by antibiotic and pesticide residues on casein increases its IgE binding and allergenicity. *Free Radic. Res.* **56**, 28–39 (2022).
 85. Lawrence, P. G. & Lapitsky, Y. Ionically cross-linked poly(allylamine) as a stimulus-responsive underwater adhesive: Ionic strength and pH effects. *Langmuir* **31**, 1564–1574 (2015).
 86. Lawrence, P. G., Patil, P. S., Leipzig, N. D. & Lapitsky, Y. Ionically Cross-Linked Polymer Networks for the Multiple-Month Release of Small Molecules. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **8**, 4323–4335 (2016).
 87. Goldsmith, D. R., Scott, L. J., Cvetković, R. S. & Plosker, G. L. Sevelamer hydrochloride: A

- review of its use for hyperphosphataemia in patients with end-stage renal disease on haemodialysis. *Drugs* **68**, 85–104 (2008).
88. Aoyama, S., Matsumoto, Y., Mori, C. & Sota, K. Application of novel mixed mode chromatography (MMC) resins having a hydrophobic modified polyallylamine ligand for monoclonal antibody purification. *J. Chromatogr. B* **1191**, 123072 (2022).
 89. Chang, Y. C. *et al.* Rapid detection of gut microbial metabolite trimethylamine n-oxide for chronic kidney disease prevention. *Biosensors* **11**, (2021).
 90. Agazzi, M. L. *et al.* Continuous assembly of supramolecular polyamine-phosphate networks on surfaces: preparation and permeability properties of nanofilms. *Soft Matter* **15**, 1640–1650 (2019).
 91. Herrera, S. E. *et al.* Polyelectrolyte-multivalent molecule complexes: physicochemical properties and applications. *Soft Matter* (2023) doi:10.1039/d2sm01507b.
 92. Liquori, A. M. *et al.* Complexes between DNA and polyamines: a molecular model. *J. Mol. Biol.* **24**, 113–122 (1967).
 93. De Silva, U. K., Brown, J. L. & Lapitsky, Y. Poly(allylamine)/tripolyphosphate coacervates enable high loading and multiple-month release of weakly amphiphilic anionic drugs: An: in vitro study with ibuprofen. *RSC Adv.* **8**, 19409–19419 (2018).
 94. Cuenca, V. E. *et al.* Polyphosphate Poly(amine) Nanoparticles: Self-Assembly, Thermodynamics, and Stability Studies. *Langmuir* **35**, 14300–14309 (2019).
 95. Moyer, T. J., Zmolek, A. C. & Irvine, D. J. Beyond antigens and adjuvants: Formulating future vaccines. *J. Clin. Invest.* **126**, 799–808 (2016).
 96. Campden, R. I. & Zhang, Y. The role of lysosomal cysteine cathepsins in NLRP3 inflammasome activation. *Arch. Biochem. Biophys.* **670**, 32–42 (2019).
 97. Yadati, T., Houben, T., Bitorina, A. & Shiri-Sverdlov, R. The Ins and Outs of Cathepsins: Physiological Function and Role in Disease Management. *Cells* **9**, (2020).
 98. Fadeel, B. Clear and present danger ? Engineered nanoparticles and the immune system. 1–9 (2012) doi:10.4414/smw.2012.13609.
 99. Kawai, T. & Akira, S. The role of pattern-recognition receptors in innate immunity : update on Toll-like receptors. *Nat. Publ. Gr.* **11**, 373–384 (2010).
 100. Iwasaki, A. & Medzhitov, R. Control of adaptive immunity by the innate immune system. **16**, 343–353 (2015).
 101. Reis e Sousa, C. *et al.* Ligand – independent Production of Interleukin 12 by Dendritic Cells and their Redistribution to T Cell Areas. *J. Exp. Med.* **186**, 1819–1829 (1997).
 102. Brough, D. & Rothwell, N. J. Caspase-1-dependent processing of pro-interleukin-1 β is cytosolic and precedes cell death. *J. Cell Sci.* **120**, 772–781 (2007).
 103. Arend, W. P., Palmer, G. & Gabay, C. IL-1, IL-18, and IL-33 families of cytokines. *Immunol. Rev.* **223**, 20–38 (2008).
 104. Keller, M., Rügge, A., Werner, S. & Beer, H.-D. Active caspase-1 is a regulator of unconventional protein secretion. *Cell* **132**, 818–831 (2008).

105. Martinon, F., Burns, K. & Tschopp, J. The Inflammasome: A molecular platform triggering activation of inflammatory caspases and processing of proIL- β . *Mol. Cell* **10**, 417–426 (2002).
