



Universidad de la República
Facultad de Ciencias

Tesis de Doctorado
PEDECIBA- Biología

DESARROLLO DE UNA NANOVACUNA CONTRA
Echinococcus granulosus PARA SER APLICADA EN EL
HOSPEDERO DEFINITIVO

Dr. U. Benavides (DMTV)

Tribunal:

Dra. J. Maisonnave

Dra. E. Castillo

Dr. E. Méndez

Orientador:

Dra. A. Esteves

Agosto 2018

AGRADECIMIENTOS

A mi esposa Mariana y mi hija Lucía por haberme apoyado siempre, cuando estuve en Lyon-Francia haciendo parte de este trabajo, especialmente a Mariana quien asumió toda la responsabilidad diaria de la familia y a Lucía por haber comprendido la importancia de mi ausencia y haber asumido sacrificios importantes para una niña.

A mis suegros, Ramírez y Ana María por el apoyo que le brindaron siempre a mi familia, durante mis largas estadías en Francia.

A Cristina y a Cacho (que ya no está entre nosotros) vecinos de la Cooperativa, por el apoyo a Mariana y Lucía.

Una especial dedicación a mi madre Evelyn (Coca) que falleció durante el desarrollo de éste Trabajo y a mi padre Ramón Uruguay, que siempre me apoyo y me impulsó a estudiar

A mi tutora la Profesora Dra. Adriana Esteves por la oportunidad que me dio de trabajar en esta Tesis. Por todo lo que me enseñó y sobre todo por la paciencia.

A mis colegas docentes de Inmunología de la Facultad de Veterinaria por asumir mi responsabilidad como docente durante mi estadía fuera, los Profesores Dra. J. Maisonnave, Dr. R. Puentes y Dr. K. Yaneselli.

A mi compañera de nanovacunas la Lic, MSc. Cecilia Silvarrey por la producción de las recombinantes.

A la Profesora A. Petavy por aceptarme en su laboratorio de Parasitología de la Facultad de Farmacia de la Universidad Claude Bernard de Lyon Francia. A mis Profesores del maravilloso mundo de la nanotecnología, el Profesor Eyade Al Mouazen y a la Profesora S. Briancon de la Universidad Claude Bernard Lyon.

A los Profesores del Tribunal, Estela Castillo, Jacqueline Maisonnave y Eduardo Mendez por aceptar más trabajo del que tienen para evaluar esta Tesis.

Al Profesor T. Marshall, Profesor de Patología de la Facultad de Veterinaria de Lyon, Francia por sus enseñanzas en los estudios de patología y de células dendríticas.

A la Comunidad Económica Europea y PEDECIBA Biología.

A TODOS GRACIAS, MUCHAS GRACIAS.

INDICE

AGRADECIMIENTOS	2
INDICE	4
RESUMEN	8
INTRODUCCIÓN	10
1. Hidatidosis	10
2. Ciclo de <i>Echinococcus granulosus</i>	10
3. Variación génica del género <i>Echinococcus</i>	12
4. Distribución de la hidatidosis en el mundo.....	14
4.1. Hidatidosis en América del Sur.....	14
4.2. Hidatidosis en Europa.....	16
4.3. Hidatidosis en el resto del mundo.....	17
5. Control de la Echinococcosis e Hidatidosis.....	19
5.1. Generalidades.....	19
5.2. Control de la Echinococcosis e Hidatidosis en Uruguay.....	19
6. Inmunidad contra helmintos parásitos.....	20
7. Evidencia de inmunidad contra <i>E. granulosus</i> en perros infectados.....	24
8. Antígenos potenciales para desarrollar una vacuna contra <i>E. granulosus</i>	26
8.1. Proteínas musculares.....	26
8.2. Paramiosinas de <i>E. granulosus</i>	27
8.2.1. EG36.....	27
8.2.2. EgA31.....	27
8.3. Tropomiosina de <i>E. granulosus</i>	30
9. Desarrollo de vacunas contra <i>E. granulosus</i>	32
9.1. Vacunas en el hospedero intermediario.....	32
9.2. Vacunas contra <i>E. granulosus</i> en su hospedero definitivo	34
10. Uso de nanopartículas (NPs) en medicina.....	35
11. Uso de nanopartículas en el desarrollo de vacuna.....	36
11.1. Vacunas de mucosas.....	38

OBJETIVOS.....	44
1. Objetivos generales.....	44
2. Objetivos específicos.....	44
MATERIALES Y MÉTODOS.....	45
1. Expresión y purificación del antígeno recombinante rEgTrp.....	45
2. Expresión y purificación del antígeno recombinante rEgA31.....	46
3. Encapsulación de antígenos en NPs.....	46
4. Caracterización de las NPs.....	48
4.1. Tamaño y carga eléctrica.....	48
4.2. Morfología.....	48
4.3. Eficiencia de encapsulación.....	48
5. Evaluación de la integridad e inmunogenicidad del antígeno encapsulado.....	49
5.1. Estudio de integridad.	49
5.2. Estudio de inmunogenicidad.....	50
6. Preparación de NPs funcionalizadas con el adyuvante MPLA (Monophosphoryl Lipid A).....	50
7. Preparación de NPs funcionalizadas con Chitosan.....	51
8. Estabilidad gástrica e intestinal de los antígenos encapsulado	52
9. Protección de las NPs durante del pasaje por el tracto gastrointestinal.....	52
10. Estudio de la estabilidad de las NPs	53
11. Estudios de internalización de las NPs usando un modelo de macrófagos murinos.....	54
11.1 Evaluación de la citotoxicidad	54
11.2 Evaluación de la internalización de NPs en macrófagos murinos.....	55
12. Aislamiento y caracterización de células dendríticas derivadas de monocitos caninos.....	56
13. Análisis del efecto del MPLA sobre las cMoDCs (células dendríticas derivadas de monocitos).....	58
13.1 Viabilidad	58
13.2 Activación	58
14. Evaluación de la internalización de NP por las cMoDCs.	59
15. Evaluación de la activación de células	

dendríticas inmaduras por las NPs formuladas.....	59
16. Ensayo clínico: estudio de la inmunogenicidad de las NPs	61
16.1. Animales.....	61
16.2. Nanopartículas.....	62
16.3. Vacunación.....	62
16.4. Colecta de muestras.....	62
16.5. Determinación de inmunogenicidad.....	63
17. Eficacia de las nanovacunas.....	64
17.1 Animales.....	64
17.2 Nanopartículas.....	64
17.3 Vacunación y desafío.....	64
17.4 Análisis de resultados.....	65
RESULTADOS.....	66
1. Encapsulación de antígenos en NPs.....	66
2. Tamaño de las NPs.....	67
3. Eficiencia de encapsulación.....	70
4. Estudios de inmunogenicidad.....	73
5. Bifuncionalización con Chitosan y Lípido A monofosforilado.....	74
6. Método de conservación de NPs.....	76
7. Evaluación de integridad de los antígenos encapsulados frente a condiciones gastrointestinales.....	79
8. Estudios de internalización de NPs por células presentadoras de antígenos.....	82
8.1. Estudios de internalización en macrófagos.....	83
8.2. Purificación de células dendríticas (cMoDCs) obtenidas de células mononucleares de perros	84
8.3. Efectos de las NPs funcionalizadas con MPLA sobre la viabilidad y activación de las cMoDCs.....	87
8.4. Evaluación de la internalización de NPs en cMoDCS.....	88
8.5. Evaluación de la activación de las cMoDCs purificadas por MACS anti-CD14.....	92
8.5.1. Estudio de marcadores celulares de activación	92

8.5.2. Determinación del grado de activación de las cMoDCs por diferentes formulaciones.....	93
8.6. Estudios clínicos de inmunogenicidad de las diferentes vacunas nanoformuladas	97
8.7. Estudio clínico piloto de vacunación y desafío...	100
DISCUSIÓN	103
1. Formulación y caracterización.....	103
2. Internalización y activación de cMoDCs.....	111
3. Estudios clínicos de inmunogenicidad y Protección.....	120
CONCLUSIONES.....	129
BIBLIOGRAFIA.....	131

RESUMEN

La Echinococcosis e Hidatidosis causada por el cestode *Echinococcus sp*, es una de las más importantes zoonosis a nivel mundial. El control de esta parasitosis se puede realizar mediante el tratamiento de los perros infectados con Praziquantel aunque esto no ha sido totalmente eficiente. El control mediante vacunación en los hospederos intermediarios y/o en los hospederos definitivos es otra alternativa de control. A través de este trabajo nos propusimos desarrollar una vacuna oral para ser aplicada en el hospedero definitivo empleando nanopartículas (NPs). Los antígenos seleccionados fueron las proteínas de *Echinococcus granulosus*, tropomisina y paramiosina. Estos antígenos recombinantes se encapsularon en NPs poliméricas biodegradables, se determinó el tamaño, la carga, la forma, así como la eficiencia de encapsulación (E/E). Por otro lado, se estudió la integridad y la inmunogenicidad de los antígenos luego del proceso de formulación de las NPs. Se funcionalizaron las NPs agregándole MPLA (Monophosphoryl Lipid A) como adyuvante, y Chitosan (CS) para aumentar la adherencia de las NPs al mucus intestinal. Se sometieron las NPs a jugos gástrico e intestinal artificial para determinar el efecto de los mismos sobre las NPs y los antígenos.

Se obtuvieron células dendríticas de perros a partir de monocitos sanguíneos (cMoDCs). Se determinó la capacidad de las NPs de ser internalizadas por macrófagos murinos y células dendríticas de perros. Luego se determinó la capacidad de las NPs para activar cMoDCs. En la última etapa de este trabajo se realizaron una serie de ensayos clínicos pilotos en perros. Se evaluó la inmunogenicidad y la eficacia de las formulaciones de NPs desarrolladas. Los resultados mostraron que se obtuvieron NPs de un tamaño <300nm, con un potencial Zeta

negativo con gran uniformidad de forma y tamaño observado en la microscopía electrónica. El porcentaje de encapsulación de las proteínas paramiosina de *Echinococcus granulosus* (EgA31) y tropomiosina de *Echinococcus granulosus* (EgTrp) fue superior al 80% sin alteración de la integridad ni de la inmunogenicidad. La bifuncionalización con MPLA no alteró las características de las NPs, la E/E, ni la integridad e inmunogenicidad de los antígenos. La funcionalización de las NPs con CS le aportó la carga positiva esperada, sin producir cambios en las propiedades de las NPs y los antígenos. Los jugos gástrico e intestinal artificiales no alteraron las propiedades de las NPs ni integridad e inmunogenicidad de los antígenos. Los experimentos de internalización demostraron que las NPs fueron internalizadas por macrófagos murinos y cMoDCs caninas. Además, las NPs activaron eficientemente las cMoDCs.

Los estudios clínicos de inmunogenicidad demuestran que las NPs desarrolladas activan la inmunidad de mucosas y sistémica, con una respuesta mixta Th1/Th2, sin respuesta de IgE sistémica. Los ensayos clínicos de eficacia con vacunación oral y desafío, mostraron una protección de un 94.5% indicando que estamos frente a un prometedor sistema de "delivery" de antígenos usando nanopartículas biodegradables como vacuna oral de mucosas contra *E. granulosus*.

INTRODUCCIÓN

1) HIDATIDOSIS

La Hidatidosis causada por el cestode *Echinococcus granulosus*, es una de las mayores zoonosis a nivel mundial que afecta tanto al hombre como a los animales domésticos (Echinococcosis quística) (Thompson y Jenkins, 2014; Boufana et al., 2015, Deplazes et al., 2017). Se extiende en todo el continente americano, así como en Europa, Australia, China, Rusia, África y Asia (Deplazes et al., 2017; Ito y Budke 2017; Pavletic et al., 2017). Esta enfermedad, además, es una de las más importantes zoonosis parasitaria reportada en Uruguay, Argentina, Brasil, Chile y Perú (Irabedra y Salvatella 2010; Larrieu y Zanini, 2012, Pavletic et al., 2017).

El género *Echinococcus* (Platyhelminthes, Cestoda) comprende varias especies: *Echinococcus granulosus*, *Echinococcus multilocularis*, *Echinococcus oligarthrus*, *Echinococcus vogeli*, *Echinococcus equinus*, *Echinococcus orteppi*, *Echinococcus felidis*, y *Echinococcus shiquicus* (Thompson y McManus, 2002; Xiao et al., 2006; Huttner et al., 2008; Ita y Budke, 2017). Los miembros de estas especies difieren en la morfología de sus estados larvarios y adultos. Datos recientes basados en estudios genómicos de *E. granulosus* indican que hay por lo menos diez poblaciones genéticamente diferentes (McManus, 2002; McManus y Thompson, 2003, Boufana et al., 2015).

2) CICLO BIOLÓGICO DE *E. granulosus*.

En América del Sur, las ovejas (hospederos intermediarios) y los carnívoros (hospederos definitivos) son los que mantienen el ciclo de *E. granulosus* en la naturaleza (Fig. 1). Este

parásito desarrolla su estadio adulto (tenias) en el intestino de los perros domésticos, o carnívoros salvajes como zorros o lobos, y su estadio larvario (quistes) en los hospederos intermediarios como las ovejas, bovinos, equinos y suinos, y en los hospederos accidentales como el hombre.

Los carnívoros comen las vísceras de los animales infectados ingiriendo de esta manera las larvas las que se establecen en el intestino de los perros desarrollo la tenia adulta. Una vez alcanzada la forma adulta, y alrededor de los 45 días, las tenias poseen huevos infectantes denominados oncósferas que son liberados al medio con las heces de los carnívoros. Las oncósferas son ingeridas por los hospederos intermediarios, así como por los hospederos accidentales, como el hombre, y en los tejidos de estos organismos se desarrollan los quistes que provocan la enfermedad denominada Hidatidosis.

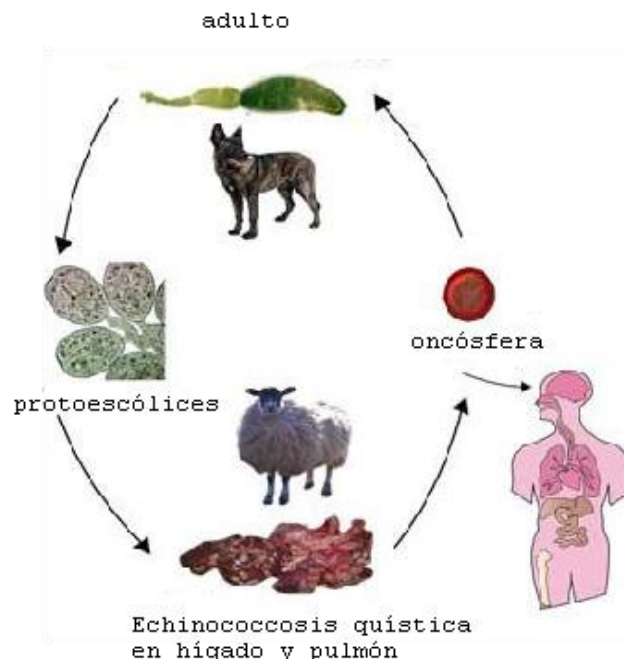


Figura .1 Ciclo de *E. granulosus*.
Tomado de Zhang y McManus, 2008.

3) VARIACIÓN GÉNICA DEL GÉNERO *ECHINOCOCCUS*.

Desde el punto de vista genético se han descrito diez variantes dentro del género *Echinococcus*. Genotipos G1-G3 que incluyen a *E. granulosus sensu stricto (s.s.)*, genotipo G4 que incluye a *E. equinus*, genotipo G5, que incluye a *E. ortleppi* y genotipos G6-G10 que incluye a *E. canadiensis* (Nakao et al., 2007; Thompson, 2008; Cucher et al., 2016; Deplazes et al., 2017; Ito y Budke 2017). Al referirnos en forma genérica a estos genotipos los nombramos como *E. granulosus sensu lato (s.l.)*

En un estudio reciente se ha demostrado que un muy alto porcentaje de individuos (humanos) están infectados con el genotipo G1, (Rojas et al., 2014; Boufana et al., 2015, Cucher et al., 2016 y Deplazes et al., 2017). Los caninos, en particular los perros, constituyen la principal fuente de infección de equinococosis quística en humanos alrededor del mundo, siendo la mayoría de los casos causados por *E. granulosus* genotipo G1 (Boufana et al., 2015). Esta variedad representa la mayor parte de la carga mundial, seguida por *E. canadensis* (G6 y G7) (Cucher et al., 2016; Ito y Budke 2017). En las figuras 2 y 3 se muestra la distribución del género *Echinococcus* a nivel mundial y en América del Sur, respectivamente.

La Hidatidosis en seres humanos y otros hospederos intermediarios en América del Norte, es causada por genotipos asociados a la vida silvestre de *E. canadensis* (G8-G10), presentes en los ovinos, porcinos y ganado bovino (Deplazes et al., 2017, Cucher et al., 2016). *E. canadensis* está presente en Canadá, y G10 parece ser más común en la vida silvestre. Los hospederos definitivos incluyen lobos, coyotes y perros, mientras que los intermediarios son normalmente cérvidos salvajes o criados en cautividad. En México se encontraron los

genotipos G5 (*E. orleppi*) y G7 (*E. intermedius*) (Rodríguez-Prado *et al.*, 2014). Esta información debe ser tomada en cuenta para entender la epidemiología, adaptar los programas locales de control y prevención de la Equinococosis así como la Hidatidosis.

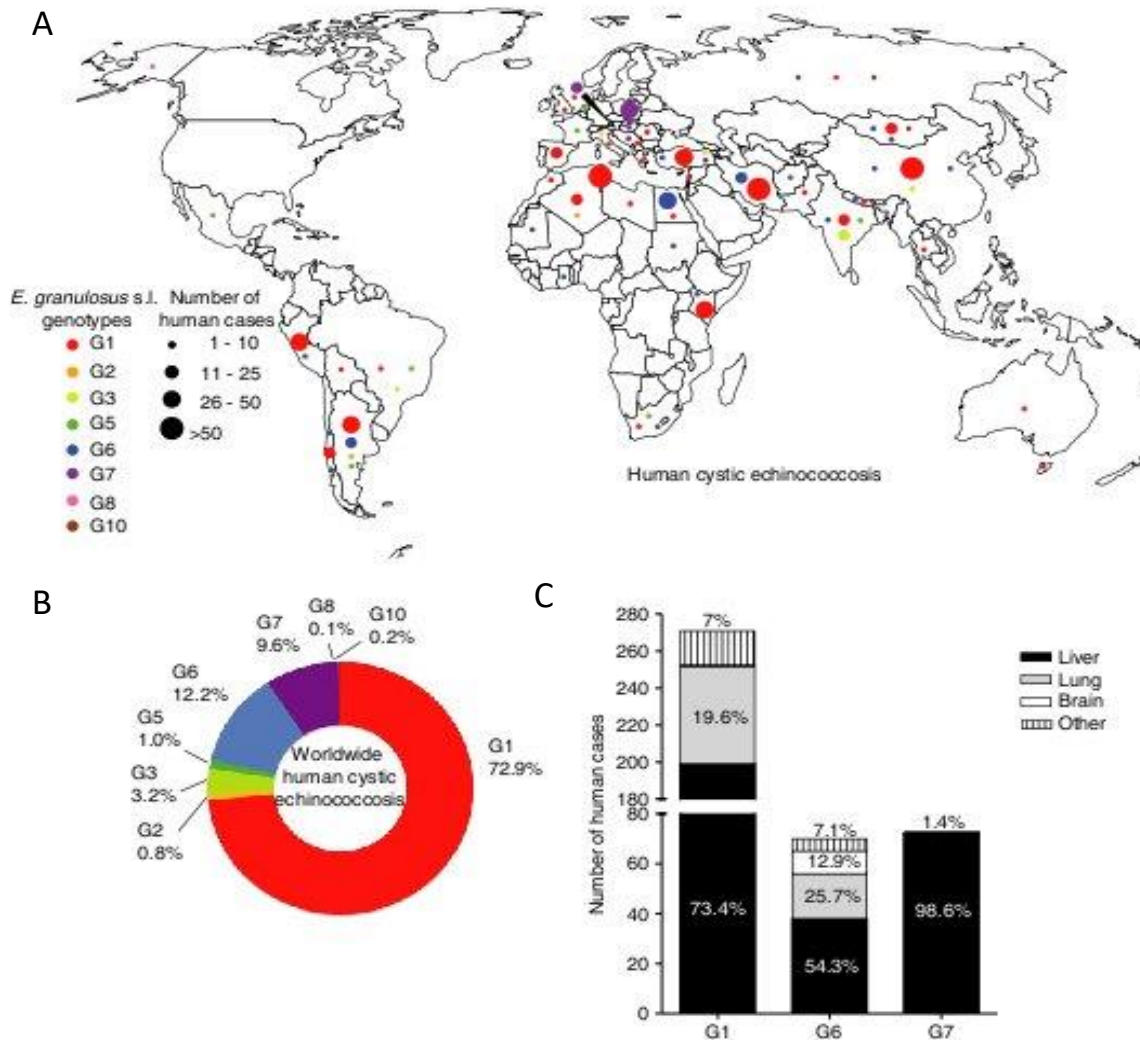


Figura 2. Distribución mundial de las variaciones genéticas del género *Echinococcus*. A) distribución mundial de los genotipos de *E. granulosus* s.l. Identificados en humanos; B) porcentaje de casos de humanos causados por cada genotipo de *E. granulosus* s.l.; C) localización de quistes hidáticos en los órganos en humanos causados por *E. granulosus* s.s. (genotipo G1) y *E. canadensis* (genotipos G6 y G7). La categoría "others" se aplica a localizaciones reportadas en menos de tres casos. Tomado de Cucher *et al.*, 2016.

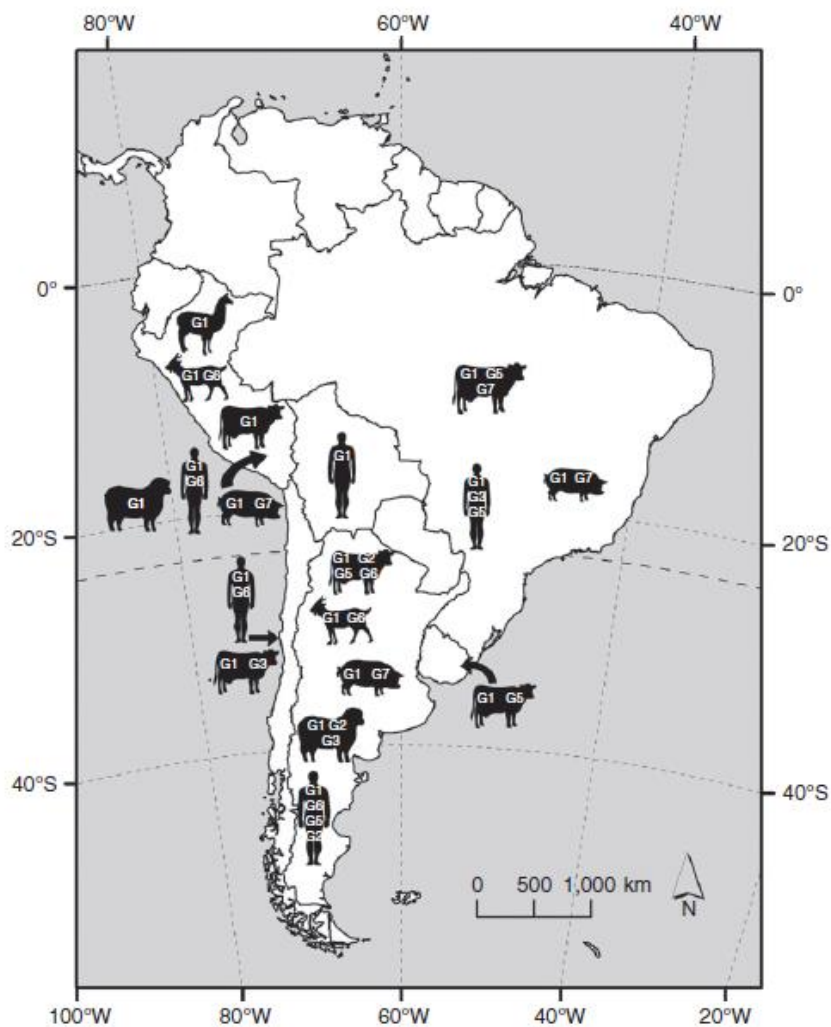


Figura 3. Representación esquemática de la distribución genotípica de *E. granulosus* s.l. aislados en América del Sur. Tomada de Cucher *et al.*, 2016.

4) DISTRIBUCIÓN DE LA HIDATIDOSIS EN EL MUNDO.

4.1) Hidatidosis en América del Sur

La Hidatidosis es endémica en Argentina, Uruguay, Chile, Perú y Brasil (Pavletic *et al.*, 2017). En el 2014 en Uruguay y Argentina se gastaron 365.000 y 856.000 dólares respectivamente para el control de esta zoonosis. La prevalencia de la

echinococcosis quística no ha disminuido en ovinos y bovinos en el período 2009/2014, salvo en Uruguay y Brasil, donde disminuyó drásticamente manteniéndose por debajo de 10% (Pavletic et al., 2017).

Los datos epidemiológicos de América del Sur desde 2009 hasta el 2014 para Uruguay, Argentina, Chile, Perú y Brasil, están basados en información oficial de los organismos encargados del control de esta parasitosis en los diferentes países (Pavletic et al., 2017, Irabedra y Salvatella 2010; Larrieu y Zanini, 2012, Pavletic et al., 2017). En Uruguay, la prevalencia de la Hidatidosis en humanos fue de 57 casos en 2009 a 11 casos en 2014; en ovinos del 5.9% en 2009, al 2.2 % en 2014 y la infestación en perros del 3.2% en 2009 al 1.8% en 2014. En Argentina, en humanos la prevalencia aumentó de 416 casos en el 2009 hasta 777 casos en el 2014. En ovejas no hay datos oficiales y la prevalencia en perros descendió de 17.7% en el 2009 a 13.4% en el 2014. En Brasil, el Estado de Río Grande do Sul, el área endémica más importante del país, mostró una prevalencia casi invariable de 11 casos en humanos en el 2009 al 2014; en ovejas una disminución de 8.76% en el 2009 a 4.64% en el 2014, mientras que no hay datos oficiales de infestación en perros. Perú, es el país de América del Sur con la mayor incidencia y prevalencia de equinocosis quística en seres humanos con tasas de hasta 79/100.000 habitantes en provincias como Pasco y de 39/100.000 habitantes en Huancavelica (OPS, Montevideo, 2009). Estudios realizados al sur de Lima mostraron una incidencia quirúrgica de 32/100.000 habitantes y una prevalencia en caninos de 6,25% en el período 1996-1998 (Moro et al., 2004). En los Yes peruanos la prevalencia en humanos reportada fue de 910/100.000 habitantes y la de ovinos de hasta 87% (Moro et al., 1997), la más alta

reportada en América del Sur. Los datos publicados por Pavletic y colaboradores en 2017 indicaron una prevalencia en humanos de 11/100.000 en 2009 aumentando a 30/100.000 casos en 2011 y disminuyendo nuevamente a 11/100.000 casos en el 2014. La prevalencia de Hidatidosis ovina fue de 8.76% en 2009 a 4.64% en el 2014. En Chile los datos epidemiológicos indican que los casos en humanos fueron de 843 en el 2009 a 832 en el 2014, la Hidatidosis ovina aumentó de 1.4% en 2009 a 2.1 % en el 2014 y no se cuenta con datos oficiales de la infestación en perros (Pavletic et al., 2014). En conclusión si observamos la distribución de esta enfermedad en América del Sur comprobamos que es una parasitosis endémica en Argentina, Chile, Perú, Brasil, y Uruguay por lo que es necesario desarrollar nuevas herramientas de control para esta zoonosis. La presencia de un número importante de nuevos casos al año en niños indica que se están contagiando a temprana edad y que todavía existe transmisión del perro al hombre (Pavletic et al., 2014).

4.2) Hidatidosis en Europa.