106. Kroemer, G. & Jäätelä, M. Lysosomes and autophagy in cell death control. *Nat. Rev. Cancer* **5**, 886–897 (2005).
107. Ma, L. *et al.* Characterization of Cathepsin B in Mediating Silica Nanoparticle-Induced Macrophage Pyroptosis via an NLRP3-Dependent Manner. 4537–4545 (2022).
108. Habanjar, O. *et al.* Crosstalk of Inflammatory Cytokines within the Breast Tumor Microenvironment. 1–40 (2023).
109. Sica, A. *et al.* Macrophage polarization in tumour progression. *Semin. Cancer Biol.* **18**, 349–355 (2008).
110. Cutolo, M., Campitiello, R., Gotelli, E. & Soldano, S. The Role of M1/M2 Macrophage Polarization in Rheumatoid Arthritis Synovitis. *Front. Immunol.* **13**, 1–14 (2022).
111. Hoss, F., Rodriguez-Alcazar, J. F. & Latz, E. Assembly and regulation of ASC specks. *Cell. Mol. Life Sci.* **74**, 1211–1229 (2017).
112. Stutz, A., Horvath, G. L., Monks, B. G. & Latz, E. ASC speck formation as a readout for inflammasome activation. *Methods Mol. Biol.* **1040**, 91–101 (2013).
113. Shi, J. *et al.* Cleavage of GSDMD by inflammatory caspases determines pyroptotic cell death. *Nature* **526**, 660–665 (2015).
114. Sborgi, L. *et al.* GSDMD membrane pore formation constitutes the mechanism of pyroptotic cell death. *EMBO J.* **35**, 1766–1778 (2016).
115. Liu, X. *et al.* Inflammasome-activated gasdermin D causes pyroptosis by forming membrane pores. *Nature* **535**, 153–158 (2016).
116. Fink, S. L. & Cookson, B. T. Apoptosis, pyroptosis, and necrosis: Mechanistic description of dead and dying eukaryotic cells. *Infect. Immun.* **73**, 1907–1916 (2005).
117. Fink, S. L. & Cookson, B. T. Caspase-1-dependent pore formation during pyroptosis leads to osmotic lysis of infected host macrophages. *J. Immunol.* **202**, 1913–1926 (2006).
118. Evavold, C. L. *et al.* The Pore-Forming Protein Gasdermin D Regulates Interleukin-1 Secretion from Living Macrophages. *Immunity* **48**, 35–44.e6 (2018).
119. Huertas, J. & Lee, H. T. Multi - faceted roles of cathepsins in ischemia reperfusion injury (Review). **46**, (2022).
120. Wu, T. M., Nan, F. H., Chen, K. C. & Wu, Y. S. *Sarcodia suieae* acetyl-xylogalactan regulate RAW 264.7 macrophage NF-kappa B activation and IL-1 beta cytokine production in macrophage polarization. *Sci. Rep.* **9**, 1–10 (2019).
121. Ruane, D. T. & Lavelle, E. C. The role of CD103+ dendritic cells in the intestinal mucosal immune system. *Front. Immunol.* **2**, 1–6 (2011).
122. Bourque, J. & Hawiger, D. *Immunomodulatory bonds of the partnership between dendritic cells and T cells. Critical Reviews in Immunology* vol. 38 (2018).

123. Chang, C. C., Wu, M. & Yuan, F. Role of specific endocytic pathways in electrotransfection of cells. *Mol. Ther. - Methods Clin. Dev.* **1**, 14058 (2014).
124. Welsby, I. *et al.* Lysosome-dependent activation of human dendritic cells by the vaccine adjuvant QS-21. *Front. Immunol.* **7**, 1–16 (2017).
125. Rashighi, M. & Harris, J. E. 乳鼠心肌提取 HHS Public Access. *Physiol. Behav.* **176**, 139–148 (2017).
126. Wu, K. *et al.* The gut microbial metabolite trimethylamine N-oxide aggravates GVHD by inducing M1 macrophage polarization in mice. *Blood* **136**, 501–515 (2020).
127. Andrejewski, N. *et al.* Normal lysosomal morphology and function in LAMP-1-deficient mice. *J. Biol. Chem.* **274**, 12692–12701 (1999).
128. Eriksson, I., Wäster, P. & Öllinger, K. Restoration of lysosomal function after damage is accompanied by recycling of lysosomal membrane proteins. *Cell Death Dis.* **11**, (2020).
129. Humphries, W. H., Szymanski, C. J. & Payne, C. K. Endo-lysosomal vesicles positive for rab7 and lamp1 are terminal vesicles for the transport of dextran. *PLoS One* **6**, (2011).
130. Rescigno, M. Dendritic cell-epithelial cell crosstalk in the gut. *Immunol. Rev.* **260**, 118–128 (2014).
131. Mazzini, E., Massimiliano, L., Penna, G. & Rescigno, M. Oral Tolerance Can Be Established via Gap Junction Transfer of Fed Antigens from CX3CR1+ Macrophages to CD103+ Dendritic Cells. *Immunity* **40**, 248–261 (2014).
132. Sester, D. P. *et al.* A Novel Flow Cytometric Method To Assess Inflammasome Formation. *J. Immunol.* **194**, 455–462 (2015).
133. Serrano-Puebla, A. & Boya, P. Lysosomal membrane permeabilization in cell death: new evidence and implications for health and disease. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1371**, 30–44 (2016).
134. Averette, K. M. *et al.* Anthrax lethal toxin induced lysosomal membrane permeabilization and cytosolic cathepsin release is Nlrp1b/Nalp1b-dependent. *PLoS One* **4**, 1–4 (2009).
135. Halle, A. *et al.* The NALP3 inflammasome is involved in the innate immune response to amyloid- β . (2008) doi:10.1038/ni.1636.
136. Chávez-Galán, L., Olleros, M. L., Vesin, D. & Garcia, I. Much more than M1 and M2 macrophages, there are also CD169+ and TCR+ macrophages. *Front. Immunol.* **6**, 1–15 (2015).
137. Locati, M., Mantovani, A. & Sica, A. *Macrophage Activation and Polarization as an Adaptive Component of Innate Immunity. Advances in Immunology* vol. 120 (Elsevier Inc., 2013).
138. Bedoui, S. *et al.* Cross-presentation of viral and self antigens by skin-derived CD103+ dendritic cells. *Nat. Immunol.* **10**, 488–495 (2009).
139. Mayorga, L. S., Cebrian, I., Verma, M., Hoops, S. & Bassaganya-Riera, J. Reconstruction of endosomal organization and function by a combination of ODE and agent-based modeling strategies. *Biol. Direct* **13**, 1–21 (2018).

140. Cebrian, I. *et al.* Sec22b regulates phagosomal maturation and antigen crosspresentation by dendritic cells. *Cell* **147**, 1355–1368 (2011).
141. Bruchard, M. *et al.* Chemotherapy-triggered cathepsin B release in myeloid-derived suppressor cells activates the Nlrp3 inflammasome and promotes tumor growth. *Nat. Med.* **19**, 57–64 (2013).
142. Jin, C. & Flavell, R. A. Molecular mechanism of NLRP3 inflammasome activation. *J. Clin. Immunol.* **30**, 628–631 (2010).
143. Campden, R. I. & Zhang, Y. The role of lysosomal cysteine cathepsins in NLRP3 inflammasome activation. *Arch. Biochem. Biophys.* **670**, 32–42 (2019).
144. Monteleone, M. *et al.* Interleukin-1 β Maturation Triggers Its Relocation to the Plasma Membrane for Gasdermin-D-Dependent and -Independent Secretion. *Cell Rep.* **24**, 1425–1433 (2018).
145. Piccioli, P. & Rubartelli, A. The secretion of IL-1 β and options for release. *Semin. Immunol.* **25**, 425–429 (2013).
146. Lopez-Castejon, G. & Brough, D. Understanding the mechanism of IL-1 β secretion. *Cytokine Growth Factor Rev.* **22**, 189–195 (2011).
147. Chan, A. H. & Schroder, K. Inflammasome signaling and regulation of interleukin-1 family cytokines. *J. Exp. Med.* **217**, 1–10 (2020).
148. Baroja-Mazo, A. *et al.* Early endosome autoantigen 1 regulates IL-1 β release upon caspase-1 activation independently of gasdermin D membrane permeabilization. *Sci. Rep.* **9**, 1–10 (2019).
149. Evavold, C. L. & Kagan, J. C. Inflammasomes: Threat-Assessment Organelles of the Innate Immune System. *Immunity* **51**, 609–624 (2019).
150. Zhivaki, D. *et al.* Inflammasomes within Hyperactive Murine Dendritic Cells Stimulate Long-Lived T Cell-Mediated Anti-tumor Immunity. *Cell Rep.* **33**, 108381 (2020).