En la zona del Mediterráneo y en Gran Bretaña (Gales), el ciclo de vida de *E. granulosus* es predominantemente doméstico, manteniéndose entre perros y ovejas. También existe un ciclo silvestre con los cánidos salvajes como el chacal (*Canis aureus*) y los lobos (*Canis lupus*) en Bulgaria (Breyer et al., 2004). Las regiones más afectadas son España, Italia y la isla de Cerdeña, donde la incidencia anual en humanos alcanza el 4-8/100.000 habitantes (Desplazes et al., 2017). En Bulgaria la Equinococosis quística en niños aumentó de 0.7 a 5.4 cada 100.000 habitantes entre 1970 y 1995 (Todorov y Boeva 1999). En la provincia de Gales en Inglaterra, se usó la educación como herramienta de control, pero la prevalencia en perros se

duplicó desde 1993 (3.4%) a 2002 (8.1%), todo lo cual indica que la educación no es suficiente para controlar esta zoonosis. Por otro lado, con el empleo de la dosificación de los perros cada 6 semanas con Praziquantel en la Rioja, España, fue posible reducir la prevalencia de perros infectados de 7% en 1989 a 0.2% en el 2000, y en humanos de 19/100.000 habitantes en 1980, a 4/100.000 habitantes en el 2000 (Jiménez et al., 2002). La eliminación total de la Hidatidosis en Europa solamente ha sido posible en Islandia. Los programas de control no han tenido demasiado progreso en el resto de la región del Mediterráneo (Batelli et al., 2002).

4.3) Hidatidosis en el resto del mundo

En Australia la biomasa parasitaria del género *Echinococcus* es mantenido principalmente por el ciclo salvaje, a través del eje depredador/presa entre los perros salvajes (dingos) y marsupiales ("wallabies" y canguros) (Jenkins, 2006). Otros hospederos silvestres incluyen zorros y cerdos salvajes. Esta fauna silvestre, reservorio de *E. granulosus*, mantiene el ciclo doméstico a través de la infección por perros salvajes que defecan en los predios rurales e infectan al ganado, a cerdos salvajes y al hombre. La invasión de los perros salvajes y zorros en centros urbanos presenta una nueva vía potencial de transmisión desde la vida silvestre a los humanos (Jenkins et al., 2003). En New South Wales, se determinó una prevalencia de 29% en 344 perros de establecimientos rurales y un 18 % en 218 perros en Victoria. La prevalencia de *E. granulosus* en perros salvajes en el Este de Australia se encuentra entre el 25% y el 100% (Jenkins DJ., 2006).

La Hidatidosis en el Medio Oriente y el Norte de África,

es altamente prevalente en Irán, Turquía, Iraq, Marruecos, Tunez y Libia (Sadjjadi, 2006, Ito y Budke 2017; Deplazes et al., 2017). La equinococosis por *E. granulosus* en el Norte de África ha sido reportada como endémica principalmente en Argelia, Egipto, Libia, Marruecos y Túnez (Desplazes et al., 2017). En todos estos países los camellos son un hospedero intermediario muy importante en el mantenimiento del ciclo de *E. granulosus* en la naturaleza. En Marruecos la Equinococosis quística es altamente endémica. En estudios realizados en áreas rurales mostraron una prevalencia de 33% en perros, 9.9% en ovejas, 3.2% en cabras y 42% en bovinos (Kachani et al., 1997). En humanos se ha reportado una incidencia de 3.6-15.8/100.000 habitantes (Anderson et al., 1997). En Túnez en un estudio mediante necropsia realizado en perros callejeros se determinó que el 21 % de los intestinos de los perros analizados estaban infectados con *E. granulosus* (Lahmar et al., 2001). Las ovejas son el principal hospedero intermediario aunque en algunas regiones de Túnez se observó una prevalencia de 10.1% en camellos (Lahmar et al., 2001, 2004; Deplazes et al., 2017). En humanos se ha comunicado una incidencia de 15/100.000 habitantes (Report of Ministry of Public Health 1993, Túnez). La equinocosis alveolar y quística humana, causada por la ingestión accidental de huevos de las tenias *E. multilocularis* y *E. granulosus* (s.l.), respectivamente, es endémica en Asia (Ito y Budke, 2017) Varias especies de *Echinococcus* se mantienen en mamíferos domesticados y/o salvajes a través de interacciones predador-presa.

5) CONTROL DE LA EQUINOCOCOSIS E HIDATIDOSIS.

5.1) Generalidades

Las primeras medidas de control en América del Sur y en nuestro país han sido basadas en la experiencia de los programas de control de las islas de Tasmania, Nueva Zelanda, Islandia, Chipre y Malvinas, tratando a los animales con Praziquantel (Economides *et al.*, 1998; Craig *et al.*, 2006). Esta droga presenta propiedades únicas como tenicida con 100% de eficacia contra *E. granulosus* presentes en los perros infectados. El Praziquantel tiene la función de cortar el ciclo del parásito antes de que el parásito alcance su estado adulto y elimine sus formas infectantes para los animales domésticos y el hombre, y más importante aún, evitar la contaminación del medio ambiente con estas formas. El Programa de Control se realiza con la dosificación de perros con Praziquantel (5mg/kg), cada 30 días, en forma obligatoria, realizada por un agente oficial de los organismos encargados del control. A pesar de la eficiencia de la droga los programas de control no han sido eficaces debido a que no todos los perros son dosificados.

5.2) Control de la Echinococcosis e Hidatidosis en Uruguay

En Uruguay se comenzó la dosificación a partir de 1992 y el plan de control fue estructurado en forma similar al de Nueva Zelanda. En 1992 la prevalencia en ovejas fue de un 40 %. Posteriormente, a la luz de los resultados experimentales, (Cabrera *et al.*, 1996; Cabrera *et al.*, 2005; Irabedra y Salvatella, 2010; Larrieu y Zanini, 2012, Pavletic *et al.*, 2017) se comenzó a dosificar los perros cada 30 días por idóneos pertenecientes a la Comisión de Lucha Contra la Hidatidosis,

actualmente denominada Comisión de Zoonosis. En 1995 el tratamiento llegó al 95% de los perros y en el año 1998 la prevalencia en perros bajó dramáticamente a 0.7% y como consecuencia, la incidencia en humanos bajó a 6.5 cada 100.000 habitantes. De acuerdo a los datos de prevalencia de la Hidatidosis en humanos, ovejas e infestación en perros, descritos en la sección 2.1 parecería que el tratamiento con Praziquantel no es suficiente para controlar totalmente esta zoonosis parasitaria.

6) INMUNIDAD CONTRA HELMINTOS PARASITOS

Los mecanismos postulados de inmunidad protectora a nivel intestinal en helmintos están asociados a una respuesta de hipersensibilidad de tipo I regulado por linfocitos Th2, con producción de IgE específica, hiperplasia de células caliciformes, con liberación del mucus de éstas células a la luz intestinal, degranulación de mastocitos, desarrollo de un proceso inflamatorio de origen alérgico, con aumento de la contractibilidad muscular intestinal, todo lo cual lleva a la expulsión de los parásitos (Clife *et al.*, 2005; Artis, 2006; Anthony *et al.*, 2007; Webb *et al.*, 2007; Hübner *et al.*, 2010; Breloer y Abraham, 2017).

En la infestación por helmintos, las células intestinales liberan alarminas, IL-25, IL-33, y linfopoyetina del estroma tímico (TSLP), que activan las células del sistema inmune innato y adaptativo de mucosas desarrollando una respuesta del tipo Th2 (Cortes *et al.*, 2017), (Fig. 4A y 4B).

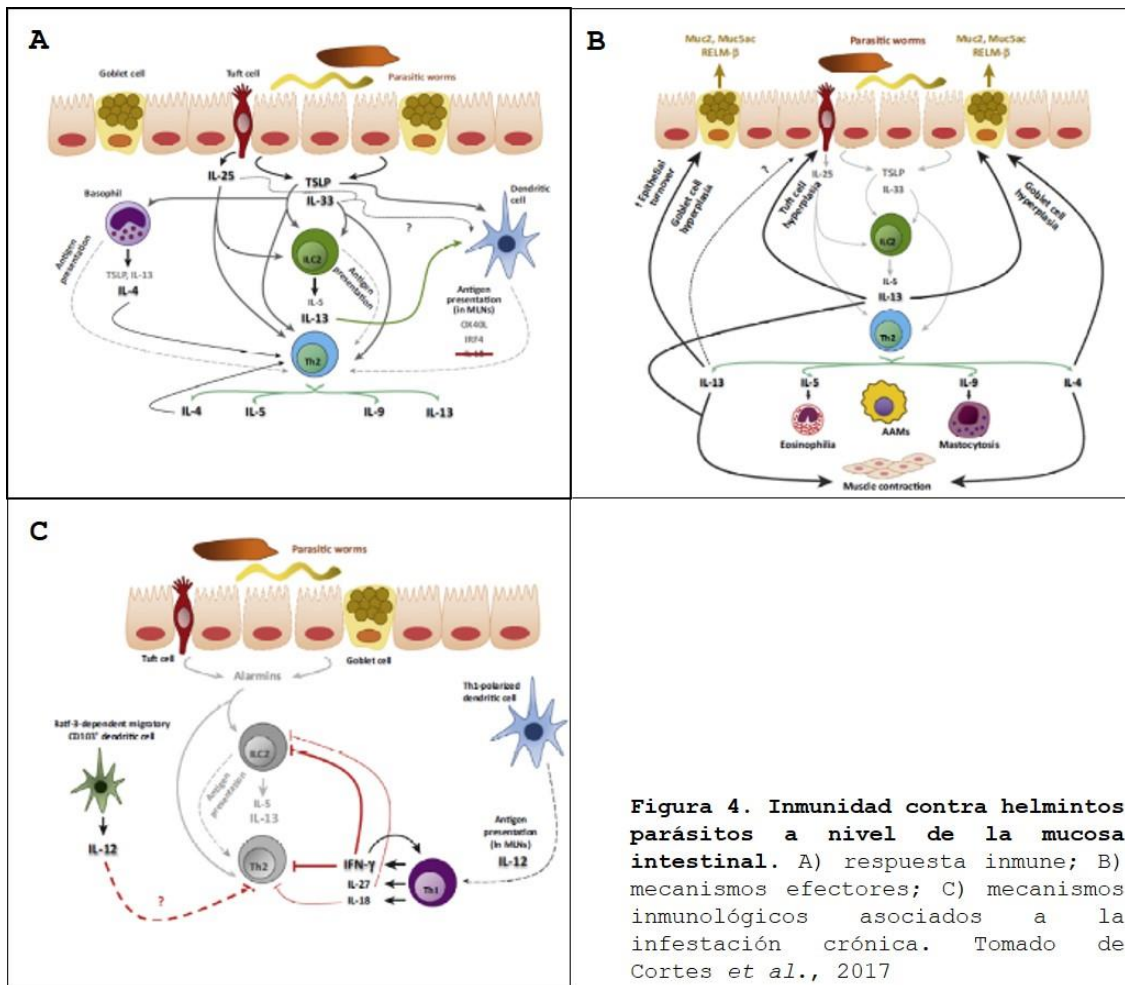


Figura 4. Inmunidad contra helmintos parásitos a nivel de la mucosa intestinal. A) respuesta inmune; B) mecanismos efectores; C) mecanismos inmunológicos asociados a la infestación crónica. Tomado de Cortes *et al.*, 2017

La IL-33 es una citoquina de la inmunidad innata expresada en células no linfoides como las células epiteliales intestinales ILC2, que es liberada cuando se produce daño celular epitelial activando la producción de citoquinas tipo Th2, activando basófilos, mastocitos, macrófagos. IL-33 es un potente activador de células linfoides innatas de tipo 2 (ILC 2) que ocurre temprano después de la infección por helmintos (Breloer y Abraham 2017). La IL-25 se produce en respuesta a la microbiota y se incrementa después de la infección por helmintos. IL-25 activa una célula progenitora multipotente, (MPP) que puede dar lugar a otros linajes celulares innatos. En respuesta a las alarminas las ILC2 producen grandes

cantidades de IL-13 y las células epiteliales dañadas producen TLSP que activan las células dendríticas (DC) en la lámina propia e inducen la migración de las DC a los nódulos linfáticos mesentéricos (MLN) para polarizar la respuesta inmune a una respuesta de ti

La citoquina IL33 y TSLP son secretadas por las epiteliales intestinales y la IL25 secretadas por las células tuft presentes en el epitelio intestinal inducidas por los antígenos parasitarios. Posteriormente los basófilos del intestino secretan TSLP, IL13 e IL4, las ILC2 secretan IL4 e IL5, todo lo cual dirige la respuesta inmune hacia una respuesta del tipo Th2 (Fig.4 1A). Las células Th2 secretan una serie de citoquinas que promueven la expulsión de los parásitos helmintos al inducir cambios fisiológicos en el epitelio intestinal (Fig. 4C). Los mecanismos incluyen hiperplasia de células caliciformes y secreción mucosa, aumento de la proliferación, el recambio y la contractilidad del músculo liso y aumento del peristaltismo todo lo cual lleva a la expulsión de los parásitos.

Los mecanismos de expulsión han sido bien estudiados en roedores (Anthony *et al.*, 2007; Maizels *et al.*, 2012) y en ovejas parasitadas con nematodos. En ovejas infectadas con *Trichostrongylus colubriformis* se observó un aumento de los leucocitos globulares (Balic *et al.*, 2002), eosinófilos e IgG1 (Stankiewicz *et al.*, 1993), aumento y degranulación de mastocitos de la mucosa (Stankiewicz *et al.*, 1994) aumento de IL-5 (Emery *et al.*, 1999) y aumento de la IL33 de las células epiteliales (Yronicos *et al.*, 2012). Por otro lado se demostró que mastocitos de la mucosa del intestino de ovejas inmunizadas con *T. colubriformis* y *Haemonchus contortus* se degranulaban en presencia de los antígenos nativos de estos parásitos

sugiriendo que los mastocitos sensibilizados probablemente participan activamente en la respuesta inmune, mediante un mecanismo de hipersensibilidad de tipo I, (Bendixsen et al., 1995). En experimentos donde se inmunizaron ovejas con ciclos repetidos de infecciones/tratamiento con *T. colubriformis* y *H. contortus*, se pudo determinar histológicamente, que en las ovejas inmunizadas había un incremento del número de mastocitos de las mucosas y un aumento significativo de leucotrienos en el mucus intestinal, sugiriendo una degranulación de los mastocitos inducidos por los parásitos (Douch et al., 1996). Ovejas inmunizadas con antígenos de la membrana intestinal de *H. contortus* indujeron la producción de citoquinas IL-4, IL13 y variables niveles de IFN gama en linfocitos presentes en ganglios linfáticos abomasales, aumento de eosinófilos, producción de IL4 y de IgE, indicando una polarización hacia una respuesta Th2 (Jasmer et al., 2007; Shakya et al., 2009). Recientemente se ha demostrado además, que estos mecanismos están regulados por linfocitos CD4+/Th2, con una producción específica de IL4, IL5, IL13, IL21e IL25. Los helmintos son poderosos moduladores de la respuesta inmune del hospedero, y su capacidad para provocar la expansión de las células T reguladoras es uno de los principales mecanismos para la cronicidad (McSorley y Maizels, 2012). Por otra parte, el establecimiento de helmintos intestinales en forma crónica, pueden ser causadas por el inicio de respuestas de tipo Th1, (Klementowicz et al., 2012). En presencia de IL-12, las células dendríticas polarizan la respuesta y activan las células T CD4+ vírgenes en los ganglios linfáticos mesentéricos (MLN) desarrollando una respuesta Th1. Los linfocitos Th1 polarizados producen citoquinas que inhiben la activación de Th2 (líneas rojas Fig. 4C) y promueven auto-expansión, lo que lleva al establecimiento crónico del parásito y la patología asociada.

IFN-gama es la principal citoquina secretada por células Th1, aunque otras citoquinas, como IL-27 e IL-18, también están involucradas en la inmunidad contra algunos helmintos intestinales. En las infestaciones crónicas los eventos inmunes claves en el inicio de la respuesta de tipo Th2, están bloqueados por la respuesta Th1. En la lámina propia, las células dendríticas CD103+ migratorias dependientes de Batf-3, producen constitutivamente IL-12, previniendo la activación Th2 independientemente de la presentación del antígeno, aunque la vía exacta aún no se conoce. Estos eventos favorecen el establecimiento de los helmintos y el desarrollo de infecciones crónicas.

7) EVIDENCIA DE INMUNIDAD CONTRA *E. GRANULOSUS* EN PERROS INFECTADOS.

Una vez establecido *E. granulosus* en el intestino del hospedero definitivo se encuentra con sus ventosas succionado el epitelio y sus espinas tegumentales (microtricas) en dirección opuesta al escólex, lo que hace que el parásito se mantenga en la luz intestinal pero firmemente establecido y adherido a la mucosa, dentro de las criptas, en relación estrecha con las glándulas de Lieberkhun, (Thompson et al., 1979). Los estudios histopatológicos de los intestinos de perros infectados con *E. granulosus* indican que el parásito está separado del sistema inmune del hospedero por solamente una línea de células epiteliales intestinales, pero en estrecha relación con el sistema inmune del hospedero (Smyth y MacManus 1989; Thompson et al., 1979).

Las primeras evidencias de inmunidad adquirida fueron comunicadas por Gemmell y colaboradores (1962; 1968), donde se

mostró que luego de la sexta infección y reinfección con protoescolices (PS) de *E. granulosus*, los perros desarrollaban una disminución de un 50% en el número de parásitos infectantes.

Unos de los primeros estudios en donde se evidenció que la respuesta inmune contra *E. granulosus* está mediada específicamente por células T, fue llevado a cabo por Al-Khalidi y Barriga (1986). Estos autores (Barriga y Al-Khalidi, 1986), demostraron que hay una respuesta humoral dependiente de IgG e IgA sistémica y de IgA de mucosas. Años después demostraron que los animales infectados presentaban un test de hipersensibilidad de piel positivo frente a los antígenos del gusano adulto y de protoescolices. El aumento de IgA indica que existe una respuesta específica de mucosas y que además hay una respuesta alérgica mediada por IgE, inmunoglobulina imprescindible en las hipersensibilidades de tipo I y aparece en patologías inflamatorias de origen alérgico, medibles por inoculación de antígenos en piel. Resultados similares fueron obtenidos por Deplazes y colaboradores en el año 1994.

Más evidencia de inmunidad adquirida fue determinada por varios autores, quienes reportan un menor número de parásitos en los animales más viejos comparados con los más jóvenes, en las infecciones naturales (Lahmar et al., 2001; Torgerson, 2003; Budke et al., 2005; Moro et al., 2005; Torgerson, 2006).

En experimentos más recientes Rossi y colaboradores (2012) demostraron que, frente a infecciones y reinfecciones repetidas, al igual que en los experimentos de Gemmell y colaboradores (1962), los perros adquirirían inmunidad protectora debido a que se observó una disminución drástica del número de parásitos. A diferencia de los experimentos de Gemmell y col. (1962), Rossi y col. determinaron el tipo de

respuesta T desarrolladas por los animales. Sorprendente, ellos observaron que los perros con más reinfecciones y menor número de parásitos, desarrollaban una polarización Th1 con aumento de IFN gama y niveles de IL4 y IL13 similares a los controles no infectados. Esto sugiere que los mecanismos responsables de la reducción del número de parásitos son Th1 dependiente. De todas formas, como sugieren los autores, son necesarios más experimentos y un mayor número de animales para poder obtener una conclusión clara de los mecanismos inmunológicos de protección contra este cestode en perros.

Por otro lado, los mastocitos juegan un rol fundamental en la expulsión de los parásitos en perros (Moreno *et al.*, 2004) probablemente aumentando la permeabilidad intestinal mediada por IgE. Los mastocitos activados persisten en la lámina propia del intestino grueso y en el compartimiento intraepitelial mucho después de la expulsión de los helmintos. En consecuencia, se ha demostrado la proteasa 1 de mastocitos (MCPT-1) provoca el aumento de la permeabilidad intestinal, hiperplasia de células cliciformes, epiteliales y de la contractibilidad muscular en otros modelos de animales (Sorobetea *et al.*, 2017; Bramhall y Zaph 2017).

8) ANTÍGENOS POTENCIALES PARA DESARROLLAR UNA VACUNA CONTRA *E. GRANULOSUS*.

8.1) Proteínas musculares.

Las proteínas musculares de los helmintos son potentes inmunógenos para sus hospederos y han sido evaluadas como candidatos para vacunas. Entre éstas se encuentran la paramiosina y la tropomiosina. La primera, ha sido recomendada por la WHO (Jiz, *et al.*, 2008) para ser incluida en una vacuna

contra la Schistosomiasis, luego de haber sido probada sus capacidad como inmunógeno por varios autores en *Schistosoma mansoni* (Kalinna y McManus, 1997), *Schistosoma japonicum* (Chen et al., 2006), *Taenia solium* (Laclette, et al., 1992, Vázquez-Talavera et al., 2001), *E. granulosus* (Muhlschlegel, et al., 1993), *Brugia malayi* (Langy, et al., 1998), *Onchocerca volvulus* (Erttmann et al., 2009), *Trichinella spiralis* (Wei et al., 2011) y *Paragonimus westermani* (Zhao et al., 2007). La tropomiosina, por otro lado, ha sido descrita como candidato para el desarrollo de vacunas contra *Onchocerca volvulus* (Harrison et al., 2000), *Fasciola hepatica* (Cancela et al., 2004), *T. solium* en suinos y humanos (Solís et al., 2004), *Clonorchis sinensis* (Park et al., 2009), y *Ostertagia ostertagi* (Visser et al., 2006), y *Boophilus microplus*, la garrapata del ganado bovino (Parizi et al., 2009). Ambas proteínas, presentes en ácaros del polvo, son responsables de las alergias y asma en humanos (Huntley et al., 2004; Thomas et al., 2004; Valmonte et al., 2012). La paramiosina desarrolla buenos niveles de IgE y está asociada a la resistencia de la infección contra *S. japonicum* (Jiz et al., 2009).

8.2) Paramiosinas de *E. granulosus*

8.2.1) EG36

En 1993 Mühlschlegel y colaboradores describen por primera vez una paramiosina en *E. granulosus*, partiendo de una librería de ADNc del estado larvario, utilizando para el rastreo, sueros hiperinmunes de conejo. Uno de los clones positivos, denominado EG36, fue estudiado y la secuencia predictiva de aminoácidos mostró un 71.4% de identidad con la paramiosina de *S. mansoni* y una similitud significativa con una secuencia peptídica 17

aminoácidos del antígeno B de *T. solium*. Se obtuvo la proteína en forma recombinante con un peso molecular aparente de 97 kDa. Estudios de inmunolocalización determinaron que la proteína se expresaba en el tegumento de larvas de *E. granulosus* y *E. multilocularis*.

8.2.2) EgA31.

Una segunda paramiosina fue obtenida también de una librería de ADNc, en este caso de *E. granulosus* adulto, empleando para el rastreo sueros de perros infectados con el parásito (N° Acceso al GenBank AF067807) (Fu et al., 1999). El clon correspondiente recibió el nombre de EgA31 y su marco abierto de lectura corresponde a un polipéptido de un peso molecular de 66 kDa. Esta paramiosina está presente durante todo el desarrollo del parásito en el perro, así como durante el desarrollo del quiste en pacientes humanos. Se ha inmunolocalizado en el parénquima subtegumentario, región rica en fibras musculares, con una localización principal en la región de las ventosas. EgA31, está presente también en las células subtegumentales de las microtrícas del parásito adulto, en los huevos y en la periferia de los corpúsculos calcáreos del quiste. La máxima concentración se observa en el parásito adulto, en la región de las ventosas (Saboulard et al 2003).

Esta proteína está claramente asociada con dos estructuras del parásito como son los músculos y el tegumento. Por lo tanto, es probable que EgA31 interactúe con la miosina y esté involucrada con el ensamblaje de los filamentos musculares. El hecho de que se acumule en las ventosas de los PS luego de su evaginación, y que estos sean imprescindibles para mantenerse unidos al intestino, nos indica que EgA31 debería tener un rol

importante en la adhesión del parásito en la mucosa intestinal. Las ventosas están separadas de los componentes del sistema inmune del perro solamente por la línea del epitelio intestinal, lo que nos sugiere que la proteína mencionada podría ser un blanco fácil del sistema inmune del hospedero. Este hecho refuerza la idea de que esta proteína podría estar involucrada en la permanencia de los gusanos adultos en el intestino, debido a que las ventosas son unos de los órganos más importantes de *E. granulosus* para mantenerse adherido a la pared intestinal.

La proteína recombinante de EgA31 (rEgA31), que corresponde a un fragmento de la proteína nativa, es capaz de desarrollar una buena respuesta inmune celular en perros, cuando se la inyecta subcutáneamente (Fu *et al.*, 2000). Se observó una hipertrofia de la zona de la corteza ganglionar y un aumento de los linfocitos T, CD3+, CD4+, CD8+ y CD5+. Esta respuesta celular activa, demuestra que este antígeno tiene la capacidad de estimular una respuesta de linfocitos y que, por lo tanto, podría generar memoria inmunológica, condición imprescindible de un antígeno para ser usado en el desarrollo de una vacuna.

EgA31 se empleó para inmunizar ratones BALB/c, observándose una importante respuesta inmunogénica (Fraize *et al.*, 2005). Se pudo observar además un aumento de la relación CD4+/CD8+ en los animales inmunizados, así como un aumento en los niveles de anticuerpos del isotipo IgG1 e IgA. También se detectó un aumento en la producción de IL-12, IFN-gama, IL-10 e IL-6. Esto sugiere que la respuesta es Th1/Th2.

8.3) Tropomiosina de *E. granulosus*.

Las tropomiosinas son moléculas que forman polímeros continuos a lo largo del surco mayor de la mayoría de los filamentos de actina (Gunning *et al.*, 2008). En el músculo estriado, la tropomiosina regula la interacción actina-miosina y, por lo tanto, es imprescindible en la contracción del músculo. La tropomiosina contribuye también a la mayoría, si no a todas, las funciones del citoesqueleto de actina siendo su papel esencial en la viabilidad de una amplia gama de organismos.

La tropomiosina de *E. granulosus* fue aislada y expresada por primera vez por A. Esteves y colaboradores (2003). Estos autores reportaron el aislamiento y la expresión del gen de la tropomiosina partiendo de una librería de ADNc de PS mediante rastreo con antisueros anti-PS y anti-membrana germinativa. El inserto de algunos clones seleccionados como diferenciales y específicos de PS, fueron subclonados en pBluescript II KS y secuenciados. Se encontró que la secuencia aminoacídica de uno de ellos presentaba un 66-77% de identidad con las tropomiosinas de varias especies y una alta similitud con la tropomiosina de *S. japonicum*. El fragmento de 531 pb, que corresponde al 90% de la región codificante del gen, fue amplificado por PCR, subclonado y expresado en el vector pQIA. Se ha demostrado que la proteína recombinante rEgTrp es altamente inmunogénica. Estudios de inmunohistoquímica realizados sobre secciones de PS revelaron que la tropomiosina de *E. granulosus* se expresa en las ventosas, así como en el subtegumento (Esteves *et al.*, 2003) coincidiendo esta expresión con la demostrada para EgA31. En el intestino del perro de 2 y 4 días post-infección también se detecta la expresión de esta proteína nativa en las ventosas y el tegumento del parásito

(Fig. 5). Estos datos indican que la tropomiosina está presente en el establecimiento y fijación del PS evaginado en el intestino del perro. Las ventosas junto a las microtrícas de *E. granulosus* son estructuras imprescindibles en la permanencia del parásito en la mucosa intestinal.

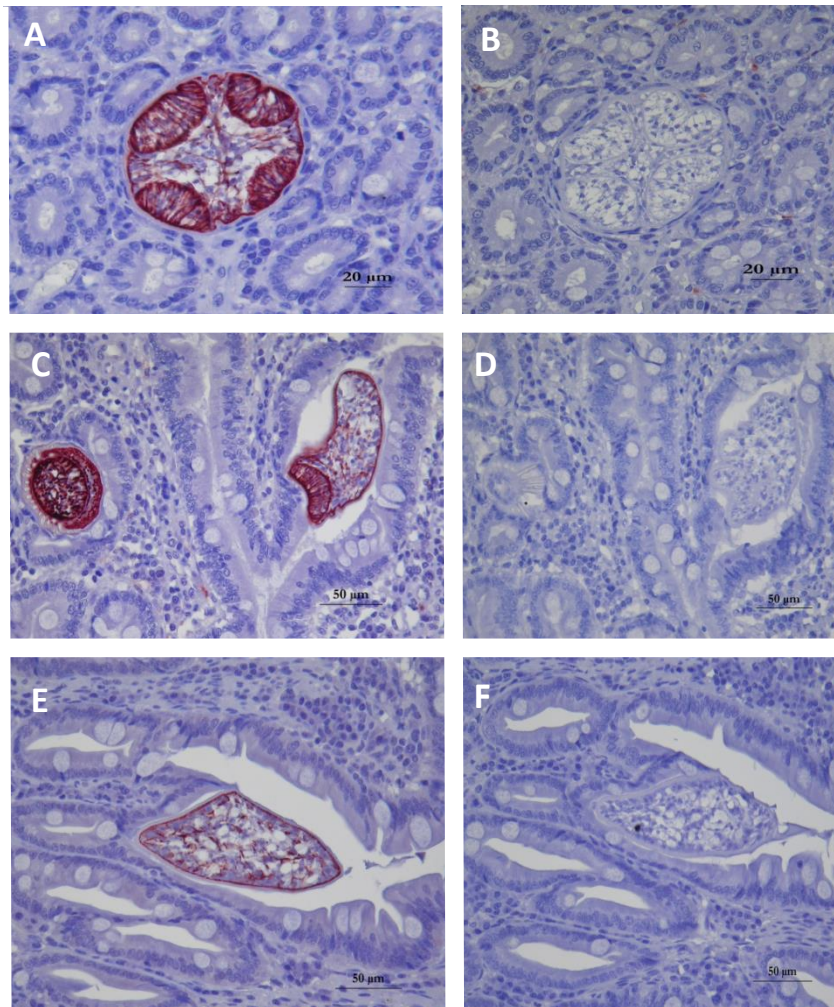


Figura 5. Inmunolocalización de Tropomiosina. Secciones de intestinos de perro con 4 (A-D) y 12 (E, F) días de infección con *E. granulosus*, teñidas con anticuerpos de conejo anti-Tropomiosina (A, C, E). Controles negativos B, D, F).

En ensayos de vacunación, una proteína quimérica usando péptidos de cinco proteínas, incluyendo EgTrp y EgA31, protegió en un 99.6% de la infestación en ratones desafiados con protoescolices en forma intraperitoneal (Esmaelizad et al., 2013a). Los mismos autores demostraron también que la proteína quimérica GST-ChEgA31 generaba una capacidad protectora de un 50 a 60% (Esmaelizad et al., 2013b).

Esto significa que los epítopes de células T de EgTrp y de EgA31 son potencialmente relevantes para desarrollar inmunidad protectora contra *E. granulosus*. Además, estos antígenos empleados en ensayos de vacunación en perros, demostraron también ser potenciales candidato vacunales en base a la respuesta inmunogénica (Petavy et al., 2008).

9) DESARROLLO DE VACUNAS CONTRA *E. GRANULOSUS*.

9.1) Vacunas en el hospedero intermediario.

En los primeros trabajos en donde se evidenció inmunidad protectora contra el desarrollo de infección en ovejas, se emplearon oncosferas activadas de *E. granulosus*, *Taenia hydatigena*, *Taenia ovis* y *Taenia pisiformis*, demostrándose que existía inmunidad especie específica y protectora. Estos resultados indicaban que era posible el desarrollo de una vacuna contra *E. granulosus* en ovejas (Gemmell, 1969).

Años más tarde, con el advenimiento de la ingeniería genética, se generaron proteínas recombinantes a partir del conocimiento de antígenos nativos con potencial uso en vacunas. La primera vacuna recombinante de la que se tiene noticia fue la desarrollada por investigadores australianos contra el cestode *T. ovis*, para ser aplicadas en ovejas (Johnson et al.,

1989). Siguieron a esta primera vacuna, el desarrollo de una vacuna contra la cisticercosis causada por *Taenia saginata* en bovinos (Lightowlers et al., 1996), y *T. solium* en cerdos (Flisser et al., 2004). Treinta años después de los primeros hallazgos de MA. Gemmel de 1966, se dio a conocer el desarrollo de la vacuna recombinante EG95 contra *E. granulosus* (Lightowlers et al., 1996), basada en la inmunidad desarrollada contra la oncósfera, en su hospedero intermediario (ovejas). Esta vacuna, tiene como antígeno una proteína recombinante de oncósfera de 16 kDa que posee un dominio de fibronectina tipo II, expresada como proteína de fusión a Glutación S-transferasa (Lightowlers et al., 1996). Este antígeno ha mostrado ser efectivo en ensayos de vacunación en diferentes especies de hospederos intermediarios, cabras, ovejas, bovinos y llamas (Lightowlers et al., 1999; Woolalard, 2000; Heath et al., 2003; Heath et al., 2012; Larrieu et al., 2013, 2015, 2017; Poggio et al., 2016, Umair et al., 2017) y ha sido recomendado por los autores para ser utilizada en los programas de control. Esta vacuna fue registrada para su uso comercial en Argentina y China, con el nombre Tecnovax Hidatil EG95. Diferentes estudios han demostrado que el gen EG95 presenta polimorfismo (Chow et al., 2008; Pan et al., 2017). El antígeno fue obtenido a partir del genotipo G1 y resultó inmunológicamente diferente al obtenido de G6 (Rojas et al., 2013). Se requerirán más estudios para determinar si la actual vacuna EG95 sería efectiva contra los genotipos G6/G7, o si será necesario, y posible, desarrollar vacunas específicas para cada genotipo (Alvarez Rojas et al., 2014; Pourseif et al., 2018).

Recientemente, ensayos de inmunización en ovejas desafiadas con oncósferas de *E. granulosus* (Wang et al., 2016), al igual que antígenos crudos del tegumento de los PS,

mostraron ser altamente inmunogénicos produciendo buenos niveles de anticuerpos (Valizadeh *et al.*, 2017) así como una disminución en el desarrollo de los quistes.

9.2) Vacunas contra *E. granulosus* en su hospedero definitivo.

Uno de los más importantes experimentos de vacunación llevado a cabo en perros fue reportado en el boletín de WHO por Gemmel y Soulsby (1968). Varios han sido los antígenos empleados en ensayos de vacunación en perros desde oncósferas, antígenos de membrana germinal y de PS, hasta productos de secreción-excreción de gusanos adultos. En todos los casos los resultados fueron alentadores y hay una fuerte tendencia a considerar necesario inmunizar con el estado adulto del parásito para lograr niveles de protección medibles en el hospedero definitivo. Gemmell y col. en 1962 vacunaron perros con antígenos totales del estado larvario (membrana germinativa y PS) y del adulto, encontrándose mayores niveles de protección con los antígenos del adulto. No obstante, los resultados anteriores, se siguió ensayando antígenos de estadios larvarios. Ejemplo de ellos fue el uso de moléculas presentes en las oncósferas (Gemmell y Soulsby, 1968), PS irradiados o antígenos glicosilados de PS (Movsesijan y Mladenovic, 1968; Carol *et al.*, 1997).

Empleando también un antígeno del estado larvario, la proteína recombinante EgFABP1 (fatty acid binding protein de *E. granulosus*), se obtuvo una respuesta inmune de mucosas muy importante en el modelo murino, con una respuesta humoral predominantemente de IgG2a, IgG1 e IgA con una regulación Th2, (Chabalgoity *et al.*, 1997), la cual está asociada a los mecanismos efectores protectivos contra los parásitos

helminthos intestinales reportados en la bibliografía (Else y Grencis, 1996; Grencis, 1997; Bancroft et al., 2000; Worthington et al., 2013, Cortes et al ., 2017).

Altos niveles de protección (97%-100%), se lograron con proteínas recombinantes de PS y adultos fusionados a GST, medidos en función del desarrollo de oncósferas en perros vacunados (Zhang et al., 2006). Los antígenos empleados en este caso fueron egM4, egM9 y egM123 (N° acceso AF482719, AF482720, y AF482718) (Zhang et al., 2003). Desde entonces, no se ha reportado más información acerca del desarrollo de vacunas usando los antígenos mencionados.

Petavy y col. en el año 2008 mostraron resultados experimentales prometedores de una vacuna contra *E. granulosus*. En estos ensayos, se vacunaron perros por vía oral, usando fragmentos de dos proteínas recombinantes rEgTrp (Esteves et al., 2003) y rEgA31 (Fu et al., 1999). Ambos fragmentos fueron clonados y expresados en una cepa no patogénica de *Salmonella tiphymurium* como sistema de producción y liberación de antígenos a nivel de mucosas y de estímulo de la inmunidad de mucosas en forma específica (Chabalgoity et al., 1997). Estos experimentos mostraron muy buenos niveles de protección, manifestados por una disminución de la carga parasitaria de entre un 70-80% y menores niveles de desarrollo estrobilar. Estos resultados indican que los antígenos tienen capacidad protectora (Petavy et al., 2008).

10) USO DE NANOPARTICULAS EN MEDICINA

Las nanopartículas poliméricas (NPs) son quizás la forma más simple usada para encapsular proteínas o fármacos para aplicaciones de nanomedicina, debido a su fácil síntesis y

amplia aplicabilidad (Thauvin et. al., 2017, McClements 2018).

Las NPs aprobadas por la Food y Drug Administration (FDA-USA) se están utilizando cada vez más en nanomedicina. De hecho, dos de las diez drogas más vendidas Copaxone® y Neulasta®, en los Estados Unidos en 2013, fueron fármacos encapsulados en partículas poliméricos (Duncan, 2014). Los polímeros usados en medicina para la generación de NPs generalmente se clasifican en una de dos categorías: (a) conjugados polímero-fármaco para aumentar la vida del fármaco y biodisponibilidad, y (b) polímeros degradables para aplicaciones de liberación controlada. En general las NPs tienen un tamaño similar a componentes de las células y pueden entrar a células vivas, usando los mecanismos de endocitosis o pinocitosis (Treuel et. al., 2013).

11) USO DE NANOPARTÍCULAS EN EL DESARROLLO DE VACUNAS

El uso de NPs en formulaciones de vacunas permite no solo mejorar la estabilidad e inmunogenicidad del antígeno, sino también la entrega dirigida, y una lenta liberación (Zhao et. al., 2014). Un número de vacunas basadas en NPs que varían en composición, tamaño, forma y propiedades de superficie están siendo desarrolladas para uso humano en forma creciente. Sin embargo, los desafíos continúan debido a la falta de comprensión con respecto al comportamiento *in vivo* de las NPs, las que pueden funcionar como un sistema de administración para mejorar el procesamiento del antígeno y/o como un adyuvante inmunoestimulante para activar o mejorar la inmunidad (Zhao et. al., 2014; Thauvin et. al., 2017).

La figura 6 muestra que el número de publicaciones referidas a nanopartículas y vacunas ha crecido en los últimos

años. Esto demuestra que hay una creciente confianza en la NPs como sistema de "delivery" de antígenos a ser utilizados en vacunas. La nanotecnología vendió en el mundo, 6.8 billones de dólares en el 2006 y con una predicción de 160 billones de dólares en el 2015 (Zhao et al., 2014).

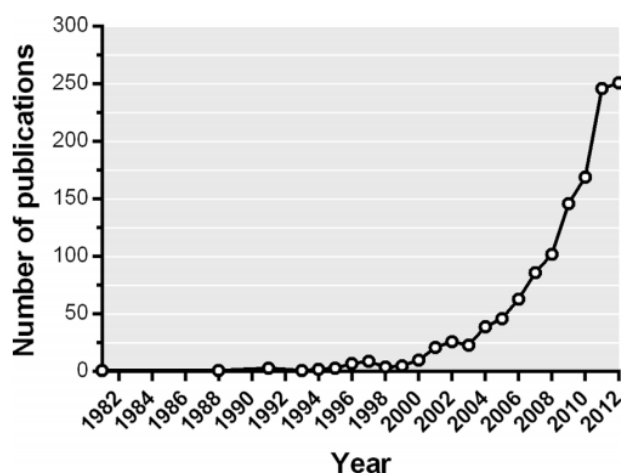


Figura 6. Número de publicaciones utilizando los términos de búsqueda "nanopartícu le y vaccine" tomado de Zhao et al., 2014.

Según postulan McCarthy y col. (2014) las NPs usadas en vacunas deberían cumplir con las siguientes características: a) ser captadas por las células dendríticas (CD); b) madurar y activar CD; c) procesar y presentar eficientemente los antígenos a las células T para activarlas; d) inducir un contexto inflamatorio para que las CD expresen moléculas co-estimuladoras; e) inducir señales que lleven a las CD a migrar a los linfo-nódulos vía CCR7-CCL19/21 para activar la respuesta de células T.

11.1) VACUNAS DE MUCOSAS.

La administración de una vacuna vía oral para estimular la inmunidad de mucosas es la forma más frecuente de inducir la inmunidad deseada contra diversos tipos de antígenos a nivel sistémico y en la mucosa más externa (Kaur *et al.*, 2017). La administración de vacunas de mucosas proporciona respuestas tanto humorales como celulares. La mucosa es una de las principales zonas por donde entran los patógenos y parásitos, lo que hace que la mucosa sea un sitio perfecto para la aplicación de vacunas e inducir inmunidad protectora frente a estos organismos.

Los polímeros naturales y sintéticos se utilizan para obtener NPs para el desarrollo de anticuerpos de la mucosa nasal. Durante la última década, los materiales a nanoescala <1000 nm como partículas similares a virus, liposomas, ISCOM, poliméricos y nanoesferas no degradables, han recibido atención como vehículos potenciales de suministro para antígenos que pueden actuar como estabilizadores de la vacuna y adyuvantes (Gregory *et al.*, 2013). Es importante destacar que algunas de estas NPs pueden entrar en células presentadoras de antígenos por diferentes vías, modulando de ese modo la respuesta inmune al antígeno. Sus propiedades también las hacen adecuadas para el suministro de antígenos a las mucosas y para la administración intradérmica.

Los polímeros biodegradables han sido descritos como los candidatos ideales para encapsular antígenos y drogas en partículas del orden de los nanómetros y específicamente para el desarrollo de vacunas de mucosas (McNeela y Lavelle, 2012; Zhao *et al.*, 2014; Kaur *et al.*, 2017). La enorme ventaja del uso de esta tecnología es su capacidad de proteger los antígenos durante el pasaje a través del aparato

gastrointestinal permitiendo que el sistema inmune de mucosas pueda recibir los antígenos sin alteraciones de la integridad ni de la inmunogenicidad. En la figura 7 se ejemplifica las diferentes formas de incorporar proteínas a NPs teniendo en cuenta la relación proteína nanopolímero.

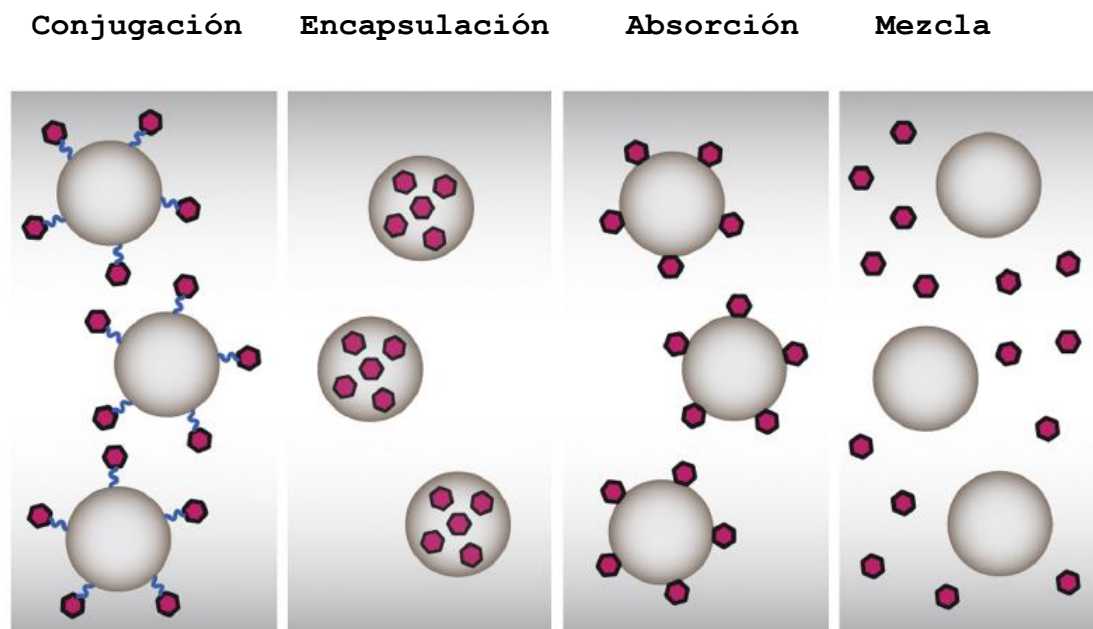


Figura 7. Diferentes formas de formular NPs. Tomada de Zhao *et al.*, 2014

Teniendo en cuenta la interacción de la proteína y su relación con el nanopolímero es posible considerar que la forma más adecuada para proteger la estabilidad, integridad e inmunogenicidad de los antígenos para una administración por vía oral, es la encapsulación de las mismas dentro de un polímero biodegradable.

Varios compuestos naturales y polímeros sintéticos han sido usados para preparar NPs durante la última década. Dentro de éstos, los poliésteres son los más prometedores debido a sus características fisicoquímicas, las técnicas por las cuales

pueden ser sintetizados y especialmente por su capacidad de ser biodegradables y biocompatibles (Rieux et. al., 2006; Mora-Huertas et. al., 2010; Zhao et. al., 2014)). Estos polímeros tienen además, la muy importante capacidad de proteger a las proteínas antigénicas de la degradación a nivel del estómago e intestino.

Los polímeros biodegradables han sido usados como hilos de suturas en medicina. Los polímeros ácido poliláctico (PLA), ácido poliglicósido (PGA), y especialmente ácido poli láctico co-glicósido (PLGA), se han utilizado en el desarrollo de vacunas debido a sus características de biocompatibilidad, biodegradabilidad y de ser relativamente fáciles de preparar (Shive y Anderson 1997; Jain et al., 2000; Jain et al., 2010; Anderson y Shive 2012). Estos polímeros han sido aprobados por la FDA, para ser aplicados en el transporte de drogas, proteínas e incluso antígenos de vacunas (Bobo et al., 2016).

El tamaño de las partículas, así como su carga y estabilidad son características importantes de estos sistemas de transporte de antígenos a nivel del tracto gastrointestinal. Estas características determinan la distribución, las características biológicas, la toxicidad y la interacción con las células blanco de los tejidos. Existe una gran variedad de publicaciones en las que los autores no coinciden en el impacto que tiene el tamaño de las NPs en la respuesta inmune a nivel de las mucosas. (Mottram et al., 2007; Mann et al., 2009). Partículas de alrededor de 100 nm desarrollan una respuesta Th1/Th2 mixta cuando se usa Chitosan-NPs (Wen et al., 2011). El tamaño de las partículas de alrededor de 100 nm parecería ser óptimo para que las partículas sean captadas por las células M intestinales y las células presentadoras de antígenos del tejido linfoide asociado a mucosas, e incrementar y hacer

más eficiente la respuesta inmune a nivel de las mucosas, como ha sido demostrado en experimentos *in vitro* e *in vivo* (Desai *et al.*, 1996 y 1997). La figura 8 muestra los diferentes tamaños de NPs utilizados para el desarrollo de vacunas.

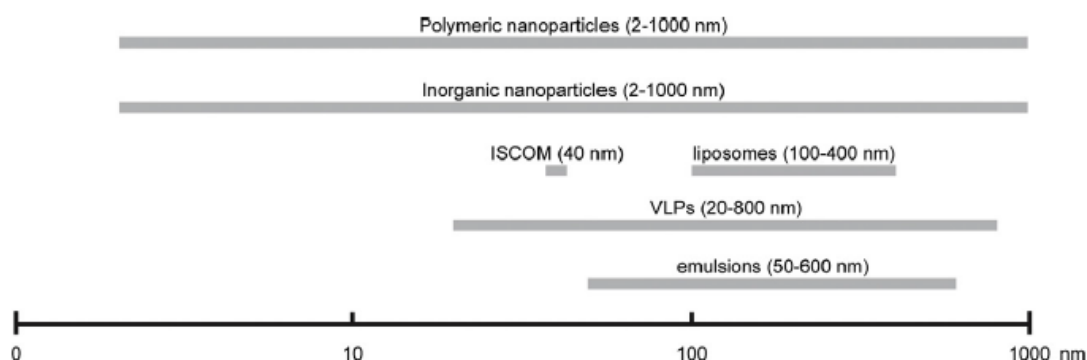


Figura 8. Diferentes tamaños de NPs utilizadas para el desarrollo de vacunas. Tomada de Zhao *et al.*, 2014.

Las células M se encuentran predominantemente recubriendo los folículos linfoides asociados a epitelios (FLAE) incluidas las placas de Peyer del intestino de los animales y del hombre (Neutra *et al.*, 1996). Tienen como función principal la de capturar antígenos intestinales lumbinales así como partículas extrañas como las NPs, y ponerlos en contacto con las células presentadoras de antígenos del FLAE.

Existen fuertes evidencias que indican que el agregado de moléculas a las NPs, proceso denominado “funcionalización de las NPs” aumentan considerablemente la respuesta inmune desarrollada en nanovacunas experimentales (Liang *et al.*, 2017; Margaroni *et al.*, 2017; Athanasiou *et al.*, 2017). Estas moléculas tienen la capacidad de favorecer la internalización de las NPs en la superficie de las mucosas. Luego de atravesar la barrera epitelial, algunas de estas moléculas tienen la

capacidad de activar las células dendríticas evitando el desarrollo de tolerancia y desarrollando una respuesta inmune más potente, con un claro efecto adyuvante. Son ejemplos de ellos, lectinas (Hamdy *et al.*, 2011), Chitosan (Gupta *et al.*, 2011; Zhao *et al.*, 2017; Marciello *et al.*, 2017; Lebre *et al.*, 2017; Singh *et al.*, 2017), Avidina y polietilenglicol (Cu *et al.*, 2011), la flagelina, ligando del TLR5, (Stano *et al.*, 2011), receptores de lectinas tipo C sobre macrófagos alveolares y sobre células dendríticas (Carrillo-Conde *et al.*, 2011; Chavez-Santosco *et al.*, 2012) y el pentapéptido RGD (Gly-Arg-Gly-Asp-Ser). Este último, ligando para B1 integrinas en las superficies de las células M (Fievez, 2009) ya se encuentran en fase de ensayos clínicos, usando liposomas como "sistema de delivery" (Bernasconi *et al.*, 2016).

Hay fuertes evidencias que sugieren que las células epiteliales intestinales expresan receptores de tipo Toll (TLR2, TLR4) y podrían comportarse como células presentadoras de antígenos (Robert *et al.*, 2000). Receptores TLR2 están presentes en el intestino delgado y los TLR4 en el duodeno (McMahon *et al.*, 2010; Swerdlow *et al.*, 2010). En perros se describió la expresión del receptor TLR4 en la superficie luminal de las células epiteliales del duodeno (Wassef *et al.*, 2004). En la mucosa intestinal, se encuentran células especializadas en la captura e internalización de antígenos lumbinales hacia el tejido linfoide (células M). Por cada célula M hay millones de células epiteliales (Pridgen *et al.*, 2015). El uso de ligandos externos específicos para TLR4 en las NPs permitirían que éstas no se unan exclusivamente a las células M y sí a toda la superficie del intestino, amplificando de manera muy importante la eficiencia de la internalización de

NPs luminales y la entrega de los antígenos encapsulados a las células dendríticas en el tejido linfoide.

Varias son las nanovacunas experimentales descritas, por ej. contra malaria (Tyagi et. al., 2012), Leishmaniasis (Danesh-Bahreini et. al., 2011; Santos et. al., 2012; Margaroni et. al., 2017) hepatitis (Mangala et. al., 2011), tumores (Matsuo et. al., 2011), influenza (Gupta et. al., 2011), *Streptococcus equis* (Florindo et. al., 2009), *Neospora caninum* (Jimenez-Ruiz et. al., 2012), *S. mansoni* (Oliveira et al., 2012), *Plasmodium falciparum* (Pusic et al., 2011), *Clamidia trachomatis* (Taha et al., 2012; Fairley et al., 2013), tuberculosis (Ansari et al., 2011), diarrea viral bovina (Mody et al., 2015), listeriosis (Calderon-Gonzalez et. al., 2015), influenza en cerdos (Dhakal et. al., 2017), y enfermedad de Newcastle en aves (Zhao et. al., 2017). Curiosamente, no se ha descrito hasta el momento ninguna nanovacuna contra parásitos helmintos intestinales.

OBJETIVOS

1) Objetivo general.

Desarrollo de una nanovacuna contra *E. granulosus* para ser aplicada en el hospedero definitivo.

2) Objetivos específicos:

- Formulación de nanopartículas y encapsulamiento de los antígenos
- Evaluación de la integridad y la inmunogenicidad de los antígenos encapsulados.
- Bifuncionalización de las NPs con Chitosan (CS) y (Lípido A monofosforilado) MPLA.
- Desarrollo de un método de conservación de las NPs
- Determinación de la capacidad de las NPs desarrolladas para proteger los antígenos a nivel gastrointestinal.
- Determinación de la capacidad de las NPs de ser internalizadas por macrófagos.
- Determinación de la capacidad de las NPs para ser internalizadas y activar células dendríticas.
- Determinación de la inmunogenicidad de las NPs en caninos.
- Ensayo piloto de la eficacia de las nanovacunas desarrolladas en caninos infectados experimentalmente.

MATERIALES Y MÉTODOS

Los antígenos recombinantes, rEgTrp y rEgA31, fueron seleccionados para encapsular en polímeros y desarrollar las NPs y emplear en ensayos de vacunación.

1) EXPRESIÓN Y PURIFICACIÓN DEL ANTÍGENO RECOMBINANTE rEgTrp

Se empleó el fragmento comprendido entre los residuos 101-178 de la isoforma A de la proteína tropomiosina de *E. granulosus* (N° acceso al GenBank AAB65799), clonado en el vector de expresión pQIA (Qiagen) (Esteves et al., 2003). Se expresó en la cepa de *Escherichia coli* M15 (pREP4) (Qiagen). Las bacterias transformadas con el plásmido se cultivaron a 37°C en LB (Luria Bertani) suplementado con 100µg/µl de Ampicilina y 25µg/µl de Kanamicina, hasta una DO_{600nm} de 0,5-07. La expresión de la proteína recombinante, (EgTrp-r), se indujo por la adición de 1,5 mM de isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosido (IPTG) incubándose durante 3 hs adicionales. Las células se recogieron luego de centrifugar a 5.000 x g durante 10 min, se resuspendieron en tampón de lisis (tampón fosfato 50 mM pH 8, NaCl 300 mM, imidazol 20 mM) y se lisaron por sonicación. Los residuos celulares se eliminaron por centrifugación a 15.000 x g durante 30 min a 4°C. El sobrenadante se sembró en una columna His-Trap de 5 ml (GE Healthcare) empleando para la purificación el sistema de cromatografía AKTAprime (GE Healthcare). La elución se realizó en el mismo tampón, en gradiente, con concentraciones

crecientes de imidazol (100 mM, 200 mM, 300 mM, 500 mM). Las fracciones se analizaron por electroforesis en geles de poliacrilamida desnaturalizantes (SDS-PAGE) y espectrometría de masas.

2) EXPRESIÓN Y PURIFICACIÓN DEL ANTÍGENO RECOMBINANTE rEgA31

El polipéptido codificado por el fragmento de Pst/Dra I del ADNc de la paramiosina de *E. granulosus* se clonó en el vector de expresión pet22b (Novagen) y se expresó en la cepa de *E. coli* BL21 (DE3) (NEB). Las bacterias transformadas con el plásmido se cultivaron a 37°C en LB suplementado con 100µg/µl de Ampicilina, hasta una DO_{600nm} de 0,5-07. La expresión del polipéptido recombinante (rEgA31) fue inducida por la adición de IPTG 1 mM (Sigma) durante 3 h adicionales. Las células se recogieron luego de centrifugar a 5.000 x g durante 10 min, se resuspendieron en tampón de lisis (tampón fosfato 50 mM pH 8, NaCl 300 mM, imidazol 20 mM y urea 8M) y se lisaron por sonicación. Los residuos celulares se eliminaron por centrifugación a 15.000 x g durante 30 min a 4°C. El sobrenadante se sembró en una columna His-Trap de 5 ml empleando para la purificación el sistema de cromatografía AKTAprime (GE Healthcare). La elución se realizó en el tampón de lisis en gradiente, con concentraciones crecientes de imidazol (100 mM, 200 mM, 300 mM, 500 mM). Las fracciones se analizaron por SDS-PAGE y espectrometría de masas.

3) ENCAPSULACIÓN DE ANTÍGENOS EN NPs.