151. Kaplanski, G. Interleukin-18: Biological properties and role in disease pathogenesis. *Immunol. Rev.* **281**, 138–153 (2018).
152. Coffman, R. L., Sher, A. & Seder, R. A. Vaccine adjuvants: Putting innate immunity to work. *Immunity* **33**, 492–503 (2010).
153. Zhao, K., Xie, Y., Lin, X. & Xu, W. The Mucoadhesive Nanoparticle-Based Delivery System in the Development of Mucosal Vaccines. *Int. J. Nanomedicine* **17**, 4579–4598 (2022).
154. Iwasaki, A. & Medzhitov, R. Regulation of adaptive immunity by the innate immune system. *Science (80-.)*. **327**, 291–295 (2010).
155. Sallusto, F., Lanzavecchia, A., Araki, K. & Ahmed, R. From vaccines to memory and back. *Immunity* **33**, 451–463 (2010).
156. Gomez, M. R. *et al.* Basophils Support the Survival of Plasma Cells in Mice. *J. Immunol.* **185**, 7180–7185 (2010).
157. Ganguly, S., Manicassamy, S., Blackwell, J., Pulendran, B. & Amara, R. R. Adenovirus type 5 induces vitamin A-metabolizing enzymes in dendritic cells and enhances priming

- of gut-homing CD8 T cells. *Mucosal Immunol.* **4**, 528–538 (2011).
158. Uematsu, S. *et al.* Regulation of humoral and cellular gut immunity by lamina propria dendritic cells expressing Toll-like receptor 5. *Nat. Immunol.* **9**, 769–776 (2008).
 159. McElrath, M. J. & Haynes, B. F. Induction of immunity to human immunodeficiency virus type-1 by vaccination. *Immunity* **33**, 542–554 (2010).
 160. Teijaro, J. R. *et al.* Cutting Edge: Tissue-Retentive Lung Memory CD4 T Cells Mediate Optimal Protection to Respiratory Virus Infection. *J. Immunol.* **187**, 5510–5514 (2011).
 161. Turner, D. L. *et al.* Lung niches for the generation and maintenance of tissue-resident memory T cells. *Mucosal Immunol.* **7**, 501–510 (2014).
 162. Nakanishi, Y., Lu, B., Gerard, C. & Iwasaki, A. CD8 + T lymphocyte mobilization to virus-infected tissue requires CD4 + T-cell help. *Nature* **462**, 510–513 (2009).
 163. Mastelic, B. *et al.* Mode of action of adjuvants: Implications for vaccine safety and design. *Biologicals* **38**, 594–601 (2010).
 164. Jiang, X., Mu, H., Hsieh, Y. H. P. & Rao, Q. Isolation and Characterization of Chicken Serum Albumin (Hen Egg Alpha-Livetin, Gal d 5). *Foods* **11**, (2022).
 165. Ho, N. I., Huis in 't Veld, L. G. M., Raaijmakers, T. K. & Adema, G. J. Adjuvants Enhancing Cross-Presentation by Dendritic Cells: The Key to More Effective Vaccines? *Front. Immunol.* **9**, 1–12 (2018).
 166. Wilk, M. M. & Mills, K. H. G. CD4 TRM cells following infection and immunization: Implications for more effective vaccine design. *Front. Immunol.* **9**, 1–8 (2018).
 167. Lesage, S. *et al.* CD4⁺CD8⁺Thymocytes Are Preferentially Induced to Die Following CD45 Cross-linking, Through a Novel Apoptotic Pathway. *J. Immunol.* **159**, (1997).
 168. Schnorrer, P. *et al.* The dominant role of CD8⁺ dendritic cells in cross-presentation is not dictated by antigen capture. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **103**, 10729–10734 (2006).
 169. Kang, S. J. The bloodline of CD8 α ⁺ dendritic cells. *Mol. Cells* **34**, 219–229 (2012).
 170. Querec, T. *et al.* Yellow fever vaccine YF-17D activates multiple dendritic cell subsets via TLR2, 7, 8, and 9 to stimulate polyvalent immunity. *J. Exp. Med.* **203**, 413–424 (2006).
 171. Querec, T. D. *et al.* Systems biology approach predicts immunogenicity of the yellow fever vaccine in humans. *Nat. Immunol.* **10**, 116–125 (2009).
 172. Tsuji, S. *et al.* Maturation of human dendritic cells by cell wall skeleton of *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette-Guérin: Involvement of toll-like receptors. *Infect. Immun.* **68**, 6883–6890 (2000).
 173. Moliva, J. I., Turner, J. & Torrelles, J. B. Immune responses to bacillus Calmette-Guérin vaccination: Why do they fail to protect against mycobacterium tuberculosis? *Front. Immunol.* **8**, (2017).
 174. Murphy, K. M. & Reiner, S. L. The lineage decisions of helper T cells. *Nat. Rev. Immunol.* **2**, 933–944 (2002).
 175. Mathematics, A. 済無No Title No Title No Title. 1–23 (2016)

doi:10.1002/eji.201344072.This.

176. Sui, Y. *et al.* Dual-responsive nanovaccine for cytosolic delivery of antigens to boost cellular immune responses and cancer immunotherapy. *Asian J. Pharm. Sci.* **17**, 583–595 (2022).
177. Berguer, P. M. *et al.* A Polymeric Protein Induces Specific Cytotoxicity in a TLR4 Dependent Manner in the Absence of Adjuvants. *PLoS One* **7**, 1–11 (2012).
178. Cramer, R. & Rhyner, C. Novel vaccines and adjuvants for allergen-specific immunotherapy. *Curr. Opin. Immunol.* **18**, 761–768 (2006).
179. De Souza Rebouças, J. *et al.* Nanoparticulate adjuvants and delivery systems for allergen immunotherapy. *J. Biomed. Biotechnol.* **2012**, (2012).
180. Seder, R. A. & Hill, A. V. S. Infections Requiring Cellular Immunity. *Nature* **406**, 793–798 (2000).
181. Yang, L. *et al.* HHS Public Access. **88**, 2740–2748 (2008).
182. Channappanavar, R., Fett, C., Zhao, J., Meyerholz, D. K. & Perlman, S. Virus-Specific Memory CD8 T Cells Provide Substantial Protection from Lethal Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus Infection. *J. Virol.* **88**, 11034–11044 (2014).
183. Swain, S. L., McKinstry, K. K. & Strutt, T. M. Expanding roles for CD4 + T cells in immunity to viruses. *Nat. Rev. Immunol.* **12**, 136–148 (2012).
184. Pappas, G., Papadimitriou, P., Akritidis, N., Christou, L. & Tsianos, E. V. The new global map of human brucellosis. *Lancet Infect. Dis.* **6**, 91–99 (2006).
185. Pappas, G., Panagopoulou, P., Christou, L. & Akritidis, N. Brucella as a biological weapon. *Cell. Mol. Life Sci.* **63**, 2229–2236 (2006).
186. Traxler, R. M., Lehman, M. W., Bosserman, E. A., Guerra, M. A. & Smith, T. L. A literature review of laboratory-acquired brucellosis. *J. Clin. Microbiol.* **51**, 3055–3062 (2013).
187. von Barmen, K., Gorvel, J. P. & Salcedo, S. P. Internal affairs: Investigating the Brucella intracellular lifestyle. *FEMS Microbiol. Rev.* **36**, 533–562 (2012).
188. Roop, R. M., Gaines, J. M., Anderson, E. S., Caswell, C. C. & Martin, D. W. Survival of the fittest: How Brucella strains adapt to their intracellular niche in the host. *Med. Microbiol. Immunol.* **198**, 221–238 (2009).
189. Ruiz-Ranwez, V. *et al.* BtaE, an adhesin that belongs to the trimeric autotransporter family, is required for full virulence and defines a specific adhesive pole of Brucella suis. *Infect. Immun.* **81**, 996–1007 (2013).
190. Ruiz-Ranwez, V. *et al.* The BtaF trimeric autotransporter of Brucella suis is involved in attachment to various surfaces, resistance to serum and virulence. *PLoS One* **8**, (2013).
191. Lipp, M., Sallusto, F., Lenig, D., Fo, R. & Lanzavecchia, A. Two subsets of memory T lymphocytes with distinct homing potentials. *Nature* **401**, 708–12. (1999).
192. Cuff, C. A. & Puré, E. A crucial role for CD44 in inflammation. *TRENDS Mol. Med.* **7**, 213–221 (2001).

193. Logunov, D. Y. *et al.* Safety and immunogenicity of an rAd26 and rAd5 vector-based heterologous prime-boost COVID-19 vaccine in two formulations: two open, non-randomised phase 1/2 studies from Russia. *Lancet* **396**, 887–897 (2020).
194. van Doremalen, N. *et al.* Publisher Correction: ChAdOx1 nCoV-19 vaccine prevents SARS-CoV-2 pneumonia in rhesus macaques (Nature, (2020), 586, 7830, (578-582), 10.1038/s41586-020-2608-y). *Nature* **590**, E24 (2021).