Para la encapsulación de cada antígeno recombinante, se prepararon NPs poliméricas (NPs) mediante el método de doble

emulsión/evaporación tal como lo describe Bilati y col., (2005) con algunas modificaciones. En una primera etapa se realizaron diferentes ensayos para estandarizar el método, variando el tipo de polímero, el tiempo de sonicación, concentración de PVA y cantidad de proteína. En la formulación final se preparó la fase orgánica disolviendo 1 g de poli (D, L) ácido láctico (PLA) (100-LD-2E, lote LX00111, Lakeshore Biomaterial, EVONIK/USA) en 20 ml de acetato de etilo a 50°C. Se preparó la primera emulsión añadiendo a la fase orgánica, gota a gota, la fase acuosa interna (2 ml de cada antígeno en tampón de elución: 2,2 mg/ml de rEgTrp y 1,8 mg/ml rEgA31) bajo agitación magnética, combinada con sonicación, a una amplitud del 25 mA (S-4000, Misonix) durante 2 min. A continuación, la segunda emulsión se llevó a cabo agregando la primera emulsión a 40 ml de solución acuosa de poli alcohol vinílico (PVA) al 2% (Sigma Aldrich MW 88), con sonicación, a una amplitud del 25 mA durante 2 min en hielo. La preparación final se agitó magnéticamente durante 10 min. Finalmente, el disolvente orgánico se evaporó a 40°C y 200 mbar de vacío, usando un evaporador rotatorio (Rotavapor® RE-140, Büchi, Suiza) (Tabla 1). La suspensión de NPs obtenida se almacenó a 4°C hasta su uso posterior. Se prepararon NP denominadas "Blanco" en condiciones similares, reemplazando la solución antigénica por 2 ml de PBS. Llamaremos de ahora en más, NP a la formulación con el polímero PLA; NP-EgTrp o NP-EgA31 cuando la formulación contenga además el antígeno.

4) CARACTERIZACIÓN DE LAS NPs

4.1) Tamaño y carga eléctrica

Para realizar el estudio del tamaño y carga eléctrica (potencial zeta) de las NPs obtenidas se realizó una suspensión de las mismas en agua para ser estudiadas mediante técnicas de dinámica de dispersión de luz, utilizando un Zetasizer Nano ZS90 (Malvern Instrumens, Reino Unido). Todas las formulaciones fueron analizadas por este método.

4.2) Morfología

Se determinó la morfología y tamaño de las NPs mediante microscopía electrónica de transmisión (TEM) utilizando un microscopio CM 120 (Philis, Eindhoven, Países Bajos). Se colocó una gota de suspensión de NPs en una microrejilla de cobre y se tiñó con una solución acuosa de silicotungstato de sodio al 1%.

4.3) Eficiencia de encapsulación.

Para evaluar la cantidad de proteína encapsulada, 100 μ l de la suspensión de NPs se centrifugó a 28000 x g en una centrífuga HAERAEUS (Biofugue Stratos), durante 30 min para separar la proteína libre en el sobrenadante (S) y la proteína encapsulada en el sedimento (P). A continuación, las proteínas encapsuladas se liberaron de las partículas disolviendo el polímero con 1 ml de acetonitrilo. La cantidad total de proteína en la formulación (T), en el sobrenadante y en las NPs presentes en el sedimento, se cuantificaron usando el reactivo de Bradford siguiendo el procedimiento descrito por

Zor y Selinger (1995) Como control del total de proteína agregada durante la formulación se tomaron 100 µl de la suspensión total de NPs y se agregó 1 ml de acetonitrilo. Luego se procedió como ya se describió. Comparando la cantidad de proteína en cada muestra se determina el porcentaje de encapsulación (E/E).

5) EVALUACIÓN DE LA INTEGRIDAD E INMUNOGENICIDAD DEL ANTÍGENO ENCAPSULADO.

5.1) Estudio de integridad.

Una vez formuladas las NPs, se realizó el estudio de la integridad de los antígenos encapsulados, rEgTrp y rEgA31, mediante electroforesis en poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE) comparándolos con las proteínas recombinantes sin encapsular. De esta forma se determina si el procedimiento de encapsulación altera la integridad de los antígenos recombinantes. Para cumplir con tal objetivo se trataron 100µl de las formulaciones de NPs en las condiciones descritas en la sección 8. Esto se realizó por triplicado. Se empleó el sistema de electroforesis Nu-PAGE, que incluye mini geles pre-ensamblados de poliacrilamida al 12% con SDS, antioxidante, y tampón de desarrollo (Invitrogen). El pellet obtenido de cada muestra se resuspendió en 6.5 µl de agua bi-destilada, se agregó 2.5 µl de tampón de muestra y 1 µl de agente reductor. Los 10 µl finales se sometieron a electroforesis en los mini-geles mencionados. La electroforesis se realizó a 100 mA empleando el sistema de electroforesis XCell SureLock™ Mini-Cell (Invitrogen). Como control se empleó la cantidad de proteína que inicialmente se

utilizó para preparar 100 µl de NPs.

5.2) Estudio de inmunogenicidad.

Para evaluar la inmunogenicidad de las proteínas, se llevó a cabo la técnica Western Blot. Las muestras obtenidas como en el estudio de eficiencia, se sometieron a SDS-PAGE al 12%, para luego ser transferidas a membranas de nitrocelulosa (Bolt Western Pack A nitrocellulose, Invitrogen) empleando el módulo de transferencia horizontal de mini geles Xcell II™ de Invitrogen, a corriente continua de 100 mA por 1 a 2 h. Se emplearon como anticuerpos primarios anti-EgTrp y anti-EgA31 generados en conejo, y como anticuerpos secundarios anticuerpos de ratón anti-IgG de conejo conjugado a peroxidasa (SIGMA). La señal se reveló usando Diaminobencidina (SIGMA).

6) PREPARACIÓN DE NPS FUNCIONALIZADAS CON EL ADYUVANTE MPLA.

La funcionalización de las NPs con MPLA (lípidos A monofosforilado de *Salmonella minnesota* R595, L6895, Sigma) tiene un doble objetivo en el desarrollo de la nanovacuna propuesta: a) aumentar la adhesión vía TLR-4 (Wassef et al 2004), presente en las células epiteliales de perros, para aumentar el pasaje de las NPs a través del epitelio intestinal, hacia el tejido linfático, y b) activar las células presentadoras de antígenos (CPA) para mejorar la presentación del antígeno a las células T y aumentar la inmunogenicidad de los antígenos (Elamanchili et al 2004, Sarti et al 2011). En el proceso de formulación de las NPs, primero se solubilizó 1 mg de MPLA en una mezcla de 1000 µl de metanol-cloroformo (1:4

v/v) que luego se disolvió en 10 ml de la fase orgánica de PLA antes de hacer la primera emulsión con los antígenos.

7) PREPARACIÓN DE NPS FUNCIONALIZADAS CON CHITOSAN.

El Chitosan (CS) incluido en las formulaciones con NPs tiene dos funciones importantes a nivel de las mucosas: a) aumentar la unión de las NPs a la mucosa intestinal porque tiene la propiedad de cargar las NPs positivamente (el mucus intestinal está cargado negativamente), b) abrir las uniones intercelulares de las células epiteliales intestinales para dejar pasar las NPs hacia el tejido linfoide de la mucosa intestinal (Jaganathan et al 2006, Gupta et al., 2011).

En una primera etapa se siguió el método de Gupta y colaboradores (2011) mediante el cual se agregaba el CS al PVA durante la preparación de las NPs. Sin embargo, cuando se estudió el porcentaje de encapsulación se observó que la proteína no quedaba encapsulada en la NPs por lo que se desestimó este procedimiento de funcionalización.

Se decidió funcionalizar la NPs con CS luego de la encapsulación. Para estandarizar la inclusión de este compuesto, primero se trabajó con las NPs sin antígenos (NP-blanco). Se prepararon NPs como se indicó en la tabla 1. Luego se centrifugaron a 28.000 x g durante 15 min y el sobrenadante se decantó para eliminar el PVA. Posteriormente se suspendieron las NPs en una solución acuosa de CS (1:4) con 0,025% por un lado, y con 0,1% de CS por otro, a diferentes pH. Se mantuvo cada solución bajo agitación magnética durante diferentes períodos (1, 4 o 24 horas). Cada suspensión obtenida se centrifugó nuevamente a 28000 x g durante 15 min. El pellet se suspendió en agua o solución acuosa de PVA al 2%.

Para determinar si la incorporación del CS fue efectiva, se midió el potencial Zeta, esperando fuera positivo. Posteriormente se prepararon las NPs con antígenos, con el agregado de CS siguiendo la metodología desarrollada.

8) ESTABILIDAD GÁSTRICA E INTESTINAL DE LOS ANTÍGENOS ENCAPSULADOS.

Uno de los problemas más importantes a resolver en el desarrollo de una vacuna oral es la estabilidad del antígeno durante su tránsito gastro-intestinal. Para evaluar el efecto de las condiciones gástricas e intestinales, en una primera serie de experimentos, se incubó una alícuota de NPs en una solución acuosa a pH 1,6 y otra alícuota en una de pH 6,8 simulando las condiciones gástrica e intestinal respectivamente. En una segunda serie de ensayos, se incubaron las NP durante 2 horas y en forma separada en: a) fluido artificial gástrico (FAG) preparado según Vertoni y col. (2012), y b) durante 2,5 horas en fluido artificial intestinal (FAI) preparado de acuerdo con Ingels y col. (2002). Para evaluar el efecto producido en las NPs, éstas fueron analizadas en cuanto a tamaño, potencial zeta e integridad del antígeno, de acuerdo a lo descrito anteriormente (secciones 4 y 9).

9) PROTECCIÓN DE LAS NPS DURANTE DEL PASAJE POR EL TRACTO GASTROINTESTINAL.

Con el objetivo de proteger las NPs durante el pasaje por el aparato gastrointestinal se procesaron las NPs de la siguiente manera: 2 ml de NPs liofilizadas se incluyeron en cápsulas de gelatina dura (CAPSUGEL) o fueron recubiertas por

una solución etanólica al 6% de un copolímero aniónico a base de ácido metacrílico y acrilato de etilo (EUDRAGIT® L100-55, EVONIK - USA).

Los ensayos de desintegración y disolución para ver la liberación de las NPs de las cápsulas protegidas, se realizaron siguiendo las recomendaciones de la Farmacopea Europea N° 8. Se determinó el efecto del pH 1,2 simulando las condiciones del estómago y pH 6,8 simulando las condiciones del intestino. Posteriormente se analizaron para determinar el tamaño, potencial zeta e integridad del antígeno como ya se describiera.

10) ESTUDIO DE LA ESTABILIDAD DE LAS NPs

Con el fin de obtener una forma estable y administrable por vía oral de NPs, se escogió la liofilización. Se añadió a la suspensión de NPs manitol o sacarosa como crioprotectores, a una concentración final entre 2 - 10%. La suspensión de NPs se congeló durante 2 h a -80°C antes de la sublimación. La liofilización se realizó en un liofilizador Sciquip, a una temperatura de la bandeja -15°C y una presión de 500 milibar durante 20 h. Las NPs liofilizados se mantuvieron a temperatura ambiente, en heladera o congeladas durante diferentes períodos. Posteriormente se reconstituyeron en agua y se analizaron para determinar el tamaño, potencial zeta e integridad del antígeno como ya se describiera.

11) ESTUDIOS DE INTERNALIZACIÓN DE LAS NPS USANDO UN MODELO DE MACRÓFAGOS MURINO.

Es importante que las vacunas activen el sistema inmune adaptativo y desarrollen memoria inmunológica. Las encargadas de activar las células T responsables de la memoria son las células presentadoras de antígenos (CPA). Para activar células T es necesario que los antígenos sean internalizados por las CPA, como macrófagos activados o células dendríticas, procesados y ensamblados en las moléculas de MHC de clase I y II (Murphy, 2017). Por lo tanto, el paso siguiente en el desarrollo de esta nanovacuna fue comprobar si las NPs podrían ser internalizadas por macrófagos murinos. Para ello realizamos una serie de experimentos para evaluar la citotoxicidad y la internalización de NPs en los macrófagos.

11.1) Evaluación de la citotoxicidad

Para evaluar los efectos tóxicos de las diferentes NPs desarrolladas, éstas fueron puestas en contacto con macrófagos murinos J774. Se evaluaron las preparaciones de NPs sin funcionalizar (NP) con MPLA (NP-MPLA), con CS (NP-CS) y con ambos (NP-MPLA-CS), teniendo en cuenta que estas moléculas podrían ser tóxicas para las células. Para cumplir con tal objetivo se cultivaron los macrófagos en botellas de 75 ml (NUNC) y mantenidos de acuerdo a las recomendaciones de la American Type Culture Collection (Waldorf, MD, EUA). La línea celular J774 se propagó en medio esencial mínimo (MEM) (Life Technologies, Carlsbad, CA, EEUU), a 37°C adicionando 10% de suero fetal bovino (SFB) en una atmósfera de CO₂ al 5%. Los macrófagos se despegaron con una solución de tripsina y se sembraron a continuación en placas de cultivo de fondo plano

de 96 pocillos en un volumen de 50 μ l, incubando a 37°C con 5% CO₂ hasta que la capa celular cubrió del 80 al 90% del fondo del pocillo. Posteriormente se agregaron a los cultivos las diferentes formulaciones de NPs ya indicadas, en diluciones de 1:10, 1:20 y 1:100 de la formulación original para determinar una dilución de trabajo no tóxica. Se evaluó la toxicidad de las NPs luego de 12 h de incubación mediante el ensayo de incorporación usando el kit de Ensayo de Proliferación Celular (MTT) no radioactivo de Cell-Titer 96 (Promega, Madison, WI, USA).

11.2) Evaluación de la internalización de NPs en macrófagos murinos.

El objetivo de estos experimentos fue estudiar la capacidad de la NPs formuladas para ser internalizadas por los macrófagos. Para cumplir con tal objetivo se agregó rojo Nilo (SIGMA) como marcador fluorescente a una concentración de 0.005%, en la solución orgánica de PLA/acetato de etilo basados en Almouzen y colaboradores (2012). Las NPs marcadas, NPs, NPs-CS, NP-MPLA y NP-MPLA-CS se adicionaron a los cultivos como se indicó en el ítem anterior. Los macrófagos a su vez se contra-colorearon con el colorante nuclear fluorescente Hoechst 33342 (Sigma). La aplicación de estos dos colorantes permitió observar claramente el núcleo de los macrófagos coloreados en azul y las NPs coloreadas en rojo en el citoplasma, luego de la internalización. Las muestras se observaron empleando un microscopio de fluorescencia (Zeiss, Axio-Imager) y microscopio Laser confocal (Leica TCS SP2). También se realizaron filmaciones para ver la dinámica de internalización de las NPs.

12) AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE CÉLULAS DENDRÍTICAS DERIVADAS DE MONOCITOS CANINOS.

Luego de determinar que las NPs bifuncionalizadas con CS y MPLA eran internalizadas por los macrófagos del modelo ratón, estudiamos si también eran internalizadas por las células dendríticas de perros derivadas de monocitos (cMoDCs). Por lo tanto, para cumplir con este objetivo aislamos y purificamos monocitos de perros para luego transformarlos en células dendríticas, mediante dos métodos, el método de células adherentes y la selección por CD14 (MACS). Los experimentos que indicaremos a continuación se llevaron a cabo en el laboratorio de Patología de la Escuela Veterinaria de Lyon bajo la supervisión del Profesor Thierry Marshal.

El proceso de purificación se realizó de acuerdo a Bonnefont-Rebeix y col. (2006). Se obtuvo sangre de 4 caninos Beagles adultos del instituto Claude Bourgelat del Campus Veterinario VetAgro-Sup de Lyon. El uso de estos animales de experimentación se realizó de acuerdo a la ordenanza de Experimentación Animal de la Facultad de Veterinaria de Lyon (VetAgro)- Lyon Francia. Se tomaron 40 ml de sangre de la vena yugular de cada perro en tubo ACD (BD Vacutainer, BD-Plymouth, UK) al día 0. Se separaron dos tubos con 20 ml por cada animal y se diluyó la sangre al medio con PBS estéril. Se tomaron 35 ml de la dilución sangre/PBS y 15 ml de Ficoll- Hypaque de 1,077 de densidad (Eurobio, Les Ulis, France), que se centrifugaron a 600 x g durante 30 min a 20°C. Luego las células obtenidas (paquete de células mononucleares de sangre periférica o PBMC) se lavaron tres veces con PBS estéril. Posteriormente para comprobar la naturaleza de las células, se realizó citometría de flujo marcando las células con un anticuerpo anti-CD14 como marcador específico de monocitos

sanguíneos. Las células positivas para CD14 se separan para continuar con cada uno de los métodos.

Siguiendo el método MACS, las células se resuspenden en PBS y se incuban durante 30 min a 4°C con anticuerpo hecho en ratón anti-CD14 bovino el cual tiene reacción cruzada con el CD14 de macrófagos y células dendríticas de perros (CAM36A, CliniSciences, Francia). Posteriormente se lavó con PBS y se incubó durante 30 min a 4°C con un anticuerpo hecho en cabra contra IgG de ratón ligados a partículas magnéticas (Miltenyi, Biotec, Francia). Finalmente se siembran en columnas MS de acuerdo al fabricante (Miltenyi, Biotec, Francia). Después de cinco lavados, se eluyen las células CD14+.

De acuerdo al método de adherencia, las PBMC se resuspendieron en el medio RPMI 1640, en una concentración de 10 millones de células/ml con el agregado de 100 U/ml de penicilina, 100 mg/ml de estreptomicina, 2mM de L-Glutamina y 2% de plasma canino autólogo (día 0). Se incubaron durante 24 horas a 37°C. Al día siguiente (día 1) las células no adherentes se eliminaron pipeteando suavemente con PBS pH 7,4, tres veces. Las células adherentes se cultivaron en RPMI durante 24 horas a 37°C, con el agregado de 800 U/ml de GM-CSF (Granulocyte Macrophage Colony-Stimulating Factor) humano, 500U/ml de IL4 canina, 25 ng/ml de Flt3L (receptor tyrosine kinase 3 ligand) humana y 10% de suero fetal bovino. En el día 3 se agrega medio fresco preparado como al inicio del experimento (día 0). En el día 4 se cambió el medio como en el día 1 dejando las células con este medio hasta el día 7. En este día se recuperaron las células adherentes denominadas células dendríticas inmaduras (iDC), se contaron y se determinó la viabilidad de las mismas usando Azul Tripán, mediante una lupa binocular. El porcentaje de iDC se determinó por citometría de flujo marcando 0-2

millones de células con anticuerpos específico de cMoDCs anti-CD14 y anti-CD80 y CD40.

13) ANÁLISIS DEL EFECTO DEL MPLA SOBRE LAS cMoDCs.

13.1) Viabilidad

Para evaluar la citotoxicidad de las NP-MPLA sobre las cMoDCs "adherentes" se incubaron las NP formuladas con diferentes concentraciones de MPLA (0.025%, 0.05%, 0.1% y 0.2%) durante 48 h. Las células se recogieron mediante tratamiento con tripsina (Eurobio, Francia), se tiñeron con 5 µl de Annexin V FITC y 5 µl de yoduro de propidio (FITC Annexin V Apoptosis Detection Kit I, BD Biosciences, Francia) y se analizaron directamente mediante citometría de flujo para evaluar apoptosis y necrosis respectivamente.

13.2) Activación

Se analizaron también los niveles básicos de expresión de los marcadores de activación de las células seleccionadas CD14+. Se utilizó como control positivo la estimulación de las células con LPS y como control negativo PBS durante 24 h. Se emplearon los anticuerpos anti-CD40 (LOB7/6, Serotec), anti-MHC II (YKIX334.2, Serotec), anti-CD80 (16-10A1, Biolegend) y anti-CD86 (IT2.2, Biolegend) marcado con moléculas fluorescentes, mediante citometría de flujo. Las células se tiñeron 30 minutos a 4°C con el anticuerpo primario (FITC o PE marcado) o el control del isotipo marcado, se lavaron con PBS y se analizaron con un citómetro Accuri (Becton Dickinson). Se registró el porcentaje de células positivas.

14) EVALUACIÓN DE LA INTERNALIZACIÓN DE NP POR LAS cMoDCs.

Basamos la metodología de estos experimentos en el conocimiento de que el hierro en los tejidos puede ser detectado y teñido con la coloración de Perls de acuerdo a Meguro y col. (2007), y que es posible encapsular Fe_3O_4 en polímeros biodegradables de acuerdo a Bakandritsos y col. (2010). Se desarrollaron las diferentes formulaciones de NPs incluyendo en la solución de PLA, 500 μl de una solución de Fe_3O_4 a una concentración de 5 mg/ml en tolueno y partículas de Fe_3O_4 de 5 nm de diámetro máximo (SIGMA), para un total de 20 ml de formulación, de acuerdo a la metodología descrita (tabla 1). Las formulaciones fueron las siguientes: NP- Fe_3O_4 , NP-MPLA- Fe_3O_4 , NP-CS- Fe_3O_4 . Luego de obtener las iDC de 6 días de cultivo en celdas portaobjetos Labtec (Lab-Tek® Chamber Slide™ System for "in vitro celular culture" se incubaron con las NPs+ Fe_3O_4 . Las células se centrifugaron durante 5 min a 500 rpm en una lámina de microscopio usando una centrífuga Cytospin-2 (Shandon, Cheshire, UK). Las láminas fueron teñidas con May-Grunewald-Giemsa (VWR) para estudiar la morfología de las células y/o con coloración de Perls (Bio-Optica, Milán, Italia). La observación de las células teñidas se realizó por microscopía óptica.

15) EVALUACIÓN DE LA ACTIVACIÓN DE CÉLULAS DENDRÍTICAS INMADURAS POR LAS NPs FORMULADAS.

Para evitar el desarrollo de tolerancia y desarrollar una buena respuesta inmune de células T es necesario activar las células dendríticas. Para comprobar si las NPs eran capaces de activar a las células dendríticas se enfrentaron las iDC obtenidas en el procedimiento anterior.

Las células dendríticas (DC) actualmente se dividen en tolerantes inmaduras y maduras inmunogénicas o activadas (Lutz y Schuler 2002). De acuerdo a Wang y col. (2005) la señal de activación parece ser la liberación de citoquinas pro-inflamatorias de las DC (IL12, TNF alfa, IL1 beta e IL-6) y la sobreexpresión de MHC-II, CD80 y CD86. Incubamos las iDC con los diferentes NPs producidas y determinamos la activación de las iDC por medio de citometría de flujo determinando los niveles de MHC-II, CD86 y CD80 expresados en la membrana celular de dichas células.

Las formulaciones analizadas fueron las siguientes: a) NP-EgTrp; b) NP-EgTrp-MPLA; c) NP-EgTrp-MPLA-CS; d) NP-blanco. Las iDC tratadas se incubaron 30 min a 4°C con los siguientes anticuerpos monoclonales específicos mAb conjugados con isotiocianato de fluoresceína (FITC) o ficoeritrina (PE) anti-CD14-PE (TU K4, Dako, Glostrup, Dinamarca), anti-MHC -II-FITC de perro (YKIX 334.2, Serotec, Oxford, Reino Unido), y anti-CD86 FITC humano (FUN-1, Becton Dickinson, y BU- 63, Chemicon, Temecula, CA, EE.UU.), o anti-CD86 humano (IT2.2, Becton Dickinson). Se realizó el análisis por citometría de flujo usando un citómetro de flujo FACSCalibur (Becton Dickinson, Pleasanton, CA, EE. UU.), con MacIntosh-Software CellQuest. La expresión de los antígenos de superficie, el porcentaje de intensidad de fluorescencia positiva y media (IMF) se calcularon mediante el software Accuri (Becton Dickinson). Se comparó la relación de IMF entre cada condición. Se empleó LPS (Sigma) a 2 µg/ml como control positivo.

16) ENSAYO CLÍNICO: ESTUDIO DE LA INMUNOGENICIDAD DE LAS NPs.

Luego de determinar si las NPs formuladas activan las células cMoDCs determinamos la inmunogenicidad de las NPs mediante vacunación vía oral estudiando luego la respuesta de anticuerpos.

16.1) Animales

Se inmunizaron 18 perros de entre 5 y 7 meses de edad, por vía oral, con diferentes formulaciones de NPs según se muestra en la tabla 2. Los perros fueron tratados, a los 2 meses de edad, con antihelmínticos como Biaverm® (Niclosamida y Levamisol) un antiparasitario de amplio espectro contra gusanos redondos, y Dolpac® (Oxantel, Pirantel y Praziquantel), y a los 4 meses de edad contra parásitos redondos y tenias. Posteriormente se trataron contra ectoparásitos cada un mes. Se vacunaron contra Parvovirus con Primodog® a los 3 meses de edad. También se vacunaron con Eurican®, contra Leptospirosis, Adenovirus y Parainfluenza. Fueron alimentados con alimento comercial y suplementados con carne de caballo, pasta y verduras. Los animales vivieron desde su nacimiento en una perrera especial para la investigación de Echinococcosis en la Escuela Veterinaria de Sidi Thabet-Túnez.

Tabla 1: Esquema de vacunación

GRUPOS	NPS	NÚMERO DE ANIMALES
I	BLANCO	3
II	NP-EgTrp	5
III	NP-EgTrp-MPLA	5
IV	NP-EgTrp-MPLA+CS	5

16.2) Nanopartículas

Las NPs empleadas en estos experimentos (tabla 1) crioprotegidas con 2% de manitol, liofilizadas y protegidas por cápsulas de gelatina dura (CAPSUGEL) conteniendo una dosis de 182,6 µg de antígeno.

16.3) Vacunación

La nanovacuna se suministró dentro de la comida. Los animales fueron mantenidos en ayuno 24 horas antes de ser vacunados. Se los mantuvo con agua *ad libitum*. Fueron vacunados los días 0 y 14 con una cápsula por vez, y mantenidos en observación durante 4 horas luego de suministrarles la vacuna.

16.4) Colecta de muestras

Se colectó suero, saliva y heces de cada uno de los animales a los días 1, 7, 14 y 21. Aproximadamente 1 ml de saliva fue colectada directamente de la boca con pipeta de plástico en forma individual. Las muestras se mantuvieron en hielo en primera instancia y posteriormente a -40°C. Las muestras de heces fueron obtenidas de acuerdo a la metodología utilizada por Lahmar y col. (2007) y guardadas a -40°C. A cada muestra de heces se le agregó Gentamicina y Azida de Sodio para evitar la contaminación bacteriana y fúngica. Se disolvió 2 mg/ml de Gentamicina y 10 mg/ml de Azida de Sodio en agua destilada. Se agregó 50 µl de esta solución y 100 µl de una solución de inhibidores de proteasas (Fast Protease inhibitor S8820-20TAB, Sigma) por cada 950 µl de saliva, suero o sobrenadante de heces.

16.5) Determinación de inmunogenicidad.

Para determinar niveles de IgM, IgA, IgG1, IgG2 se empleó el kit de ELISA Started Accesory Kit (# E101, Bethyl Laboratory) siguiendo las indicaciones del fabricante. Los conjugados contra los diferentes isotipos de Inmunoglobulinas fueron también de Bethyl Laboratory.

El pegado del antígeno (0,2 µg de EgTrp por pocillo) se realizó durante toda la noche en tampón carbonato pH 9.6 en agitación, a 4°C. Al día siguiente se lavó la placa, se bloqueó con solución proporcionada por el kit y se incubaron las siguientes muestras con el anticuerpo primario: suero 1/200, saliva 1/50 y heces 1/5 durante 1 hora a 37°C, diluídas con PBS. Luego se lavaron tres veces durante 5 min cada vez, con solución de lavado del kit. Posteriormente se incubaron durante 30 min con anti-isotipo de inmuoglobulinas de perros a una dilución 1/10.000 de: Anti-Dog IgA (#A40-104), Anti-Dog IgG1 (# A40-120P), Anti-Dog IgG2 (# A40 121P), anti-Dog IgM (# A40-116P). Finalmente, se incubaron con la solución de sustrato TMB del kit y se midió la absorbancia a 450 nm.

La determinación de IgE se realizó siguiendo el mismo procedimiento con la diferencia que el anticuerpo primario empleado fue anti-IgE-Biotinilada 1/10.000 y se incubaron 1 hora a 37°C tiempo Posteriormente se incubó con el polímero avidina-peroxidasa ultrasensible (1/1.000) (Sigma #S 2438)

17) EFICACIA DE LA NANOVACUNA

17.1) Animales

Este ensayo se realizó en Túnez, como prueba piloto, utilizando un bajo número de animales. Se emplearon perros de entre 5 y 7 meses, desparasitados con antihelmínticos y vacunados contra las infecciones más frecuentes de los cachorros, como se indicó en el experimento anterior (Tabla 2).

NÚMERO DE ANIMALES	NANOPARTÍCULAS
2	NP-EgA31-MPLA-CS NP-EgTrp-MPLA-CS
2	NP-Blanco

Tabla 2: Animales empleados en el ensayo de vacunación

17.2) Nanopartículas

Las NPs conteniendo cada uno de los antígenos en estudio se formularon como se indica en la tabla 1 y se funcionalizaron con MPLA y CS. Las NPs liofilizadas fueron protegidas con EUDRAGIT® L100.