195. Wang, F., Kream, R. M. & Stefano, G. B. An evidence based perspective on mRNA-SARScov-2 vaccine development. *Med. Sci. Monit.* **26**, 1–8 (2020).
196. Polack, F. P. *et al.* Safety and Efficacy of the BNT162b2 mRNA Covid-19 Vaccine. *N. Engl. J. Med.* **383**, 2603–2615 (2020).
197. Ramanathan, K. *et al.* Since January 2020 Elsevier has created a COVID-19 resource centre with free information in English and Mandarin on the novel coronavirus COVID-research that is available on the COVID-19 resource centre - including this for unrestricted research re-use a. 19–21 (2020).
198. Wang, H. *et al.* Development of an Inactivated Vaccine Candidate, BBIBP-CorV, with Potent Protection against SARS-CoV-2. *Cell* **182**, 713-721.e9 (2020).
199. Keech, C. *et al.* Phase 1–2 Trial of a SARS-CoV-2 Recombinant Spike Protein Nanoparticle Vaccine. *N. Engl. J. Med.* **383**, 2320–2332 (2020).
200. Chan, J. F. W. *et al.* Genomic characterization of the 2019 novel human-pathogenic coronavirus isolated from a patient with atypical pneumonia after visiting Wuhan. *Emerg. Microbes Infect.* **9**, 221–236 (2020).
201. Tanaka, T., Kamitani, W., DeDiego, M. L., Enjuanes, L. & Matsuura, Y. Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus nsp1 Facilitates Efficient Propagation in Cells through a Specific Translational Shutoff of Host mRNA. *J. Virol.* **86**, 11128–11137 (2012).
202. Deng, X. *et al.* Coronavirus nonstructural protein 15 mediates evasion of dsRNA sensors and limits apoptosis in macrophages. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **114**, E4251–E4260 (2017).
203. Kuba, K. *et al.* A crucial role of angiotensin converting enzyme 2 (ACE2) in SARS coronavirus-induced lung injury. *Nat. Med.* **11**, 875–879 (2005).
204. Imai, Y. *et al.* Angiotensin-converting enzyme 2 protects from severe acute lung failure. *Nature* **436**, 112–116 (2005).
205. Raj, V. S. *et al.* Dipeptidyl peptidase 4 is a functional receptor for the emerging human coronavirus-EMC. *Nature* **495**, 251–254 (2013).
206. Du, L. *et al.* The spike protein of SARS-CoV - A target for vaccine and therapeutic development. *Nat. Rev. Microbiol.* **7**, 226–236 (2009).
207. Liu, W. J. *et al.* T-cell immunity of SARS-CoV: Implications for vaccine development against MERS-CoV. *Antiviral Res.* **137**, 82–92 (2017).
208. Belouzard, S., Millet, J. K., Licitra, B. N. & Whittaker, G. R. Mechanisms of coronavirus cell entry mediated by the viral spike protein. *Viruses* **4**, 1011–1033 (2012).
209. Zhao, M. M. *et al.* Cathepsin L plays a key role in SARS-CoV-2 infection in humans and

- humanized mice and is a promising target for new drug development. *Signal Transduct. Target. Ther.* **6**, (2021).
210. Bestle, D. *et al.* TMPRSS2 and furin are both essential for proteolytic activation of SARS-CoV-2 in human airway cells. *Life Sci. Alliance* **3**, 1–14 (2020).
 211. Alkhatib, M. *et al.* Update on SARS-CoV-2 Omicron Variant of Concern and Its Peculiar Mutational Profile. *Microbiol. Spectr.* **10**, 1–12 (2022).
 212. Amanat, F. & Krammer, F. SARS-CoV-2 Vaccines: Status Report. *Immunity* **52**, 583–589 (2020).
 213. Gyles, C. Coronavirus vaccines. *Can. Vet. J.* **61**, 813–815 (2020).
 214. Zhang, J. *et al.* Progress and prospects on vaccine development against sars-cov-2. *Vaccines* **8**, 1–12 (2020).
 215. Wrapp, D. *et al.* Cryo-EM structure of the 2019-nCoV spike in the prefusion conformation. *Science (80-.)*. **367**, 1260–1263 (2020).
 216. Sampson, H. A. & Anderson, J. A. Summary and recommendations: Classification of gastrointestinal manifestations due to immunologic reactions to foods in infants and young children. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* **30 Suppl**, S87-94 (2000).
 217. Parrish, C. P. & Kim, H. Food-Induced Anaphylaxis : an Update. (2018).
 218. Cianferoni, A. & Muraro, A. Food-Induced Anaphylaxis. *Immunol. Allergy Clin. North Am.* **32**, 165–195 (2012).
 219. Sicherer, S. H. & Sampson, H. A. Food allergy. *J. Allergy Clin. Immunol.* **125**, S116–S125 (2010).
 220. Krogulska, A. *et al.* FOXP3, IL-10, and TGF- β genes expression in children with IgE-dependent food allergy. *J. Clin. Immunol.* **31**, 205–215 (2011).
 221. Shreffler, W. G., Wanich, N., Moloney, M., Nowak-Wegrzyn, A. & Sampson, H. A. Association of allergen-specific regulatory T cells with the onset of clinical tolerance to milk protein. *J. Allergy Clin. Immunol.* **123**, 43-52.e7 (2009).
 222. Syed, A. *et al.* Peanut oral immunotherapy results in increased antigen-induced regulatory T-cell function and hypomethylation of forkhead box protein 3 (FOXP3). *J. Allergy Clin. Immunol.* **133**, 500-510.e11 (2014).
 223. Lin, W.-W. & Karin, M. A cytokine-mediated link between innate immunity, ... [J Clin Invest. 2007] - PubMed result. *J. Clin. Invest.* **117**, 1175–83 (2007).
 224. Scheller, J., Chalaris, A., Schmidt-Arras, D. & Rose-John, S. The pro- and anti-inflammatory properties of the cytokine interleukin-6. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.* **1813**, 878–888 (2011).
 225. Ibañez, A. E. *et al.* Unlipidated Outer Membrane Protein Omp16 (U-Omp16) from *Brucella* spp. as Nasal Adjuvant Induces a Th1 Immune Response and Modulates the Th2 Allergic Response to Cow's Milk Proteins. *PLoS One* **8**, 1–13 (2013).
 226. Candreva, Á. M. *et al.* The Major Soybean Allergen Gly m Bd 28K Induces Hypersensitivity Reactions in Mice Sensitized to Cow's Milk Proteins. *J. Agric. Food*

- Chem.* **64**, 1590–1599 (2016).
227. Shirota, H., Sano, K., Kikuchi, T., Tamura, G. & Shirato, K. Regulation of Murine Airway Eosinophilia and Th2 Cells by Antigen-Conjugated CpG Oligodeoxynucleotides as a Novel Antigen-Specific Immunomodulator. *J. Immunol.* **164**, 5575–5582 (2000).
 228. Broide, D. H. *et al.* Systemic administration of immunostimulatory DNA sequences mediates reversible inhibition of Th2 responses in a mouse model of asthma. *J. Clin. Immunol.* **21**, 175–182 (2001).
 229. Teshima, R. *et al.* Effect of oral administration of CpG ODN-OVA on WBB6F1-W/Wv mice. *Allergol. Int.* **55**, 43–48 (2006).
 230. Krebs, F., Scheller, C., Grove-Heike, K., Pohl, L. & Wätzig, H. Isoelectric point determination by imaged CIEF of commercially available SARS-CoV-2 proteins and the hACE2 receptor. *Electrophoresis* **42**, 687–692 (2021).
 231. Hernández-Bernal, F. *et al.* Safety, tolerability, and immunogenicity of a SARS-CoV-2 recombinant spike RBD protein vaccine: A randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 1-2 clinical trial (ABDALA Study). *eClinicalMedicine* **46**, 1–15 (2022).
 232. Más-Bermejo, P. I. *et al.* Cuban Abdala vaccine: Effectiveness in preventing severe disease and death from COVID-19 in Havana, Cuba; A cohort study. *Lancet Reg. Heal. - Am.* **16**, 1–10 (2022).
 233. Winkler, E. S. *et al.* SARS-CoV-2 infection of human ACE2-transgenic mice causes severe lung inflammation and impaired function. *Nat. Immunol.* **21**, 1327–1335 (2020).
 234. Rockx, B. *et al.* Comparative pathogenesis of COVID-19, MERS, and SARS in a nonhuman primate model. *Science (80-.)*. **368**, 1012–1015 (2020).
 235. Cleary, S. J. *et al.* Animal models of mechanisms of SARS-CoV-2 infection and COVID-19 pathology. *Br. J. Pharmacol.* **177**, 4851–4865 (2020).
 236. Curciarello, R. *et al.* Targeting a cross-reactive Gly m 5 soy peptide as responsible for hypersensitivity reactions in a milk allergy mouse model. *PLoS One* **9**, (2014).