17.3) Vacunación y desafío

Cada perro recibió 2 vacunaciones vía oral en intervalos de 3 semanas. Se administraron 2 cápsulas por inmunización/perro conteniendo rEgTrp en una y rEgA31 en la otra con una cantidad de antígeno de 182.6 µg totales.

Tres semanas después los animales fueron desafiados con 490.000 protoescolices de *E. granulosus*.

17.4) Análisis de resultados

La autopsia fue realizada a los 28 días post-infección (período prepatente). Se contaron los parásitos del intestino delgado por medio de raspaje de la mucosa y conteo por lupa binocular. Se expresaron en número de parásitos.

RESULTADOS

1) ENCAPSULACIÓN DE ANTÍGENOS EN NPs

Las proteínas obtenidas para la encapsulación fueron la paramiosina recombinante (rEgA31) y la tropomiosina recombinante (EgTrp) de *Echinococcus granulosus*, producidas de acuerdo a lo descrito en materiales y métodos. Obtuvimos una fracción de elución de la proteína rEgTrp con una buena concentración de acuerdo a lo observado en la Fig. 1A por SDS-PAGE 12%. Luego de la purificación se observó una fracción bastante pura y limpia analizada por la misma metodología con un peso molecular aproximado de alrededor de 27 KDa y una concentración de 1.8 mg/ml en el buffer de elución medido por el método de Bradford. Esta banda fue reconocida por un anticuerpo específico anti-rEgTrp por la técnica de Western Blot (resultado no mostrado). La proteína rEgA31 mostró una menor cantidad en el perfil de elución (Fig. 1C), pero una banda clara y relativamente limpia por encima de 55 KDa, con una concentración de 2.2 mg/ml en el buffer de elución medido por el método de Bradford, la cual se comprobó por Western Blot con un anticuerpo específico desarrollado en conejo.

Esta proteína fue encapsulada en el polímero PLA de acuerdo a lo descrito en la metodología (Fig. 1E) y los resultados mostraron que obtuvimos una suspensión homogénea de NPs límpida y blanca cuando se le agregó 2 ml de la solución de rEgTrp, y 2 ml de la solución de rEgA31 (Fig. 1E, Fig 1F). Se obtuvo un volumen final de 40 ml de una suspensión acuosa de NPs luego de la evaporación del acetato de etilo el cual se usó como solvente del polímero. Los antígenos rEgTrp y rEgA31 fueron

purificados por la MSc. C. Silvarrey (Sección Bioquímica, Facultad de Ciencias, UdelaR) (Fig. 1

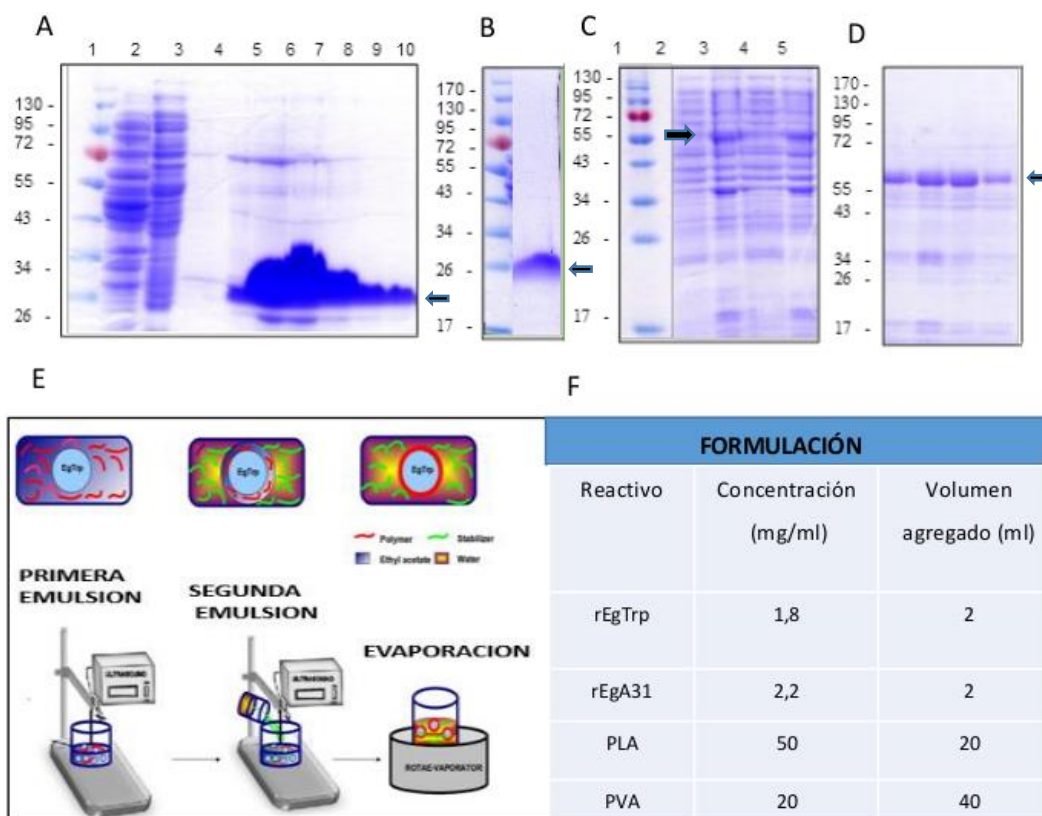


Figura 1. Encapsulación de los antígenos recombinantes. A-D SDS-PAGE 12% de: A) Perfil de elución de EgTrp. 1: Marcador de peso molecular; 2: muestra de partida, 3-10: fracciones eluidas. Purificación de rEgTrp. B) EgTrp, fracción seleccionada. C) Perfil de elución de EgA31. 1: Marcador de peso molecular; 2 y 4 fracción soluble; 3 y 5: fracción insoluble. D) EgA31, fracciones seleccionadas. Se indica el peso molecular a la izquierda. E) Método de doble emulsión y evaporación; Se indican las tres etapas empleadas en la formulación de las NPs: primera y segunda emulsión, y evaporación; F) formulación final de las nanopartículas. Las flechas indican a que nivel dónde se encuentran las proteínas en el SDS-PAGE.

2) TAMAÑO DE LAS NPs

El tamaño de las NPs fue determinado por medio de tecnología láser. Las NP-EgTrp analizadas presentaron un tamaño promedio de 181.1 nm con un índice de polidispersión (pdl) de

0.122 (Fig. 2), mientras que las NPs-EgA31 un tamaño promedio de 259,2 nm con un pdl de 0.125 (Fig. 3). En todos los casos se emplearon réplicas técnicas. Los resultados obtenidos con tecnología Lazer se correlacionaron con las observaciones realizadas en microscopía electrónica (Fig.4). Obsérvese que el tamaño de las NP-blanco sin proteína son más pequeñas (Fig.4 C) correlacionado con lo graficado con color bordeaux, violeta verde y oscuro (Fig. 3). Le sigue en tamaño NP-EgTrp lo graficado con color rojo verde y azul de la Fig. 2 correlacionado con la Fig. 4^a, y las NPs de mayor tamaño son las NP-EgA31 como se observa en la Fig. 4B. A mayor cantidad de proteína encapsulada es mayor el tamaño de las NPs.

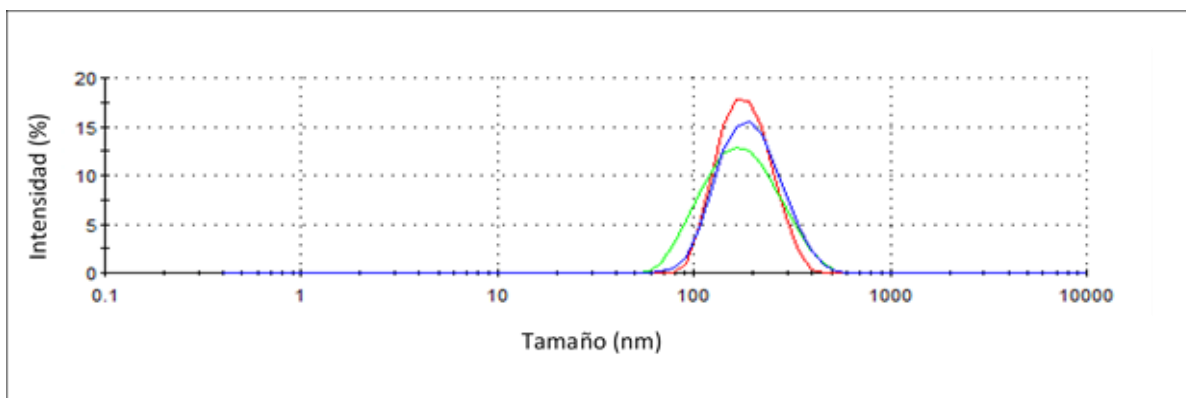


Figura 2. Tamaño de las NP-EgTrp. Distribución de tamaños de las NP-EgTrp. Se indican en rojo, verde y azul tres ensayos independientes.

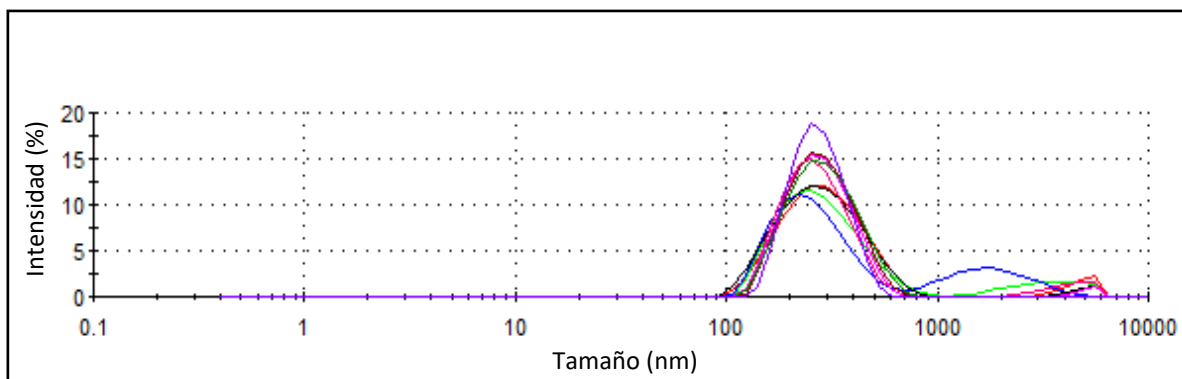


Figura 3. Tamaño de las NP-EgA31. Distribución de tamaños de: NP-blanco (bordeaux, violeta, verde oscuro), NP-EgA31 3 ensayos independientes (rojo, azul, verde) y sus repeticiones (negro, rosado, rosado suave).

Estos resultados se correlacionan con lo observado por medio de microscopía electrónica de transmisión (MET) (Fig. 4). Si bien las NPs de ambas formulaciones difieren en tamaño, están dentro de los valores esperados (< 300 nm). Por otro lado el índice de polidispersión nos indica que las preparaciones son homogéneas.

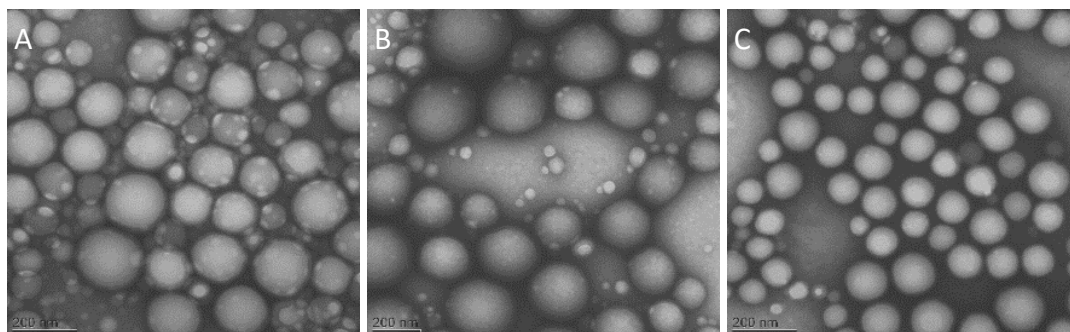


Figura 4. Tamaño y forma de las NPs. Microscopía electrónica de transmisión de: A) NP-EgTrp; B) NP-EgA31; C) NP-blanco.

Se determinó además, el tamaño de las NPs obtenidas empleando tres concentraciones de PVA, 0,5%, 1% y 2% (Fig. 5). Obsérvese que cuanto menor es la concentración de PVA mayor es el tamaño de la NPs, razón por la cual consideramos que una concentración del 2% es la adecuada.

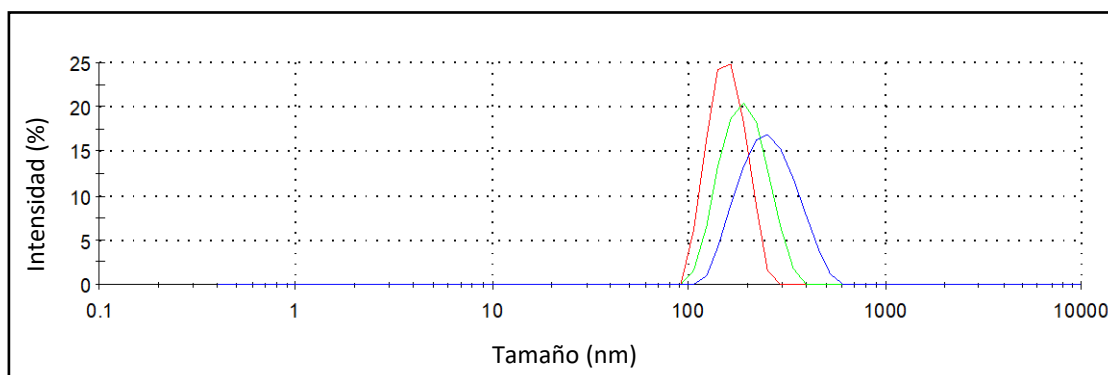


Figura 5. Efecto del PVA en el tamaño de las NPs EgTrp. Distribución de tamaños de: NP-EgTrp-PVA 2% (rojo); NP-EgTrp-PVA 0,5% (azul); . NP-EgTrp-PVA 1% (verde).

3) EFICIENCIA DE ENCAPSULACIÓN

Un paso importante en la caracterización de las NPs formuladas, es la determinación de la eficiencia de encapsulación. Para ello se debe disolver las NPs con un solvente adecuado para luego obtener y dosificar la proteína liberada. Para la disolución de las mismas fue necesario determinar cuál era el disolvente más adecuado. Como se indica en la tabla 1 el disolvente apropiado fue el Acetonitrilo. Consideramos que la disolución del polímero era completa cuando la formulación se presentaba transparente.

Tabla 1. Determinación del solvente adecuado para liberar las proteínas encapsuladas. T: formulación total; S: sobrenadante; P: pellet

NPS	SOLVENTE	RESULTADOS
400 µl NP(T)	1 ml acetona	Disolución incompleta
400 µl NP (P)	1 ml acetona	Disolución incompleta
400 µl NP (S)	1 ml acetona	Disolución incompleta
400 µl NP (T)	1 ml acetonitrilo	Disolución completa
400 µl NP (P)	1 ml acetonitrilo	Disolución completa
400 µl NP (S)	1 ml acetonitrilo	Disolución completa

Luego de seleccionado el solvente adecuado se analizó por medio de electroforesis desnaturizante en poliacrilamida (SDS-PAGE) si la proteína conservaba su integridad (Fig. 6). Los experimentos demostraron que la disolución de las NPs con

acetonitrilo no alteró la integridad de las proteínas encapsuladas. Obsérvese también que la proteína liberada del pellet (P) y la presente en el total de la formulación (T) nos muestra una banda similar de intensidad de coloración indicando que la cantidad de proteína presente en el pellet es cercana a la que presenta la formulación total. La no detección de proteína en el sobrenadante indica que la mayoría de la proteína fue encapsulada. Se incluyó en el ensayo la proteína pura, para controlar el efecto del acetonitrilo sobre las proteínas.

Se puede observar también que el tratamiento con el disolvente del polímero usado para formular las NPs no produce alteración en la integridad, ya que si comparamos las bandas de los carriles que contienen las proteínas con acetonitrilo con las no tratadas, el tamaño y la intensidad son similares (Fig. 6).

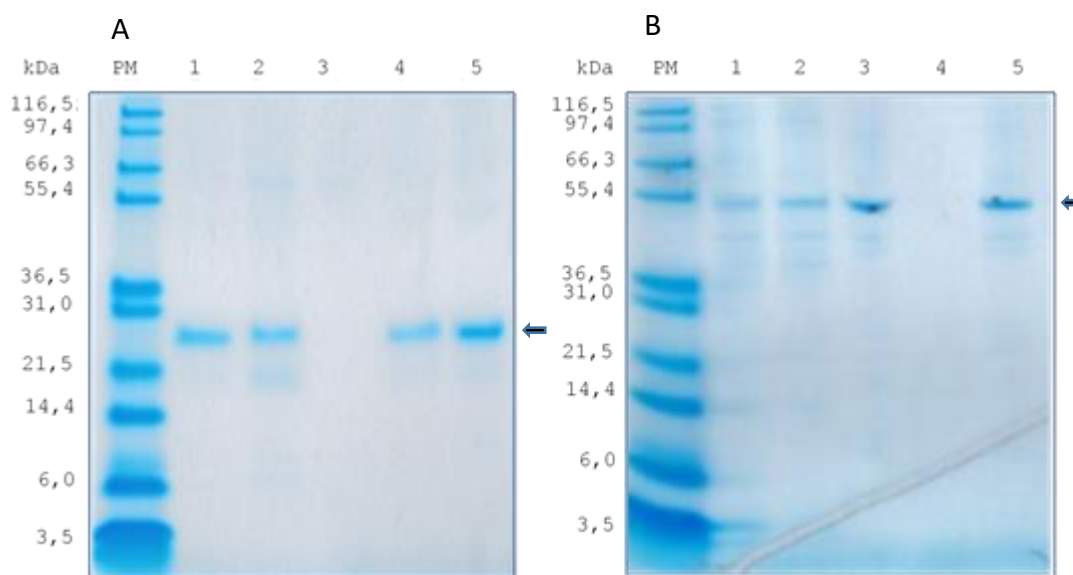


Figura 6: Eficiencia de encapsulación e integridad de las proteínas en la formulación. SDS-PAGE 12.5% teñido con Coomassie brilliant blue; **A)** (PM) marcador de peso molecular; 1) EgTrp (47,5 µg/ml); 2) NP-EgTrp(T); 3) NP-EgTrp(S); 4) NP-EgTrp(P); 5) EgTrp con acetonitrilo (47,5 µg/ml). **B)** (PM) Marcador de peso molecular 1) EgA31 (45,5 µg/ml); 2) EgA31 con acetonitrilo (45.5 µg/ml); 3) NP-A31(T); 4) NP-EgA31(S); 5) NP-EgA31(P). Las flechas indican a que nivel se encuentran las proteínas.

Finalmente, la eficiencia de encapsulación (E/E) se determinó como la diferencia entre la cantidad total de cada proteína agregada inicialmente y la cantidad total de cada proteína presente en el sobrenadante obtenido luego de disolver las NPs con acetonitrilo, utilizando el método de Bradford para dosificarlas. La tabla 2 muestra los resultados de E/E obtenidos. Estos resultados son concordantes con los resultados obtenidos por medio del SDS-PAGE (Fig. 6).

Determinamos también la eficiencia de encapsulación al usar diferentes concentraciones de PVA para asegurarnos que el porcentaje seleccionado de 2% no alteraba este parámetro (Tabla 3). Como puede apreciarse en la tabla, la elección del 2% fue adecuada, ya que se obtuvo el mayor porcentaje de proteína encapsulada.

A		B	
NPs	EFICIENCIA DE ENCPASULACIÓN (%)	NPs	EFICIENCIA DE ENCPASULACIÓN (%)
NP-EgTrp	85,61	NP-EgA31	94,59
NP-EgTrp	78,28	NP-EgA31	84,64
NP-EgTrp	87,41	NP-EgA31	61,71

Tabla 2: Eficiencia de encapsulación. A) EgTrp. Promedio: 82,9%; SD: 4.4. B) EgA31. Promedio 80,31%; SD: 14,28. Se muestran datos obtenidos de 3 ensayos independientes.

PVA AGREGADO A LAS NP-EgTrp (%)	EFICIENCIA DE ENCAPSULACIÓN (%)
2	78.28
1	66.66
0.5	71.45

Tabla 3. Efecto del PVA en la eficiencia de encapsulación.
Los datos son el promedio de triplicados.

4) ESTUDIOS DE INMUNOGENICIDAD.

Otro parámetro a determinar al caracterizar las NPs consiste en determinar si la inmunogenicidad de los antígenos encapsulados se mantiene, entendiéndose por inmunogenicidad la capacidad de una proteína de ser reconocida por anticuerpos específicos presentes en un antisuero, dirigidos contra ella. Si no se altera la integridad no debería alterarse la inmunogenicidad. Para ello, realizamos el tratamiento ya mencionado para liberar la proteína encapsulada para luego someterla a (SDS-PAGE) y Western blot, utilizando anticuerpos específicos anti-EgTrp. Como puede observarse en la figura 7, la proteína mantiene su reactividad frente al antisuero. Los mismos estudios realizados para EgA31 mostraron que esta proteína tampoco cambiaba su integridad ni su inmunogenicidad luego del procedimiento de encapsulación (resultados no mostrados).

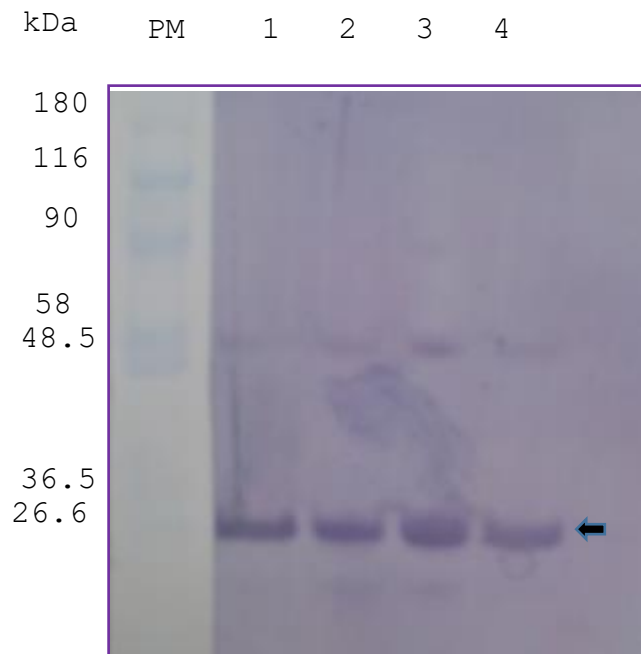


Figura 7: Estudio de la inmunogenicidad de la proteína *EgTrp* encapsulada. Western blot. PM: marcador de peso molecular 1: *EgTrp* (47.5 μ g/ml) tratada con acetonitrilo; 2, 3 y 4 son proteínas del pellets de 3 formulaciones de NP-*EgTrp* diferentes. La flecha indica a que nivel se encuentran las proteínas.

5) BIFUNCIONALIZACIÓN CON CHITOSAN Y LÍPIDO A MONOFOSFORILADO

El objetivo de la funcionalización de las NPs es aumentar la adherencia al mucus, y la activación de las células presentadoras de antígeno. Elegimos Chitosan (CS) para favorecer la adherencia y Lípido A monofosforilado (MPLA) para lograr la activación de las células dendríticas (DC) del perro. Luego de la formulación de las NPs agregando los compuestos mencionados, se procedió al estudio de sus características, mediante la determinación del tamaño y potencial Zeta, integridad e inmunogenicidad. El agregado del CS cambió la carga de las NPs, transformándolas en positivas, siendo esta transformación proporcional a la concentración del mismo en la formulación (Fig. 8A). El potencial Zeta de las NPs con CS también fue determinado a

diferentes pH mostrando la conservación de la carga positiva desde pH 4 hasta un pH de 7, alcanzando un valor de 8.6 mV a pH 5.5 (Fig. 8B). El estudio por microscopía electrónica de transmisión confirmó la presencia de CS sobre la superficie de las NPs indicado por la nube oscura alrededor de ellas (Fig. 8D). Estas imágenes muestran además que se conserva la forma esférica de las partículas. Por otro lado, como se observa en la figura 9 el tamaño de las NPs no cambia con el agregado de MPLA y aumenta con el agregado de CS superando levemente el tamaño esperado de 300 nm. Con respecto a la carga, el análisis de potencial Zeta indica que el agregado de MPLA no lo altera, pero sí el CS (Fig.10).

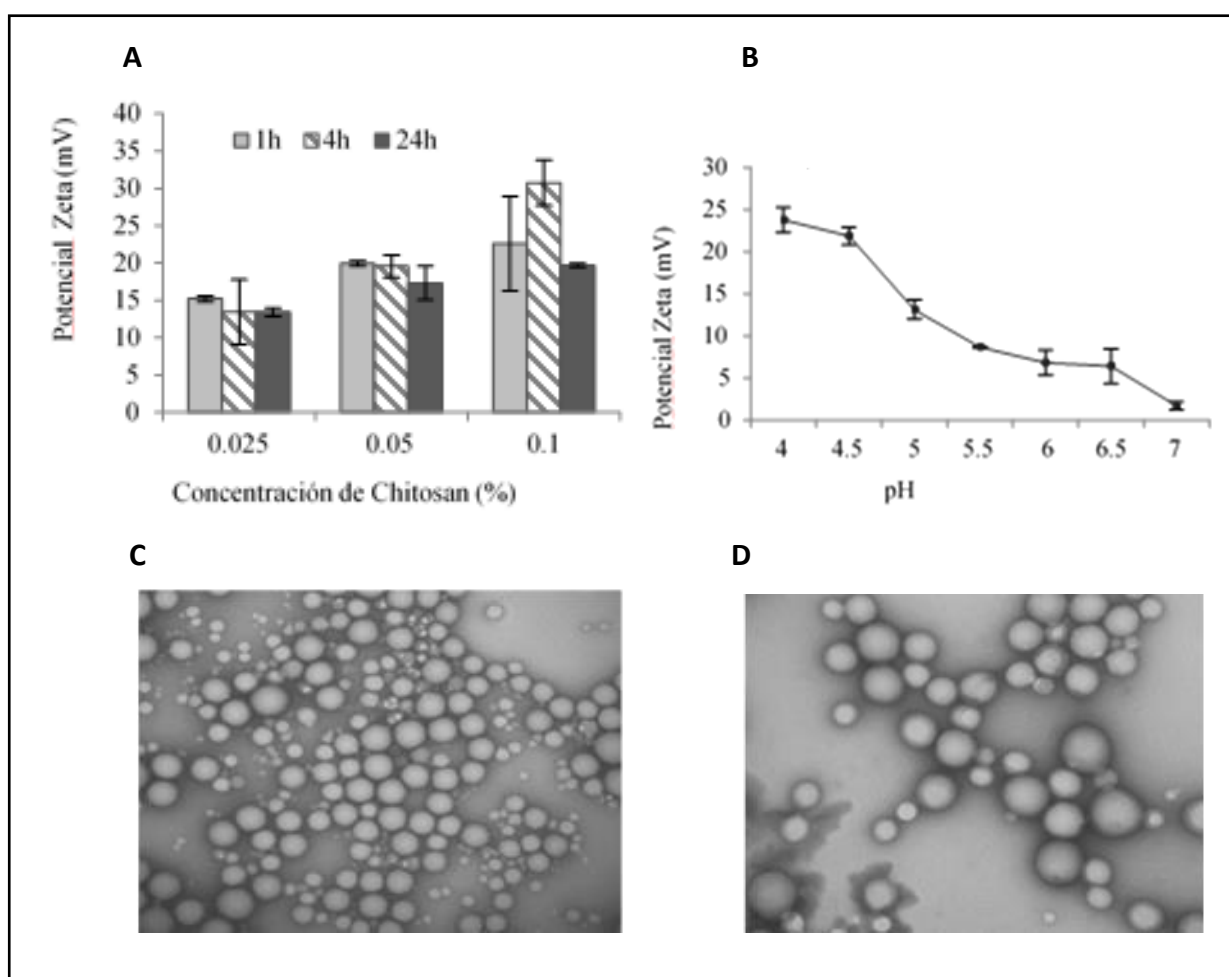


Figura 8: Efecto de Chitosan en las NPs-EgTrp. A-B) Medidas de potencial Zeta variando la concentración de CS a diferentes intervalos (A) y variando el pH (B). C-D) Imágenes de microscopía electrónica de transmisión de NPs-EgTrp sin (C) y con Chitosan (D).

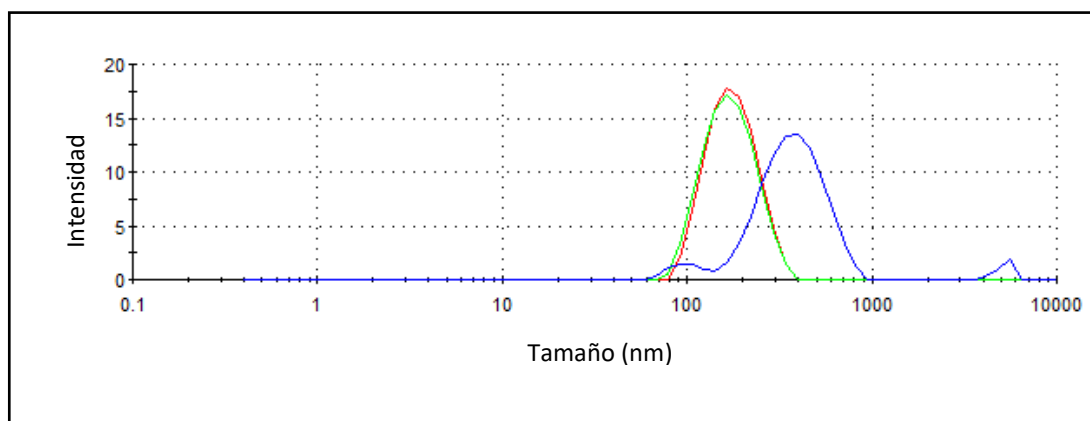


Figura 9. Efecto del CS y el MPLA en el tamaño de las NPs.

Distribución de tamaño de: NP-EgTrp (rojo); NP-EgTrp-MPLA (verde); NP-EgTrp-MPLA-CS (azul).

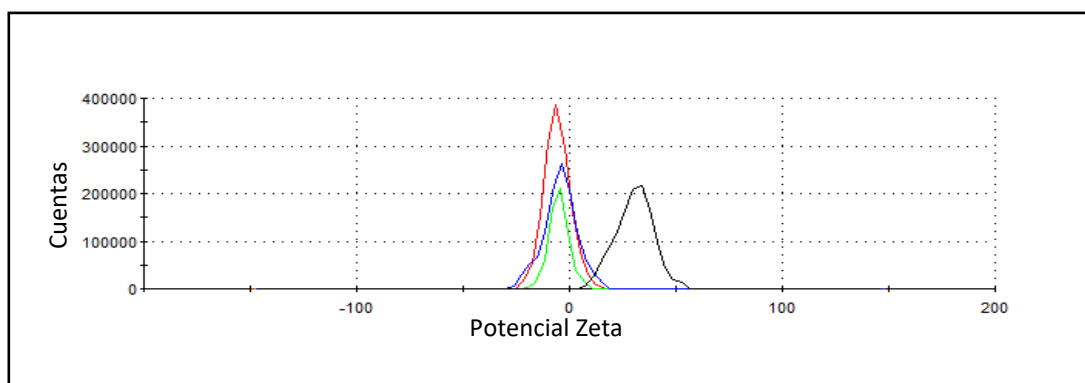


Figura 10. Potencial Zeta de las NPs bi-funcionalizadas con MPLA y CS.

Se indica en color las diferentes formulaciones: NP-blanco(rojo); NP-EgTrp (verde), NP-EgTrp-MPLA (azul) NP-EgTrp-MPLA-CS (negro).

6) MÉTODO DE CONSERVACIÓN DE NPs.

Con el fin de asegurar estabilidad de las NPs a largo plazo, se procedió a liofilizarlas en presencia de manitol o sacarosa como agentes protectores, previa determinación de la concentración más adecuada de ambos carbohidratos. El liofilizado fue luego introducido en cápsulas de gelatina dura (CAPSUGEL) en una dosis de 182,6 μg de proteína por cápsula seguido de recubrimiento entérico con Eudragit. Nuevamente fue necesario determinar si la distribución de tamaño, y carga de

las NPs, y sobre todo si la antigenicidad de las proteínas encapsuladas se conservaba. Como puede apreciarse en la tabla 4, no se observan diferencias mayores en presencia de cualquiera de los aditivos agregados.

El efecto de la sacarosa y el manitol sobre la integridad e inmunogenicidad de EgTrp luego de tratar las NP con acetonitrilo para liberar el antígeno, puede verse en las figuras 11 y 12. Como puede apreciarse, no se produce alteración en ninguna de estas propiedades.

A		B	
MANITOL AGREGADO (%)	TAMAÑO DE LAS NPs (nm)	SACAROSA AGREGADA (%)	TAMAÑO DE LAS NPs (nm)
0	159,9	0	159,9
2	213,1	2	195,4
4	242,4	4	188,6
6	192,2	6	193,6
8	187,7	8	193,6

Tabla 4. Efecto de la concentración de los crioprotectores en el tamaño de las NP-EgTrp liofilizadas. A): manitol; B) y sacarosa

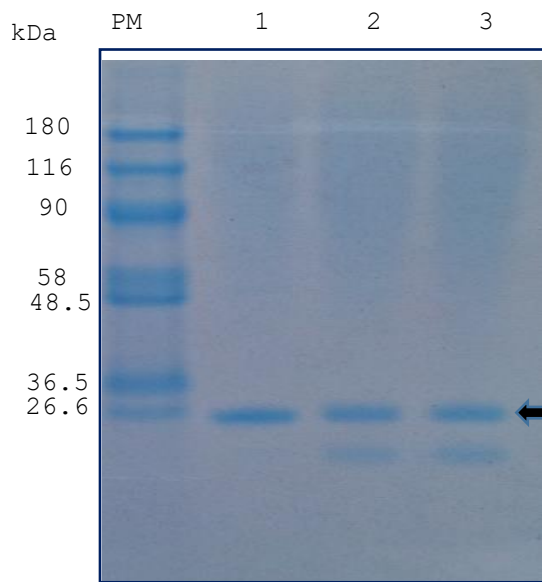


Figura 11: Efecto de la sacarosa y el manitol sobre la integridad de EgTrp encapsulada. Estudio por SDS-PAGE de la integridad de la EgTrp, usando sacarosa y manitol como crioprotectores. PM) marcador de peso molecular; 1) NP-EgTrp; 2) NP-EgTrp con sacarosa 2% luego de liberada la proteína del pellet; 3) NP-EgTrp con manitol 2%. Todas las muestras se trataron con acetonitrilo. La flecha indica a que nivel se encuentran las proteínas.

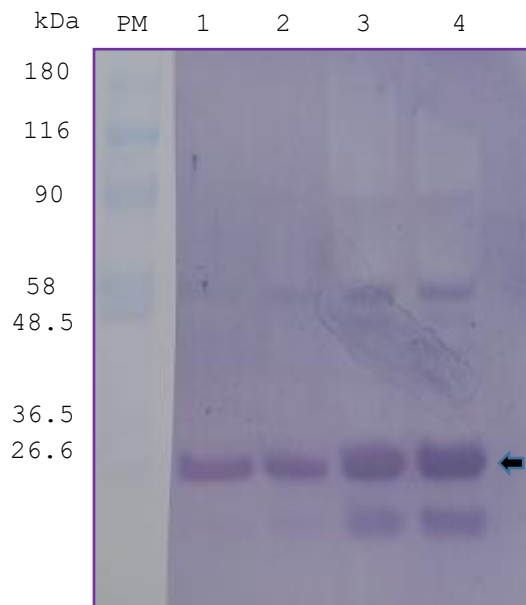


Figura 12. Efecto de la sacarosa y el manitol sobre la inmunogenicidad de EgTrp encapsulada. Western-Blot de la EgTrp, usando sacarosa y manitol como crioprotectores. PM) marcador de peso molecular 1) EgTrp (42,5 $\mu\text{g/ml}$); 2) NP-EgTrp de las NPs sin liofilizar; 3) NP-EgTrp con sacarosa 2%; 4) NP-EgTrp con manitol 2%. Todas las muestras se trataron con acetonitrilo. La flecha indica a que nivel dónde se encuentra la proteína.

7) EVALUACIÓN DE LA INTEGRIDAD DE LOS ANTÍGENOS ENCAPSULADOS FRENTE A CONDICIONES GASTROINTESTINALES.

Un aspecto importante a tener en cuenta en la formulación de una vacuna oral, es su protección frente al medio gástrico y al intestinal. Para llevar a cabo esta evaluación, las NPs fueron primero sometidas a los pHs gástrico (pH 1,6) e intestinal (pH 6,8), durante 2 y 6 horas (Fig. 13). Luego del ensayo se liberaron los antígenos como ya se describiera, y se analizaron por electroforesis. Como puede apreciarse en la figura no se observa alteración de la integridad de los antígenos encapsulados luego de las 2 horas de incubación. En base a este resultado procedimos a incubar las NPs durante 2 horas en los fluidos artificiales gástrico (FAG) e intestinal (FAI). La figura 14 muestra que la incubación en el FAG no alteró ninguno de los antígenos, observándose la degradación total frente al FAI.

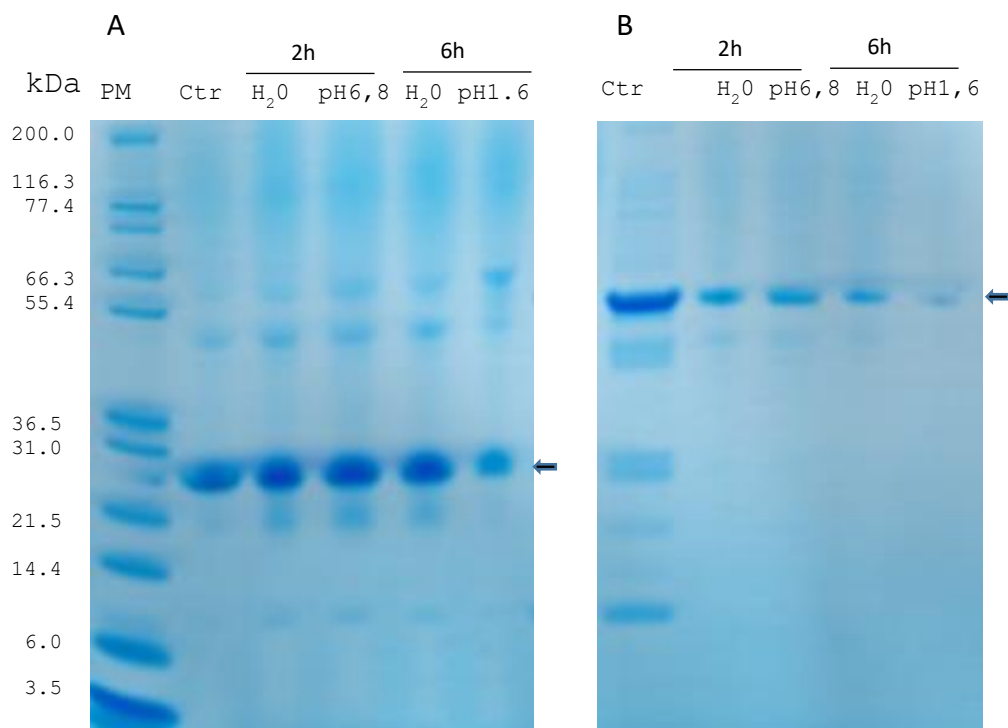


Figura 13. Protección de los antígenos contra la degradación gástrica e intestinal. Análisis por SDS-PAGE 12% teñido con Coomassie brilliant blue de EgTrp (A) y EgA31 (B) extraídas de sus respectivas NPs-MPLA luego de incubación en agua o solución a pH6,8 y 1,6 luego de 2 y 6 horas de incubación. Ctr: ntígenos sin tratar.

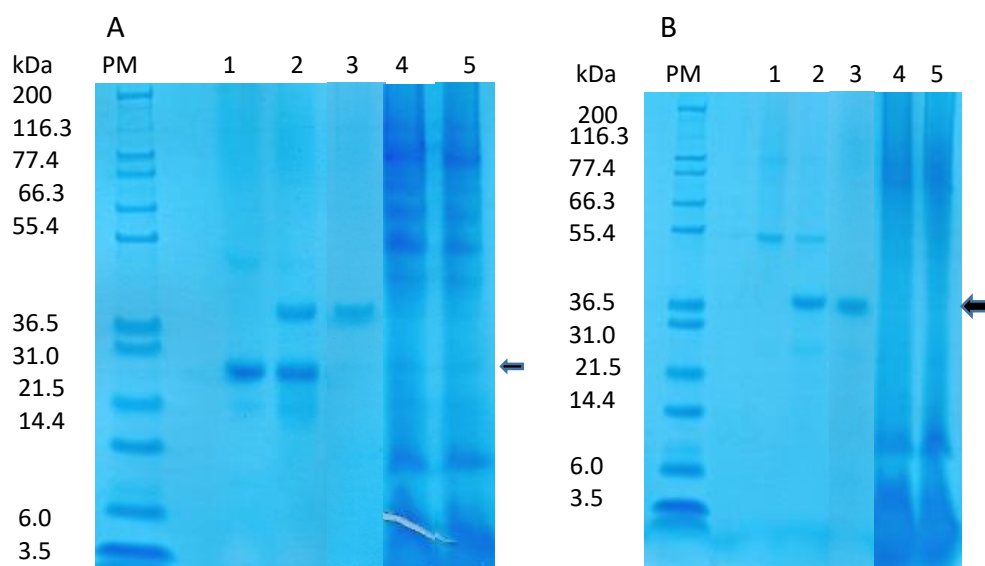


Figura. 14. Protección de los antígenos encapsulados frente a fluidos gástrico e intestinal artificiales. Análisis por SDS-PAGE 12% teñido con Coomassie brilliant blue A:1) NP-EgTrp sin tratar; 2) NP-EgTrp-FAG; 3) NP-blanco-FAG; 4) NP-EgTrp-FAI; 5) NP-blanco-FAI; B:1)NP-EgA31 sin tratar; 2) NP-EgA31-FAG; 3) NP-blanco-FAG; 4) NP-EgA31-FAI; 5) NP-blanco-FAI. PM: marcador de peso molecular; FAG: fluido gástrico; FAI: fluido intestinal. Las flechas indican a que nivel se encuentran las proteínas

Frente al resultado obtenido cuando se incubaban las NPs con el fluido intestinal artificial como se muestra en la figura 14B carril 4 y 5 pensamos que las enzimas del FAI podían haber quedado adheridas a la superficie externa de las NPs. Una hipótesis a éste fenómeno fué que cuando hicimos el tratamiento con acetonitrilo para liberar EgA31 de las NPs entonces las enzimas del FAI degradaron la EgA31. Como forma de verificar ésta hipótesis realizamos una serie de experimentos variando el pH para inactivar las enzimas que pudieran estar adheridas por fuera de las NPs. En éstos experimentos en pH <1.2 no se observó degradación de la EgA31 (Fig. 15; carril 5- NP-EgA31+FAI). Para proteger nuestros antígenos del pasaje por el estómago liofilizamos las NPs luego de la encapsulación de los antígenos y empaquetamos las NPs

dentro de cápsulas de gelatina. Posteriormente se sometieron las capsulas a media gástrico e intestinal artificial para ver el efecto sobre el tamaño e inmunogenicidad de EgTrp transportada dentro las NPs (Fig.16).

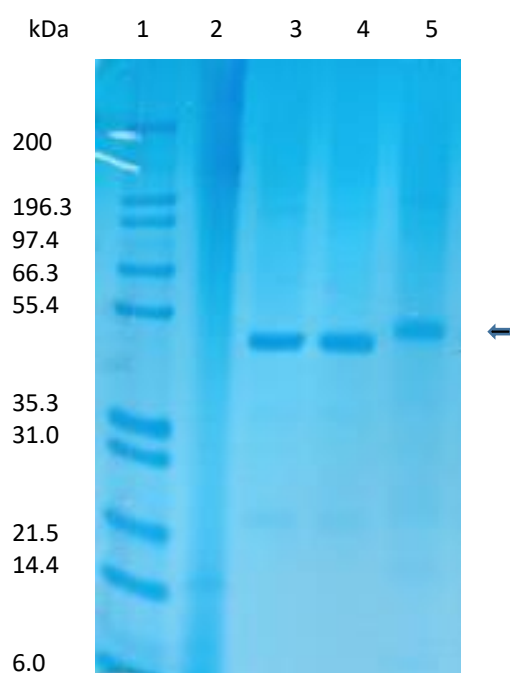


Figura 15. Protección de EgA31 frente a FAI intestinal.

SDS-PAGE 12.5% teñido con Coomassie Blue. 1) marcador de peso molecular; 2) NP-Blanco; 3 y 4) NP -EgA31; 5) NP-EgA31+FAI +HCl pH 1.2. La flecha indica a que nivel se encuentra la proteína.

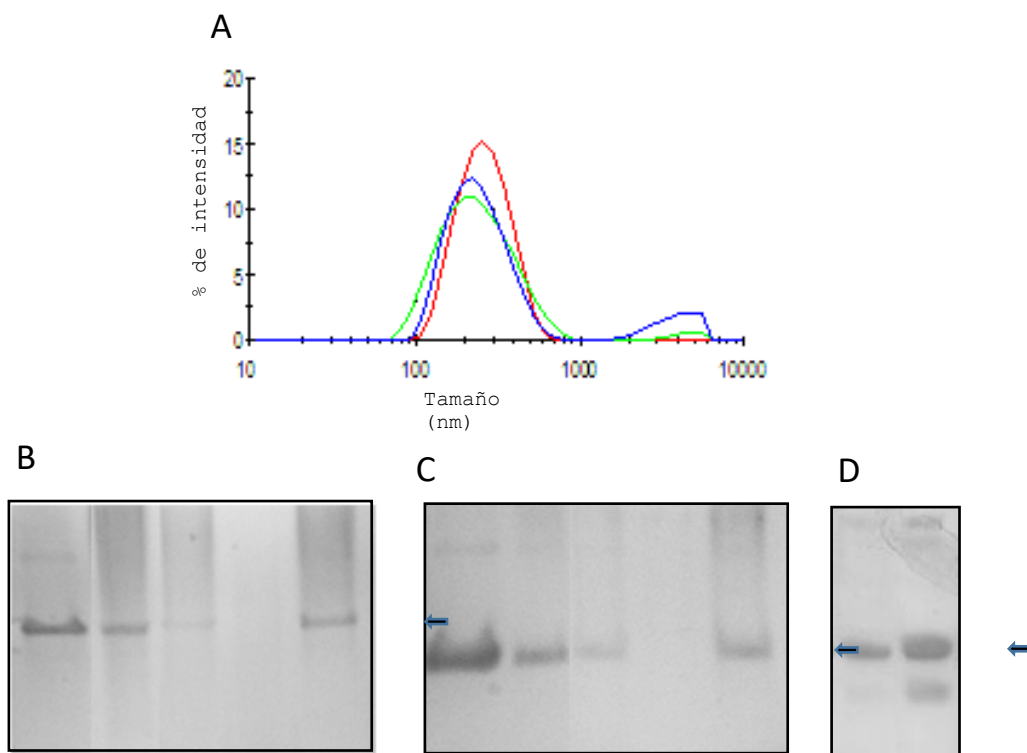


Figura 16. Caracterización de las NPs en cápsulas de gelatina.

A) distribución de tamaño de NP-MPLA-CS luego de liofilizadas y redispersadas en agua (verde) y luego de disolver las cápsulas pH 6.8 (Azul) comparadas con las NP-MPLA-CS iniciales(rojo); B y C) análisis por SDS-PAGE de las proteínas extraídas B) *EgA31* y C: *EgTrp*. Se emplearon antígenos libres como control (carril 1). Se extrajeron las proteínas de las NPs liofilizadas (carril 2), de la suspensión total (carril 3), del sobrenadante (carril 4) y del pellet (carril 5) de las cápsulas con NPs luego de disueltas en el medio intestinal; D) análisis por Western blot de *EgTrp* extraída de NPs antes (carril 1) y después de la liofilización (carril 2). Las flechas indican a que nivel se encuentran las proteínas.

8) INTERNALIZACIÓN de NPs Y ACTIVACIÓN POR CÉLULAS PRESENTADORAS DE ANTÍGENOS

Una vez verificada la integridad de los antígenos encapsulados en las NPs formuladas, se iniciaron una serie de estudios *in vitro* para determinar si las NPs eran internalizadas por las células presentadoras de antígenos y

eran capaces de activarlas. En estos estudios se cultivaron macrófagos de ratón y células dendríticas de perro derivadas de monocitos (cMoDCs) empleando microscopía óptica y confocal, y citometría de flujo. Se adicionaron marcadores específicos a las NPs de acuerdo al método de análisis a emplear. Adicionalmente, se analizó la calidad de adyuvante del MPLA empleando como referencia moléculas co-activadoras del sistema inmune

8.1 Estudios de internalización en macrófagos.

Como paso previo a los estudios de internalización y activación de las diferentes formulaciones de NPs en células dendríticas de perros se realizaron estudios usando macrófagos de ratón. En este caso, las NPs fueron marcadas con rojo Nilo. Para interpretar estos resultados es importante mencionar que las NPs deben ser captadas endocitadas y biodegradadas por los macrófagos. Las NPs no degradadas se observarán de color rojo porque no hay degradación en el fagolisosoma. La viabilidad de los macrófagos murinos se determinó previamente por el método de MTT obteniendo una viabilidad superior a 90% en una concentración de 100 μ l de la formulación de NP-MPLA sin antígeno.

Los resultados obtenidos indican que las NPs fueron internalizadas rápidamente por los macrófagos habiéndose observado NPs dentro de los macrófagos a las 2 h de incubación (Fig. 17).

Es interesante destacar el efecto que produce la inclusión del MPLA en la formulación de las NPs a las 24 h de incubación. Como puede observarse en la figura, se detecta una drástica disminución de la coloración rojiza dentro de los macrófagos

cuando se incluyó este compuesto. Por otro lado, los macrófagos incubados con NPs formuladas con CS presentan acúmulos de material teñido con Rojo Nilo indicando una menor biodegradación. Finalmente, en los macrófagos enfrentados a las NPs con MPLA y CS (CS-MPLA-NP) se observó una coloración rojiza leve sugiriendo la presencia de mayor número de NPs sin biodegradar.

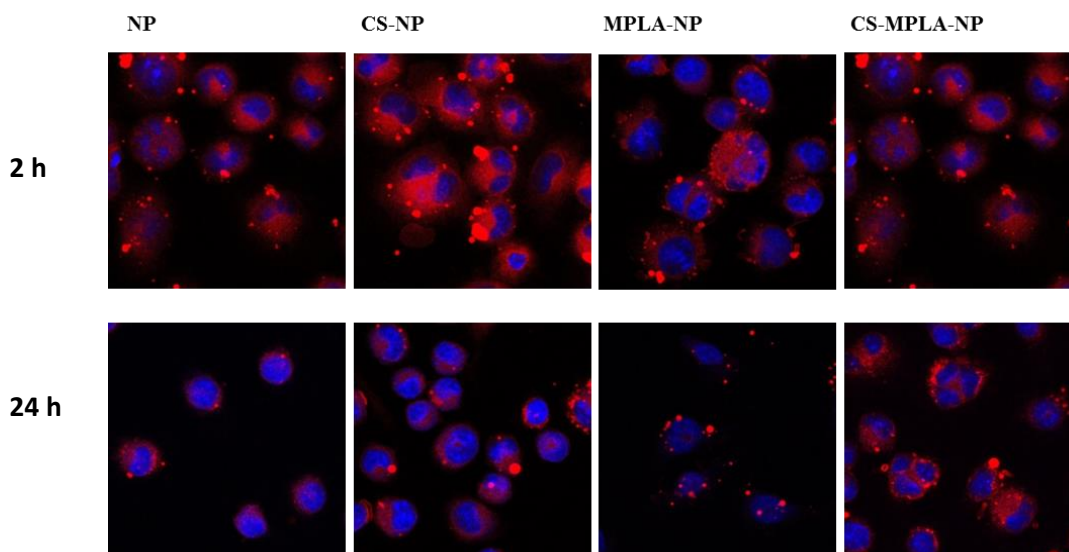


Figura 17. Internalización de las NPs por macrófagos: Imágenes de microscopía confocal de macrófagos de ratón J774 después de 2 y 24 horas de incubación con NPs marcadas con Rojo Nilo. NP: NPs blanco; CS-NP: NPs-Chitosan; MPLA-NP: NPs-MPLA; CS-MPLA-NP: NPs-CS-MPLA.

8.2) Purificación de células dendríticas (cMoDCs) obtenidas de células mononucleares de perro.

Se emplearon dos métodos de purificación de cMoDCs, el método de purificación por partículas magnéticas con el anticuerpo anti-CD14, y el de adherencia. En una primera etapa se realizaron estudios morfológicos y de calidad de la purificación mediante tinción de May Grunwal Giemsa (MGG) y por citometría de flujo respectivamente, para comparar los dos

métodos de purificación utilizados. Los resultados mostraron que morfológicamente no hay importantes diferencias entre ambos métodos, observándose diferencias en la pureza del tipo celular obtenido.

Aplicando el método de adherencia, los cambios morfológicos observados después de la tinción de MGG entre células adherentes en el día 1 y cMoDCs en el día 6 como se observa en la figura 18A parte izquierda. En el día 1, las células adherentes PBMC, son pequeñas y redondas, con un núcleo ovoide o en forma de riñón y un citoplasma expandido moderado. Después de 6 días de cultivo con cGM-CSF y cIl-4 (MoCDs - día 6), los cMoDC "adherentes" son más grandes y muestran un citoplasma más expandido con proyecciones citoplasmáticas delgadas (dendritas) que irradian desde la superficie. En los perfiles de citometría de flujo, las células PBMC en el canal de monocitos en el día 0 aparecen con tamaño pequeño (FSC) y granulometría (SSC) mientras que en el día 6 observamos un fuerte aumento de ambos parámetros, confirmando los cambios morfológicos (Fig. 18B parte izquierda). Este protocolo permite obtener en el día 6, 1×10^6 cMoDC "adherentes" por cada 25×10^6 PBMC en el día 0. La eficacia relativa de purificación partiendo del PBMC es aproximadamente 4%. Sin embargo, también se observó un número significativo de otros tipos de células, tales como linfocitos, células polimorfonucleares o plaquetas en el cultivo en el día 6.

Usando el método de selección con partículas magnéticas con el anticuerpo anti-CD14 (protocolo anti-CD14, Fig. 18), se observaron cambios morfológicos similares entre las PBMC seleccionadas con CD14 en el día 1 y las cMoDCs seleccionadas en el día 6 (Fig. 18A, parte derecha). En el día 0, las células CD14 + son pequeñas, redondas con núcleo ovoide o en forma de

riñón y citoplasma expandido moderado, similares a las células obtenidas por el protocolo de adherencia en el día 1 del método anterior (Fig. 18). En el día 6, las células son más grandes y muestran numerosas proyecciones citoplásmicas delgadas (Fig 18A parte izquierda). Estos resultados se confirmaron mediante citometría de flujo (figura 18 B parte izquierda). El protocolo MACS permite obtener 5×10^5 células CD14⁺ al día 0 partiendo de 25×10^6 PBMC, y un total de 1×10^5 de cMoDC en el día 6. Por lo tanto, la eficacia relativa de obtención de número de PBMC iniciales es $< 0,4\%$. Por otro lado, siguiendo el método de adherencia, se obtienen al día 6, 1×10^6 , pero con una eficiencia relativa del 4%. Sin embargo, estas células están contaminadas con linfocitos, plaquetas y polimorfonucleares. Si comparamos los dos protocolos, la pureza de las cMoDCs obtenidos con anti-CD14 fue superior al 90%, lo cual nos permite trabajar con células dendríticas casi puras, aunque su número sea menor.