 237. Moronta, J., Smaldini, P. L., Fossati, C. A., Añon, M. C. & Docena, G. H. The anti-inflammatory SSEDIKE peptide from Amaranth seeds modulates IgE-mediated food allergy. *J. Funct. Foods* **25**, 579–587 (2016).
 238. Candreva, A. M. *et al.* Cross-reactivity Between P34 and Bovine Caseins AAIR. *Allergy Asthma Immunol Res* **7**, 60–68 (2015).
 239. Ramírez-Navas, J. S., Solís-Carvajal, C. A. & Vélez, C. A. Las proteínas y su importancia. *Entre Cienc. e Ing.* **12**, 52 (2018).
 240. Bialer, M. G. *et al.* Adhesins of brucella: Their roles in the interaction with the host. *Pathogens* **9**, 1–20 (2020).
 241. Davis, D. S. *et al.* Vaccination of Pregnant Cows. **27**, 258–264.
 242. Wallach, J. C., Ferrero, M. C., Victoria Delpino, M., Fossati, C. A. & Baldi, P. C. Occupational infection due to *Brucella abortus* S19 among workers involved in vaccine production in Argentina. *Clin. Microbiol. Infect.* **14**, 805–807 (2008).

243. Blasco, J. M. & Díaz, R. Brucella melitensis Rev-1 vaccine as a cause of human brucellosis. *Lancet* **342**, 805 (1993).
244. Neutra, M. R. & Kozlowski, P. A. Mucosal vaccines: The promise and the challenge. *Nat. Rev. Immunol.* **6**, 148–158 (2006).
245. Limonta-fernández, M., China-santiago, G. & Martín-dunn, A. M. The SARS-CoV-2 receptor-binding domain expressed in Pichia pastoris as a candidate vaccine antigen. (2021).
246. Lövgren, K. & Morein, B. The requirement of lipids for the formation of immunostimulating complexes (iscoms). *Biotechnol. Appl. Biochem.* **10**, 161–172 (1988).
247. Magnusson, S. E. *et al.* Matrix-M™ adjuvant enhances immunogenicity of both protein- and modified vaccinia virus Ankara-based influenza vaccines in mice. *Immunol. Res.* **66**, 224–233 (2018).
248. Serum Institute of India. SARS-CoV-2 rS Protein protein (COVID-19) recombinant spike protein Nanoparticle Vaccine. 412 (2022).
249. Hurtado, P. R. *et al.* CpG oligodeoxynucleotide stimulates production of anti-neutrophil cytoplasmic antibodies in ANCA associated vasculitis. *BMC Immunol.* **9**, 1–9 (2008).
250. Romagnani, S. The increased prevalence of allergy and the hygiene hypothesis: Missing immune deviation, reduced immune suppression, or both? *Immunology* **112**, 352–363 (2004).
251. Orsini Delgado, M. L. *et al.* Sublingual Omp16-driven redirection of the allergic intestinal response in a pre-clinical model of food allergy. *Clin. Exp. Allergy* 1–10 (2020) doi:10.1111/cea.13676.
252. Bilenki, L. *et al.* Dendritic Cells from Mycobacteria-Infected Mice Inhibits Established Allergic Airway Inflammatory Responses to Ragweed via IL-10– and IL-12–Secreting Mechanisms. *J. Immunol.* **184**, 7288–7296 (2010).
253. Maldonado-López, R., Maliszewski, C., Urbain, J. & Moser, M. Cytokines Regulate the Capacity of CD8α+ and CD8α– Dendritic Cells to Prime Th1/Th2 Cells In Vivo. *J. Immunol.* **167**, 4345–4350 (2001).
254. Ibañez, A. E. *et al.* A bacterial protease inhibitor protects antigens delivered in oral vaccines from digestion while triggering specific mucosal immune responses. *J. Control. Release* **220**, 18–28 (2015).
255. Pooley, J. L., Heath, W. R. & Shortman, K. Cutting Edge: Intravenous Soluble Antigen Is Presented to CD4 T Cells by CD8– Dendritic Cells, but Cross-Presented to CD8 T Cells by CD8+ Dendritic Cells. *J. Immunol.* **166**, 5327–5330 (2001).
256. Trinchieri, G. & Sher, A. Cooperation of Toll-like receptor signals in innate immune defence. *Nat. Rev. Immunol.* **7**, 179–190 (2007).
257. Lacaille-Dubois, M. A. Updated insights into the mechanism of action and clinical profile of the immunoadjuvant QS-21: A review. *Phytomedicine* **60**, 152905 (2019).