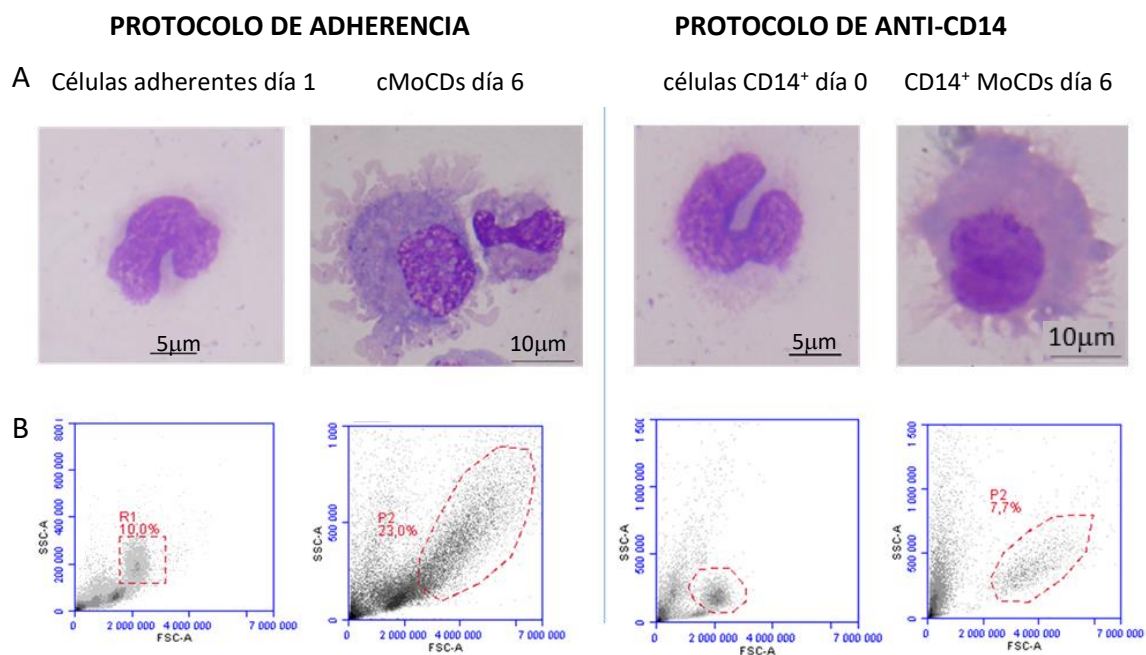


Figura 18. Caracterización de cMoDCs. A) Cambios morfológicos observados por microscopía óptica con la tinción de May Grunwald Giemsa de células obtenidas por los métodos de adherencia y de selección por CD14⁺. B) Perfiles de citometría de flujo de células obtenidas por los métodos de adherencia y de selección por CD14⁺. Círculo rojo punteado indica las células purificadas por cada protocolo.

8.3 Efecto de las NPs funcionalizadas con MPLA sobre la viabilidad y activación de las cMoDCs

De acuerdo con los resultados mostrados en la figura 19, las formulaciones de nanopartículas con o sin MPLA no tienen efecto citotóxico sobre cMoDCs "adherentes"; la viabilidad celular fue superior al 90% en todos los casos. Las cantidades de MPLA no tuvieron ningún efecto significativo sobre la viabilidad celular. Se observó una disminución de la viabilidad celular de 86% con MPLA 0,2% (Fig. 19).

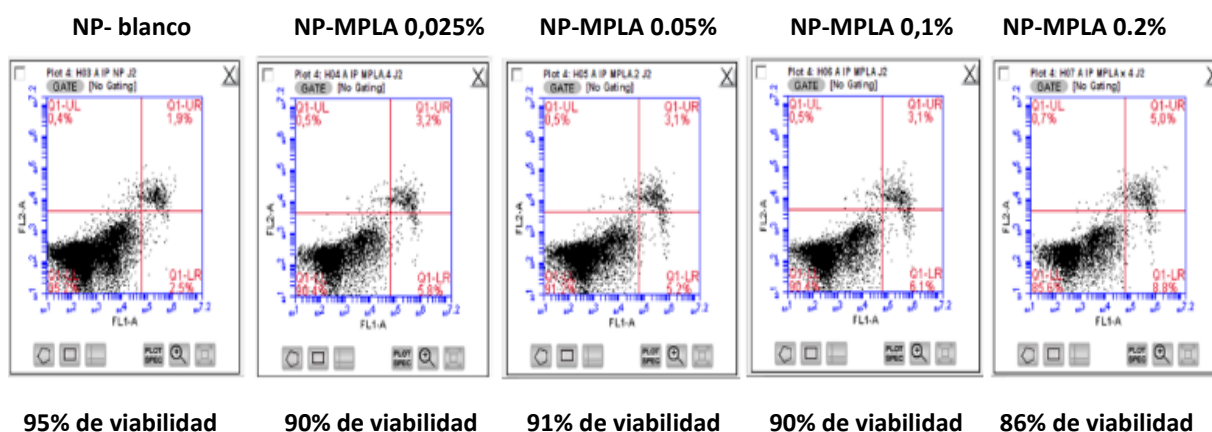


Figure 19. Viabilidad de cMoCDs de perro. Perfiles de citometría de flujo de viabilidad obtenidos luego del teñido con Annexina V e Yoduro de Propidio de células cMoDCs luego de 48 h de incubación con NPs con diferentes cantidades de MPLA. La Annexina V está en el canal FL1-A y el yoduro de propidio en el FL2-A.

Se estudió la expresión de los marcadores de activación de las cMoDCs seleccionadas por anti-CD14, en el día 7 de cultivo luego de 24 h de contacto con diferentes NPs. Los resultados en la tabla 5 muestran que 24 h después de incubación, la expresión de MHC-II, CD80, CD86 y CD40 aumenta claramente en la estimulación con LPS (control positivo) en comparación con el control negativo. Cuando comparamos las

diferentes concentraciones de MPLA en las NPs vemos que todas las concentraciones observadas en la tabla 5 nos muestran un aumento de MHC-II, CD80 y CD40 al igual que el control positivo (LPS), pero que la única formulación que nos muestra un aumento claro de CD86 comparado a la estimulación con LPS son las NPs-MPLA 0.025. Consideramos que ésta concentración es adecuada y el marcador de activación para nuestro modelo de CDs es CD86. Estos experimentos nos permiten concluir que las NPs con MPLA a una concentración de 0.025% son las más apropiadas para el desarrollo de una nanovacuna debido a que inducen una mayor activación de las cMoDCs.

Esta formulación con 0.025% de MPLA se empleó en experimentos posteriores para ver su efecto en la activación de células dendríticas.

	PBS	LPS	NPs-MPLA 0.025%	NPs-MPLA 0.05%	NPs-MPLA 0.1%	NPs-MPLA 0.2%
CD80	91.5	95.1	94.5	94.2	95.5	88.8
MHC II	90.5	95.5	94.5	93.9	96.6	94.4
CD40	73.5	81	73.2	73.3	76.6	76.8
CD86	42.5	70.3	64.1	54.6	44.9	43.1

Tabla 5. Porcentaje de células positivas para CD80, MHC II, CD40 y CD86 24 horas después del contacto con PBS (control negativo), LPS y NPs-MPLA.

8.4. Evaluación de la internalización de NPs en cMoDCs.

Para evaluar la internalización de las diferentes formulaciones en las cMoDCs, las NPs se marcaron con óxido de hierro, que se puede visualizar mediante tinción de Perls que colorea de azul las NPs. Después de 2 h de incubación, los resultados mostraron que con NP-MPLA 0.1%, el hierro (tinción

azul) se observa principalmente en la superficie de las dendritas en forma de pequeños gránulos azules (aproximadamente 0,2 μm de diámetro) con un tamaño compatible con el tamaño de las NPs formuladas (Fig. 20A1). El hierro parece estar presente en las NPs que se observan en la parte externa de las cMoDCs, que aún no están internalizados y degradados. Para las NP-blanco, algunos de estos pequeños puntos azules se observan en el citoplasma (Fig.20B1).

Después de 24 h de incubación, observamos en la condición NP-blanco, grandes acúmulos azules (alrededor de 1 a 2 μm de diámetro) en el citoplasma del 44% de las células contadas bajo microscopio óptico y pequeños acúmulos azules (alrededor de 0,4 μm de diámetro) en el citoplasma del 7% de células (Fig. 20B1), mientras que con las NP-MPLA se observan acúmulos azules grandes se observaron solo en el 5% de las células y pequeños acúmulos azules en el 41% de las células (Fig. 21B2-B3). Los gránulos son más grandes a las 2 h después del contacto, lo que sugiere una degradación de las NPs en las cMoDCs y una acumulación de hierro en las vacuolas endocíticas. El tamaño de los gránulos depende de la presencia o ausencia de MPLA. En el segundo experimento (optimización de la relación de carga de MPLA), los resultados mostraron que la cantidad de acumulación de hierro en cMoDC es mayor 48 h después del contacto (Fig. 20C) que a las 24 h (Fig. 20B). Con MPLA 0.1% y 0.2%, las células están completamente llenas de acúmulos azules muy grandes, a veces con expulsión extracitoplásmica de hierro. Después de la tinción de MGG las MoDCs son redondeadas, sin dendritas (Fig. 20D3-D4) se ven de color intenso y contienen numerosas vacuolas grandes (expresión de sufrimiento) con pérdida de la morfología típicas de las células dendríticas. Cuando se emplea MPLA 0.05% (Fig. 20C2) los acúmulos son

numerosos pero no llenan completamente las células y no son tan grandes, las dendritas son pequeñas pero aún son observables sus características morfológicas típicas, las células son ligeramente redondeadas pero no expresan un estado de sufrimiento marcado (Fig. 20D2). Menor concentración de MPLA (0.025%) da lugar a numerosos grupos azules pequeños e intermedios en el citoplasma de las células con dendritas largas y un aspecto morfológico normal (Fig. 20C1-D1), conservando la morfología típica de las células dendríticas. Estos resultados indican que la concentración de MPLA 0.025% es la más apropiada para el desarrollo de la nanovacuna.

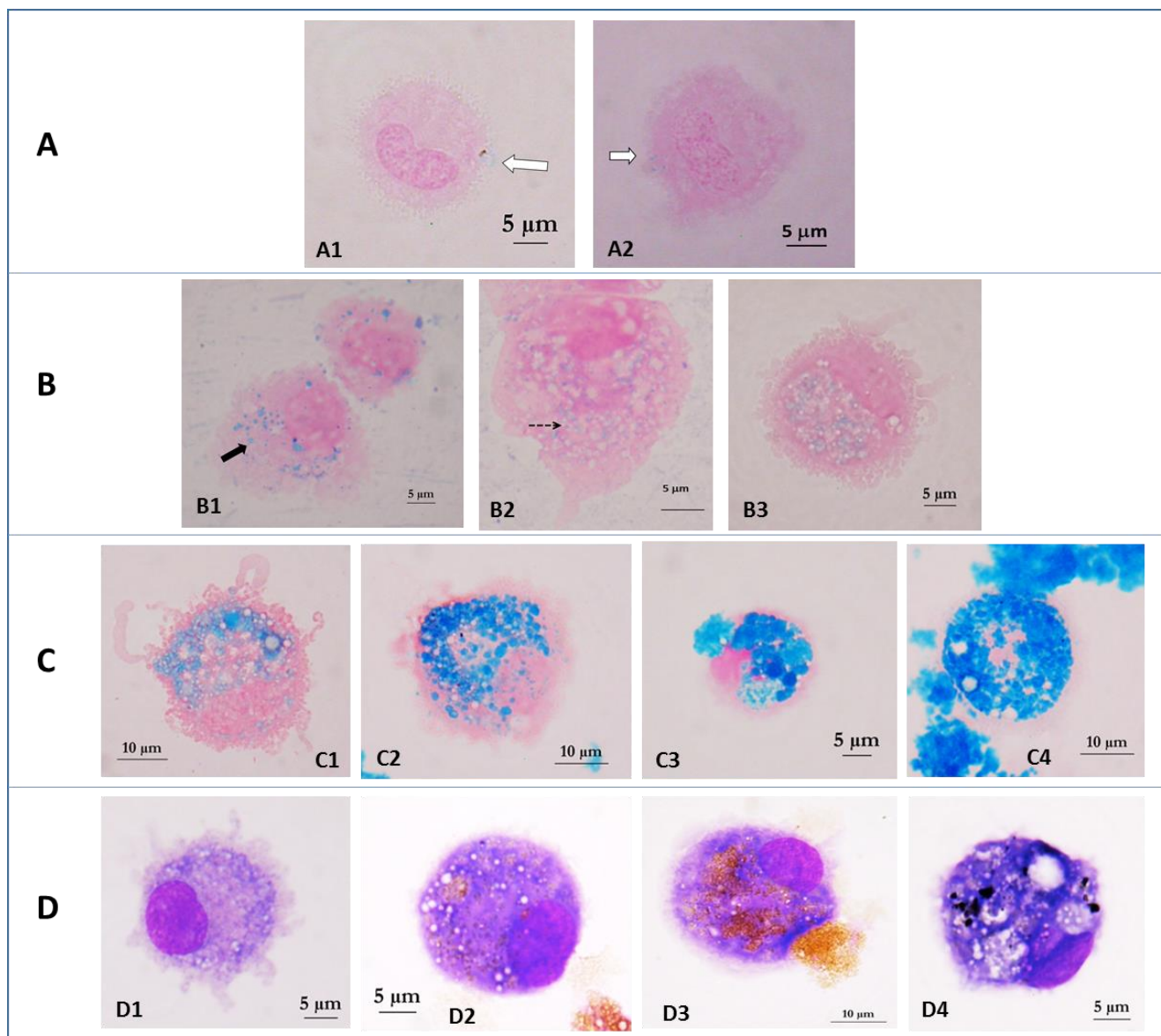


Figura 20: (A - C): cMoDCs con coloración de Perls. (D) cMoDCs teñidas con MGG. A) luego de 2 hs de incubación con: 25µg/ml de NPs-MPLA (A1) o NPs blanco (A2); B) luego de 24 hs de incubación con: NPs-blanco (B1), NPs-MPLA 0.1% (B2), o NPs-MPLA 0.025% (B3); C) luego de 48 hs de incubación con: NPs-MPLA 0.025% (C1,) NPs-MPLA 0.05% (C2), NPs-MPLA 0.1%(C3) NPs-MPLA 0.2% (C4); (D) Luego de 48hs de incubación con : NPs-MPLA 0.025% (D1), NPs-MPLA 0.05% (D2), NPs-MPLA 0.1% (D3), NPs-MPLA 0.2% (D4). $\Rightarrow$ Grano azul en contacto (0,2µm); $\rightarrow$ grano internalizado (0,2µm); $\Rightarrow$ acúmulos de 1-2 µm, $\rightarrow$ acúmulos de 0,4µm.

8.5) Evaluación de la activación de las cMoDCs purificadas por MACS.

8.5.1. Estudio de marcadores celulares de activación

El análisis citométrico mostró que la mayoría de las PBMC sanguíneas, (alrededor del 60-70%) de las células expresan espontáneamente CD14, CD80, MHC II y CD40 a un alto nivel, pero no expresan CD86 (Fig. 21A). Después de la selección, una gran mayoría de las células CD14+ (más del 90%) expresan esos marcadores con la misma intensidad. Sorprendentemente, alrededor del 30% de estas células también expresan CD86 (Fig. 20B), lo que sugiere que el proceso de selección positiva con la fijación del anticuerpo a anti-CD14 induce la activación celular. Este resultado se debe a que la proteína CD14 es, junto con TLR4, un receptor de LPS. Después de la diferenciación de cMoDCs (día 6), la expresión de CD14, CD80, MHC II y CD40 permanece positiva y alta para una gran mayoría de células (superior al 90%), mientras que la expresión de CD86 disminuye significativamente, lo que sugiere un retorno a estado estacionario o la muerte de células activadas con CD86 (Fig. 21C). Cuando las células se incubaron 24 h con LPS, la expresión de CD86 se detectó en aproximadamente el 75% de las células (Fig. 21E) mientras que en células no estimuladas (condición de PBS) un 8% de éstas expresaron CD86 (Fig. 21D). Además, la expresión de CD80, MHC II y CD40 fue muy similar en porcentaje de células positivas a las observadas con PBS, se detectó un aumento de IFC (intensidad de fluorescencia celular) para todos estos marcadores. De hecho, entre las 2 condiciones (PBS versus LPS), la IFC aumenta 1.2 veces para CD80, 1.8 veces para MHC II y 1.7 veces para CD40. Estos resultados sugieren fuertemente que el LPS induce la activación y maduración de las cMoDCs como presentadoras de antígenos, razón por la que

pueden usarse como control positivo. Además, la expresión CD86 es, en nuestro modelo, el marcador más confiable para mostrar evidencia de activación de cMoDCs.

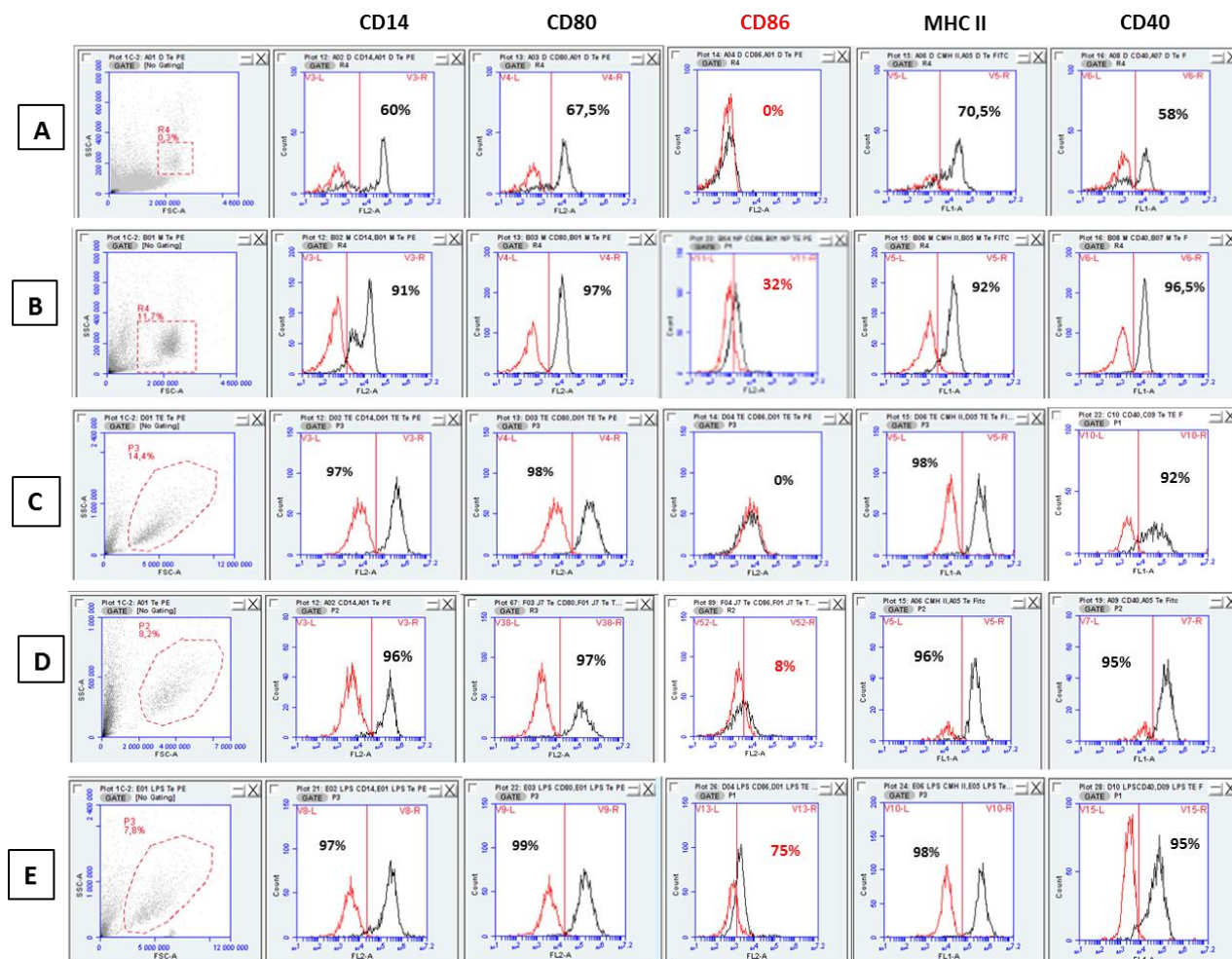


Figura 21. Activación de células dendríticas de cMoDCs . Perfiles de citometría de flujo de la expresión de CD14, CD80, CD86, MHC II y CD40 obtenidas de (A) PBMC, (B) células seleccionadas CD14+ al día 0, (C) cMoDCs al día 6 (D) cMoDCs 24 horas después de incubación con PBS (control negativo) o (E) LPS (control positivo).

8.5.2) Determinación del grado de activación de las cMoDCs por diferentes formulaciones

Se realizó el estudio inmunofenotípico de las cMoDCs seleccionadas con anti-CD14 luego de 24 horas de incubación con las formulaciones NP-EgTrp, NP-EgTrp-MPLA, NP-MPLA y NP-blanco.

Los análisis citométricos se muestran en la figura 22. La expresión de CD80 fue bastante similar tanto en porcentaje de células positivas como en intensidad de fluorescencia (IFC) después de la incubación con todas las formulaciones, y no fue significativamente diferente a la de las células no estimuladas (condición de PBS). De hecho, los porcentajes de células positivas fueron aproximadamente 92% para PBS, 93% para LPS y rango entre 93% y 97% para todas las formulaciones. El aumento del doble de IFC en comparación con PBS también fue muy similar y oscila entre 1.2 y 1.4 veces para todas las condiciones evaluadas, incluido el LPS.

En el caso de MHC II y CD40, 3 ensayos compartieron resultados muy similares y uno de ellos tuvo porcentajes de células positivas alrededor de 20% debajo de los demás. Sin embargo, el desafío con las diferentes formulaciones da resultados similares. Para MHC II, los porcentajes de células positivas fueron de aproximadamente 87% para PBS y oscilan entre 90 y 98% para todo el resto de las condiciones probadas. También se observó un pequeño aumento de la IFC en comparación con el control negativo (entre 1.1 y 1.5 veces).

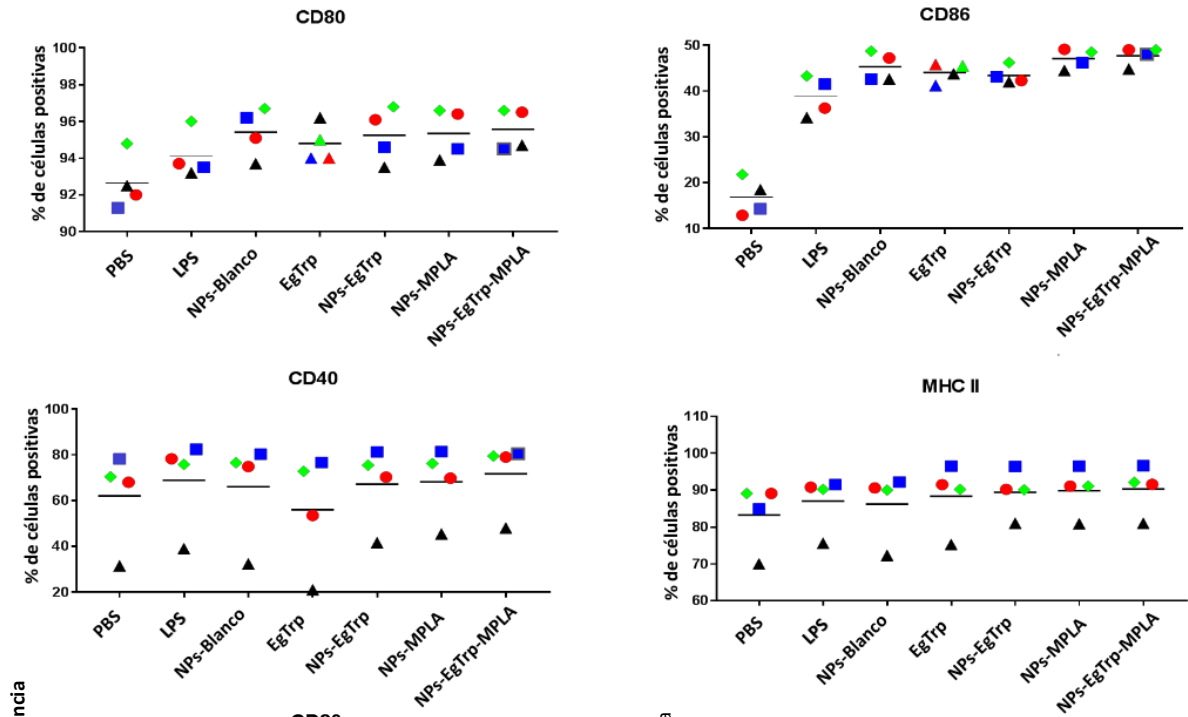
Se obtuvo una evolución similar con el marcador CD40. La única diferencia es una clara disminución de la expresión con la condición de rEgTrp solo en comparación con PBS y todas las demás condiciones tanto en términos de porcentajes de células positivas como de aumento de IFC. Para CD86, se observó un aumento significativo después de un desafío con todas las formulaciones en comparación con PBS. De hecho, el porcentaje de células positivas fue de aproximadamente el 15% con PBS y entre el 34% y el 52% para todas las condiciones analizadas, incluido el LPS. Con respecto a la IFC, se observó un aumento

entre 1.4 y 3 veces para todas las formulaciones en comparación con PBS.

Comparando todos los ensayos, NP-blanco y NP-EgTrp dieron resultados muy similares, mientras que la expresión de todos los marcadores de activación aumentó en presencia de MPLA. La formulación completa (NP-EgTrp-MPLA) proporciona el mejor resultado en comparación con todas las formulaciones probadas.

Se observó un aumento en la expresión de CD86 tanto en términos de porcentaje de células positivas como de IFC después de la incubación con LPS y NP-MPLA.

A



B

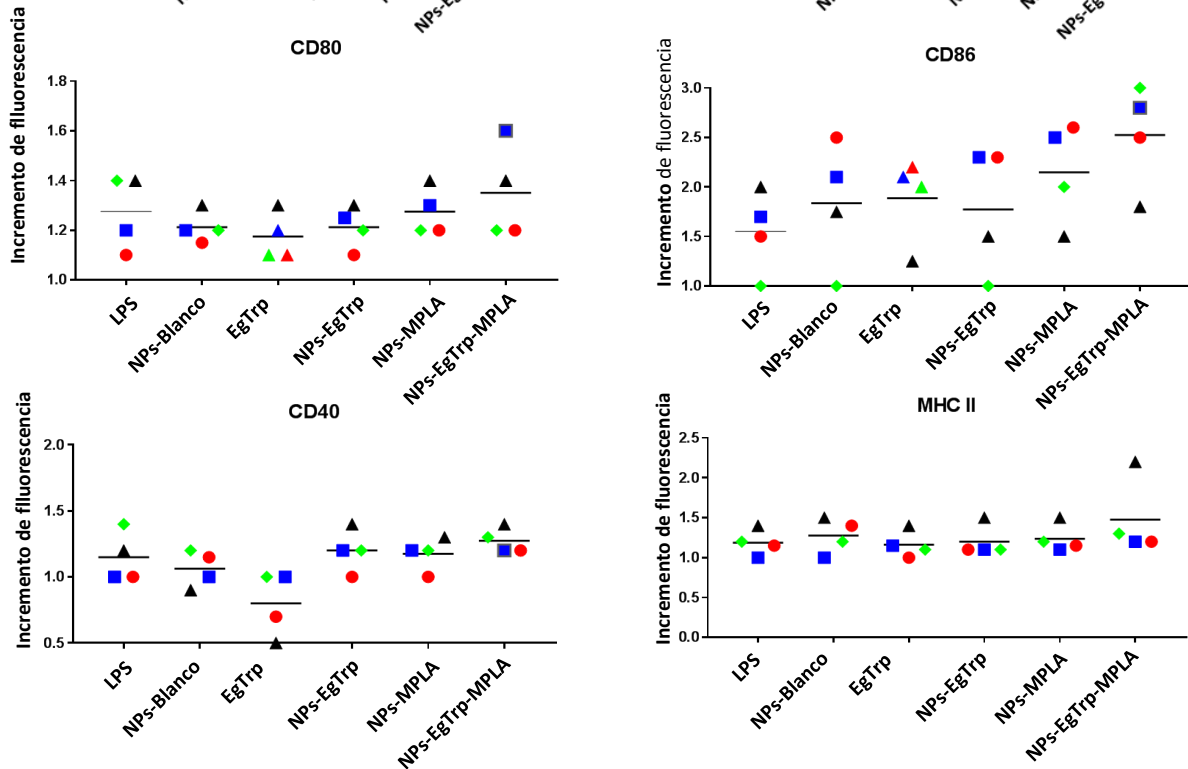


Figura 22. Activación de células MoDCs en presencia de las distintas formulaciones. A) Porcentajes de células positivas y **B)** incremento de intensidad de fluorescencia (IFC) comparado con PBS, para la expresión de CD80, CD86, MHC II and CD40. PBS como control negativo y LPS como control positivo. Se muestran cuatro ensayos.

8.6) Estudios clínicos de inmunogenicidad de las diferentes vacunas nanos formuladas.

En una primera etapa, para conocer el status parasitológico de los perros, se realizó un estudio de base antes de iniciar los experimentos, con bromhidrato de arecolina y al finalizar el experimento por medio de necropsia. Este estudio, con 4 perros por grupo, mostró que el parásito más frecuente encontrado fue *Toxocara canis*, seguido de *Mesocestoides sp* y *Uncinaria stenocephala*. El único grupo de animales que no tenían parásitos al momento del estudio fue el grupo control (NP-blanco) (ver tabla 6).

Formulaciones	Parásitos encontrados al inicio del experimento	Parásitos encontrados al final del experimento
NP-blanco	Ninguno	Ninguno
NP-EgTrp	<i>Toxocara canis</i> <i>Mesocestoides sp.</i>	<i>Uncinaria stenocephala</i>
NP-EgTrp-MPLA	<i>Toxocara canis</i>	<i>Toxocara canis</i>
NP-EgTrp-MPLA	<i>Toxocara canis</i>	Ninguno

Tabla 6. Parásitos encontrados en los perros al comienzo y final del experimento

Posteriormente, se determinaron los niveles de anticuerpos generados contra EgTrp en, saliva, heces y suero. En la figura 23 se muestran los precedimientos seguidos para la extracción de las muestras.



Figura 23. Procedimientos de extracción de saliva y muestra de los animales. A-B) nanovacuna en forma de cápsula de color amarillo que con NPs liofilizadas en su interior; C-D) planilla y tubos para la extracción de sangre y extracción de saliva

Los animales dosificados con NP-blanco en el tiempo 0 dieron una respuesta positiva a IgA en suero, indicando que en los animales hay IgA sistémica contra la EgTrp. Sin embargo, se observa un aumento de IgA en heces producida por la NP-EgTrp a lo largo del experimento (Fig. 24A). Con respecto a los niveles de IgE en sangre (Fig. 24D) no se observa un aumento claro de los anticuerpos específicos contra EgTrp desde que los niveles de anticuerpos de los animales controles negativos aumentaron.

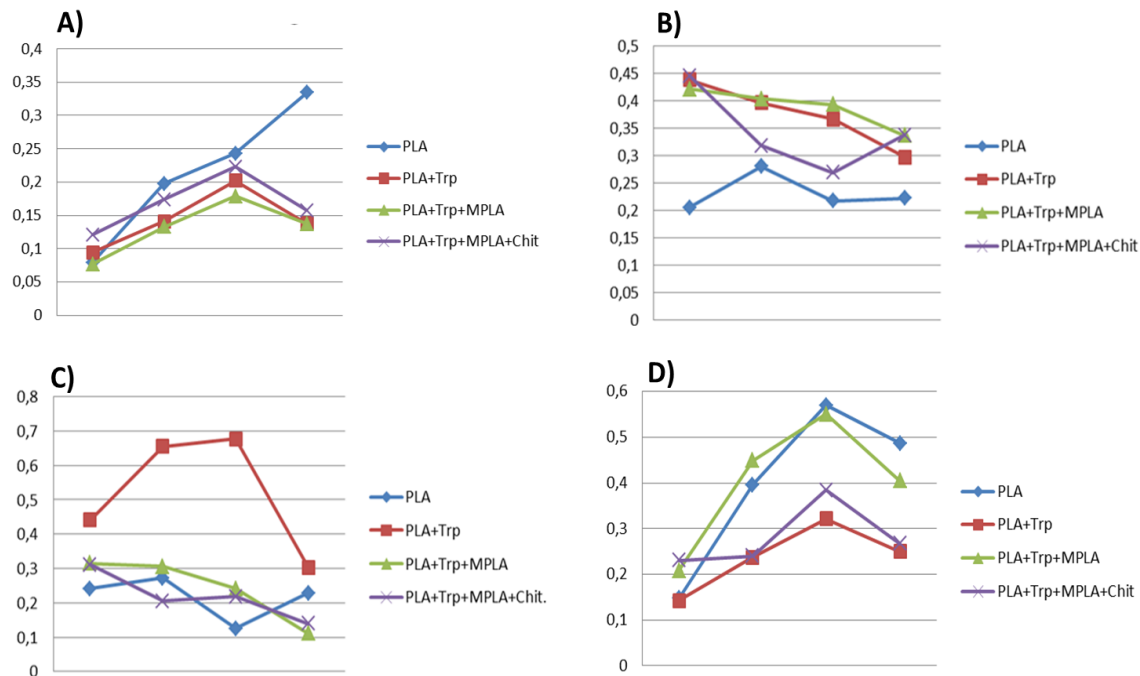


Figura 24. Estudios de inmunogenicidad en perros vacunados con NPs. A) IgA en suero; B) IgA en saliva; C) IgA en heces; D) IgE en suero. En ordenadas: tiempos 0, 7, 14, 21 luego de la vacunación con las NPs; en abcisas: niveles de anticuerpos.

Cuando analizamos los niveles de IgG1 e IgG2 observamos un predominio en la concentración del sub-isotipo IgG2 sobre el IgG1 (Fig. 25). Sin embargo llama la atención que el control negativo de NPs sin antígeno produzca un incremento de los niveles de anticuerpos.

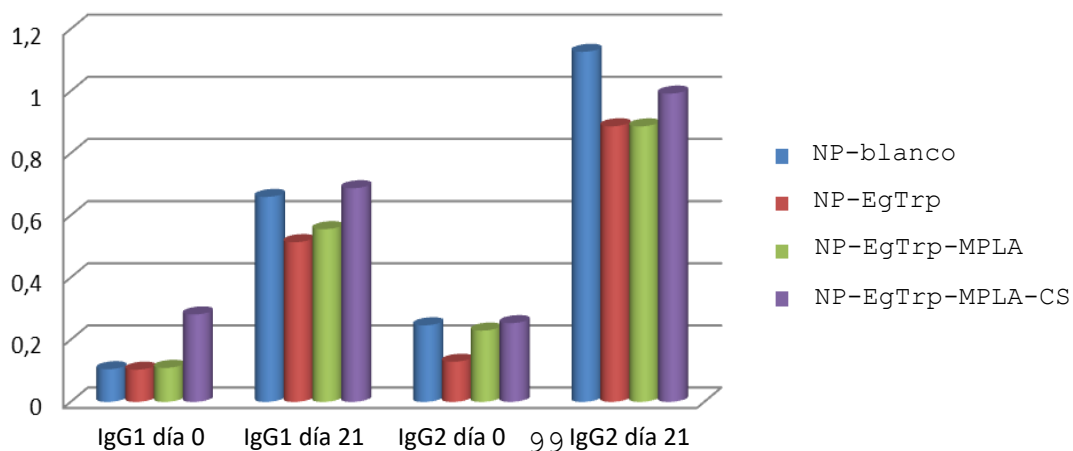


Figura 25: Niveles de anticuerpos IgG1 e IgG2 al día 0 y 21 del experimento.

En suma, el análisis de los niveles de los diferentes isotipos de anticuerpos mostraron un incremento que no es uniformes en los diferentes isotipos siendo claro el aumento de IgA en heces producida por las nanopartículas NP-EgTrp, y en saliva con NP-EgTrp-MPLA

Es interesante y promisorio el aumento observado de los niveles de IgA en heces y saliva de los animales vacunados.

8.7) Estudio clínico piloto de vacunación y desafío.

Este ensayo piloto de vacunación y desafío con 4 perros, mostró una reducción del número de tenias de *E. granulosus* en los animales vacunados comparados con el control (figura 26). El porcentaje de reducción del número de parásitos en los animales vacunados comparados con el control fue de 94.5% (tabla 7). Estos resultados son prometedores debido a que el número de tenias establecidas en el intestino de los animales vacunados fue de un 5% indicando que la vacuna tiene un efecto importante en la reducción de la infestación con *E. granulosus* (Fig. 27).

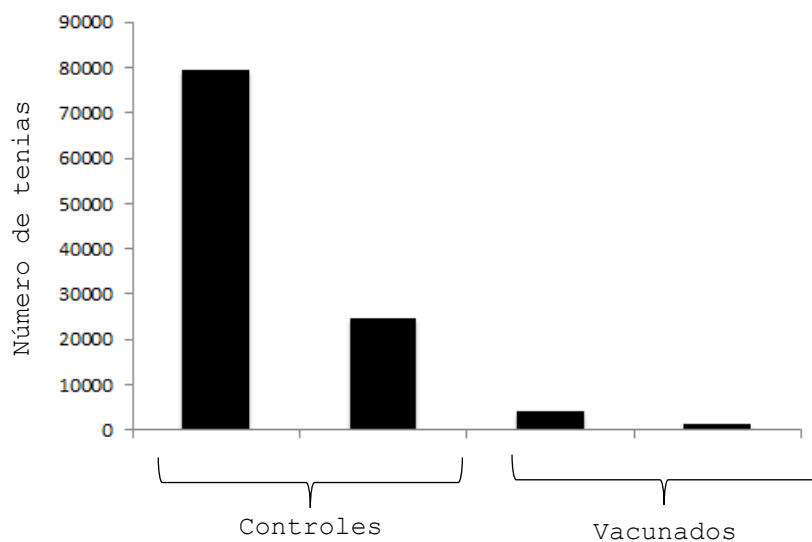


Figura 26. Ensayo de vacunación en perros. Número de tenias de *E. granulosus* obtenidas por autopsia de animales vacunados con NP-EgTrp

Animales	Número de animales	Número de tenias	Tenias en el intestino (%)	Tenia expulsadas (%)
Control	2	104130	100	0
Vacunados	2	5740	5.5	94,5

Tabla 7. Ensayo de vacunación en perros. Porcentaje de expulsión de *E. granulosus* en animales vacunados

Los intestinos de los perros vacunados mostraron una hemorragia intensa en la parte anterior del duodeno y las placas de Peyer hipertrofiadas sugiriendo una estimulación de la inmunidad comparada con el control no vacunado, no observándose la presencia de parásitos macroscopicamente (Fig. 27). En los intestinos de los perros no vacunados, se observa

una leve inflamación y alto número de tenias fijadas a la mucosa en la primera porción del intestino delgado.

A



B



Figura 27. Observación macroscópica de los intestinos.
A) perros no vacunados; B) perros vacunados.

DISCUSIÓN

1) FORMULACIÓN Y CARACTERIZACIÓN

Los sistemas de "delivery" aplicados a las vacunas via oral de mucosas están dirigidos a proteger los antígenos durante el pasaje gastrointestinal conservando la integridad e inmunogenicidad de los antígenos. El uso de adyuvantes que permiten el direccionamiento a células específicas del sistema inmune tales como las células dendríticas, también mejora la respuesta inmunológica específica. En la pasada década, el uso de nanopartículas como sistema de "delivery" de vacunas se ha incrementado exponencialmente (Mora Huertas *et al.*, 2010; Zhao *et al.*, 2014).

El objetivo principal de este trabajo fue el desarrollo de una nanovacuna oral contra el platelminto parásito *E. granulosus* para proteger a los cánidos de la Echinococcosis y a los humanos de la Hidatidosis.

En una primera etapa, desarrollamos un sistema de "delivery" de antígenos usando NPs de polímeros biodegradables con el objetivo principal de proteger a los antígenos durante el pasaje por el tracto gastrointestinal y activar el sistema inmune de la mucosa intestinal. Los antígenos seleccionados fueron dos proteínas musculares recombinantes de *E. granulosus*, EgTrp y EgA31, debido a que en un trabajo piloto previo, usando ambas proteínas y *Salmonella enterica* serovar typhimurium como sistema de "delivery" se obtuvieron niveles de protección por encima del 80% en perros desafiados con protoescolices (Petavy *et al.*, 2008).

En este contexto, al considerar el desarrollo de un nuevo sistema de "delivery" para una vacuna oral, decidimos desarrollar una nueva vacuna encapsulando los antígenos mencionados en nanopartículas poliméricas (nanovacuna).

Para el desarrollo de esta nanovacuna usando nanopartículas, nos propusimos formular NPs seguras, biodegradables y fácilmente administrables a los perros, con condiciones de tamaño y carga iónica que brindaran una buena interacción con el mucus intestinal y las células dendríticas, que protegieran al antígeno manteniendo su inmunogenicidad y que fueran capaces de activar las células dendríticas para desarrollar una buena respuesta adaptativa protectora.

Las nanovacunas en base a nanopartículas prometen ser muy útiles ya que tienen fuertes ventajas como la protección del antígeno durante el pasaje gastrointestinal, el "delivery" del antígeno y la estimulación del sistema inmune, todas ventajas ampliamente reportadas en la bibliografía (Mora-Huertas *et al.*, 2010; Fichter *et al.* 2015; Kaur *et al.*, 2017). Un índice de su valor es el gran aumento en las publicaciones científicas referentes a la utilización de nanopartículas en el desarrollo de vacunas demostrando el interés de esta tecnología (Zhao *et al.*, 2014).

El tamaño y la carga de la superficie de las NP es un parámetro importante a considerar en el diseño de estos sistemas. El tamaño de las NPs tienen un impacto directo sobre el desarrollo de respuesta inmune (Stano *et al.*, 2012).

En este contexto, hemos desarrollado NPs con un tamaño entre 200 y 300 nm teniendo en cuenta que las células M internalizan bien partículas de menos de 1 μ m como fue demostrado para la captura de NPs-PLGA por las placas de Peyer

murinas (Shakweh *et al.*, 2005). Por otro lado, NPs con un tamaño de alrededor de 200 nm indujeron una buena respuesta de células CD4+ en modelos murinos y desarrollaron una buena respuesta a nivel de mucosa nasal y pulmonar, mientras NPs más grandes y más chicas no lo hicieron (Stano *et al.*, 2012). Hasta el momento no se han reportado estudios de interacción de NPs biodegradables con el sistema inmune de mucosas en caninos.

Para el desarrollo de las NPs utilizamos el ácido poliláctico (D-L) (PLA), aprobado por la FDA para su uso en nanopartículas biodegradables (Zhao *et al.*, 2014). Este polímero fue previamente empleado en nanopartículas mostrando interesantes propiedades fisicoquímicas para interactuar con células presentadoras de antígenos (Tyler *et al.*, 2016).

Por otro lado, incorporamos el MPLA como adyuvante y activador de células dendríticas, un potente ligando del receptor tipo Toll 4 (TLR-4) presente en estas células (Steinhagen *et al.*, 2010, Venezia *et al.*, 2017). Esta molécula ha sido aprobada por la FDA (USA) para ser usada en las vacunas comerciales contra el virus HBV de la hepatitis B (Fendrix) y HPV del papiloma humano (Cervarix, de Glaxo Smith Kline y Vervarix de Merck) (Tritto *et al.*, 2009; Mbow *et al.*, 2010; O'Hagan *et al.*, 2010). El MPLA se obtiene del LPS de las membranas de bacterias Gram -, pero es mil veces menos tóxico que el LPS natural (Johnson *et al.*, 2009). Datos recientes indican que la adición de un agonista de TLR4, el MPLA, adsorbido en alumbre, aumentó considerablemente la respuesta inmune de una vacuna contra el HPV (Gianinni *et al.*, 2006). En la formulación de las NPs, nosotros utilizamos el MPLA sin sales de aluminio. Las sales de aluminio son adyuvantes con potente estimulación de la respuesta humoral del tipo Th2

mediante la inducción de producción de IL4 y el bloqueo de la respuesta celular Th1 mediante secreción de IL10 (Tritama *et al.*, 2018; Oleszycka *et al.*, 2018)

Teniendo en cuenta que la respuesta inmune protectora contra parásitos lumbinales está asociada a respuestas Th2 de anticuerpos, con predominio de IgE sería interesante agregarle sales de aluminio a las NPs en futuras investigaciones.

La eficacia del MPLA cuando es incluido en un sistema de nanopartículas poliméricas ha sido demostrada en modelos *in vitro* e *in vivo*, particularmente en vacunación oral de mucosas (Sarti *et al.*, 2011; Elamanchili *et al.*, 2007) [23,24]. Además, los efectos del MPLA asociado a NPs en la activación de macrófagos caninos han sido descriptos (Guldner *et al.*, 2016).

Hemos demostrado en este trabajo que el MPLA en una concentración de 0.025% no daña a los macrófagos murinos ni a las células dendríticas derivadas de monocitos caninos (cMoDCs). La inclusión del MPLA en las NPs, no alteró ni el porcentaje de encapsulación de los antígenos, ni la integridad e inmunogenicidad de los mismos. Tampoco se observó que hubiera cambios en el tamaño y potencial Zeta de las NPs comparado con las NPs sin MPLA. Finalmente nuestros resultados demuestran que el MPLA no interfiere con los métodos de conservación desarrollados.

Un factor fundamental en el desarrollo de este tipo de vacunas es asegurar la entrega eficiente del antígeno a las células inmunes de la mucosa del duodeno y yeyuno del perro en los que el pH es mayor a 5.5 independientemente de la dieta ingerida (Grayzel y Miller, 1928; HogenEsch, Felsburg 1992). El sistema de "delivery" de antígenos debería ser sensible al

pH intestinal de manera tal de que la cápsula que recubre las NPs las libere en la primera porción del duodeno, para ser internalizadas por las células M de la mucosa intestinal y luego por las células dendríticas (des Rieux *et al.*, 2009). Nuestros resultados demostraron que el recubrimiento de las NPs formuladas y recubiertas con EUDRAGIT- L100 luego de sometidas a un pH de 6.8 no alteró el tamaño de las NPs ni la integridad de los antígenos con un alto porcentaje de conservación de los antígenos encapsulados.

La eficacia en la conservación de los antígenos con las NPs-PLA, que hemos obtenido, frente a las condiciones "in vitro" del aparato gastrointestinal, está en concordancia con la protección obtenida para la insulina usando como polímero PLGA, sistema que mostró más del 60% de conservación de la insulina luego de aplicar condiciones de incubación similares a las que empleamos en este trabajo (Jain *et al.*, 2012).

El epitelio intestinal es una barrera importante en el pasaje de las NPs a la lámina propia y al tejido linfoide de las mucosas (Devriendt *et al.*, 2012). Este hecho, además del tránsito gastrointestinal, produciría una disminución importante en la eficacia de las vacunas de mucosas. Dado que el mucus intestinal tiene carga global negativa, para aumentar la mucoadhesividad de nuestro sistema de NPs, funcionalizamos las NPs con CS, cargando las NPs positivamente para aumentar la adhesividad a la mucosa intestinal, no solo a las células M, sino a todo el epitelio intestinal (Barbate *et al.*, 2013; Devriendt *et al.*, 2012). El CS es un polisacárido catiónico natural que se obtiene por medio de la desacetilación de la quitina, y ha sido ampliamente estudiado para ser aplicado en vacunas de mucosas (Xia *et al.*, 2015). Se ha reportado que el CS no sólo aumenta la adhesión de NPs al

epitelio intestinal, sino que también favorece la apertura de las "tight junctions" de la barrera epitelial intestinal permitiendo el transporte paracelular lo que aumenta la entrega del antígeno a la células dendríticas (Primard *et al.*, 2010; Sonaje *et al.*, 2012). En el presente trabajo, el recubrimiento con CS fue optimizado para obtener NPs con carga positiva asegurando las interacciones electrostáticas de las NP-CS con el mucus, favoreciendo la mucoadhesividad en el duodeno. Esta porción del intestino del perro es la que recibe la carga parasitaria total del quiste ingerido por el perro. Es por ello que la estimulación de la inmunidad contra este parásito en el intestino delgado es una buena estrategia para desarrollar una vacuna eficiente contra *E. granulosus*. La caracterización de las NP luego del recubrimiento con CS mediante el sistema de análisis empleado (Zetasizer) confirmó que las NPs presentaban una carga positiva indicando la incorporación de las CS a las NPs formuladas. Estos resultados son comparables a los obtenidos por otros autores (Gupta *et al.*, 2011; Li *et al.*, 2012; Barhate *et al.*, 2013), pero siguiendo otra metodología desarrollada en ésta tesis. Siguiendo la metodología empleada por éstos autores, obtuvimos una pérdida de más de un 90% en la eficiencia de encapsulación comparada con la formulación sin CS (resultados no mostrados) por lo que buscamos de un método alternativo descripto en materiales y métodos. Mientras los arriba mencionados autores incorporaban el CS durante la formulación, disolviéndolo en la solución de PVA nosotros incorporamos el CS luego de obtenida la NPs. Las pruebas "in vitro" realizadas en éste trabajo a diferentes pH nos mostraron que el comportamiento del CS fue similar.

El tamaño de las NPs luego de agregar el CS aumentó superando los 300 nm con un potencial Zeta positivo mayor a 30

mv y una superficie uniforme. Estos resultados están en concordancia con Li y col. (2012) que habiendo incluido CS a nanopartículas formuladas con PLA por otra metodología obtuvieron NPs con un potencial Zeta de 36 a 43 Mv y un tamaño de 133 nm a 352 nm, pero con una superficie de NPs menos uniforme y más rugosa. Nuestros resultados además, están en concordancia con las observaciones obtenidas usando NPs-PLGA recubiertas con CS para el delivery intranasal de la toxina del tétanos en dónde la incorporación de CS no alteró la eficiencia de encapsulación, la integridad ni la inmunogenicidad del antígeno (Vila et al., 2002; Ghalavand et al., 2018). Nuestros experimentos al igual que los desarrollados por Ghalavand y col. (2018) mostraron que el CS no altera la E/E, integridad, ni la inmunogenicidad del antígeno. Por otro lado se ha reportado el uso de CS como adyuvante para vacunación subcutánea en ovejas contra *E. granulosus* usando el antígeno EG95 (Umair et al., 2017). Los resultados obtenidos por estos investigadores mostraron que en la inoculación subcutánea el CS tenía un efecto adyuvante importante potenciando la respuesta inmune dependiente de anticuerpos. Hasta el momento no se han reportado vacunas orales para ser usadas en caninos usando CS en su composición. Estos resultados apoyan que la incorporación de CS a las NPs es una estrategia muy prometedora para el desarrollo de vacunas orales.

El empleo de cultivos de macrófagos murinos J774 y células dendríticas de perro derivadas de monocitos sanguíneos, nos permitió estudiar el efecto del MPLA y el CS sobre la internalización de las NPs. Ninguno de los dos adyuvantes tienen un efecto citopático ni en macrófagos ni en las cMoCDs, si bien el CS altera levemente la internalización de las NPs

en las células dendríticas de perros. A pesar de este último resultado, aún consideramos que la funcionalización con CS es una buena estrategia ya que su empleo favorece de todos modos la adherencia al mucus intestinal. De acuerdo a nuestros experimentos el CS no se elimina totalmente debido a las condiciones de pH intestinal asegurando la interacción NPs mucus intestinal.

La potenciación de la respuesta inmune de mucosa usando CS ha sido previamente demostrado en la generación NPs-PLGA-Hepatitis B para administración intranasal (Pawar *et al.*, 2013) y en vacunas experimentales usando antígenos de la membrana B de *Brachyspira hyodysenteriae* encapsulados en micropartículas de PLGA (Jian *et al.*, 2014) las cuales desarrollaron altos niveles séricos de IgG y IgA.

Para asegurar la estabilidad de la nanovacuna durante su almacenamiento las NPs fueron liofilizadas con el agregado de un protector e incluidas en cápsulas para facilitar la administración oral a los perros. Para producir las cápsulas, se utilizó el recubrimiento con Eudragit® L100-55. Este es un material soluble a un pH por encima de 5.5 pero resistente al pH gástrico como ha sido mostrado en nuestros ensayos *in vitro* y en concordancia con otros investigadores (Khan *et al.*, 1999; Xu *et al.*, 2018). Una aproximación similar se ha empleado para una vacuna oral experimental usando un antígeno recombinante de *Helicobacter pylori*. NPs-PGLA recubiertas con Hidroxipropil metilcelulosa ftalato, un polímero biodegradable sensible al pH, fueron empleadas para inmunizar ratones en forma oral con muy buenos resultados (Tan *et al.*, 2017). El uso de Eudragit® L100-55 para recubrir nanopartículas de CS fue utilizado para desarrollar un sistema que realizara el "delivery" de antígenos a nivel de placas de Peyer (Xu *et al.*, 2018). Estos autores

prepararon partículas de un tamaño de 558.2 ± 35.6 nm, con una eficiencia de encapsulación del $90.38\% \pm 9.12$, buena estabilidad y gran resistencia a la degradación enzimática y ácida, produciendo altos niveles de IgG e IgA en un modelo *in vivo* usando ratas.

En esta primera etapa de nuestros experimentos diseñamos NPs de tamaño y carga adecuada, que presentaron gran eficiencia de encapsulación, conservaron la integridad e inmunogenicidad de los antígenos EgTrp y EgA31, así como una adecuada funcionalización con MPLA y CS que no altera las características mencionadas de las NPs y los antígenos. Demostramos también que el CS le confiera una carga positiva a las NPs y sobre todo que los antígenos están protegidos de las condiciones del estómago e intestino del perro. La caracterización de las NPs formuladas nos permitió demostrar que el sistema es adecuado para encapsular, conservar y proteger los antígenos.

Una vez formuladas las NPs iniciamos estudios de internalización e inmunogenicidad *in vitro* (activación de CDs) en cultivos de células dendríticas, y estudios de inmunogenicidad y eficacia *in vivo* en ensayos clínicos en perros.

2) INTERNALIZACIÓN Y ACTIVACIÓN DE cMoDCs

Para desarrollar una respuesta inmune a nivel de mucosas mediante una vacuna suministrada vía oral debemos evitar el desarrollo de tolerancia inmunológica (Holmen y Cerkinsky, 2005). Uno de los mecanismos del desarrollo de tolerancia es la generación de células T reguladoras ($CD4^+CD25^+$) que suprimen las respuestas inmune protectoras (Wu et al., 2003) La

activación y la expansión clonal de estas células T reguladoras depende de las células dendríticas. Para evitar el desarrollo de células T reguladoras que inhiban las respuestas inmunes protectoras como las inducidas por las vacunas, es necesario activar células dendríticas e incrementar la buena presentación de antígenos (Feller et al 2013).

En el desarrollo de estos sistemas, una buena comprensión de la interacción de las células dendríticas con las NPs es esencial en el desarrollo eficaz de nanovacunas (Zhao et al., 2010). A modo de ejemplo, se ha descrito que las características físicas de las NPs influyen sobre la captura por las células dendríticas y macrófagos activados y en la presentación de antígenos a las células T, por las vías de clase I (MHC I) o de clase II (MHC II) dependientes (Reddy et al., 2006).

Varios estudios han sido llevados a cabo *in vitro* para caracterizar la interacción de diferentes tipos de NPs con células dendríticas de ratón o humanas (Redy et al., 2006; Zhao et al., 2014). En contraste, pocos estudios se han realizado sobre células caninas, siendo mayoritarios aquellos que emplearon macrófagos (Derman et al., 2015; Guldner et al., 2016). Según la bibliografía disponible es la primera vez que se demuestra la interacción de las células dendríticas caninas con NPs - PLA biodegradables y que se observa claramente la capacidad de activación de las CDs o inmunogénicidad *in vitro* de las NPs+PLA+MPLA.

Las DCs de perro al igual que las DCs humanas y de ratones pueden ser generadas *in vitro* a partir de monocitos sanguíneos (PBMC) luego de estimularlos con IL-4 y GM-CSF recombinantes. Para ello, los monocitos sanguíneos son aislados por centrifugación en gradiente de densidad, y purificados por su

habilidad de adherirse a los frascos plásticos de cultivo o por el uso de partículas magnéticas unidas a anticuerpos específicos para moléculas presentes en la superficie de los monocitos, usando el sistema MACS (magnetic microbead technology) (Qeska et al., 2013). Estos dos métodos han sido empleados en este trabajo para generar células dendríticas derivadas de monocitos de perro (cMoCDs). En ambos protocolos, a los 6 días de cultivo, las cMoDCs inmaduras mostraron prolongaciones celulares típicas de las CDs y un gran núcleo lobulado. Con respecto al inmunofenotipo, con los dos protocolos usados, las células obtenidas expresaron fuertemente CD14. Por otro lado, las células obtenidas por el método MACS (anti-CD14) mostraron una alta expresión de CD80 y CD40 y MHCII al final de la etapa de diferenciación.

Nuestros resultados son consistentes con lo mostrado por otros autores en la literatura disponible. Se ha descrito que, en contraste con las cMoDCs humanas o de ratón, las células dendríticas de perro inmaduras mantienen la habilidad de expresar CD14 luego de la diferenciación (Bonnetfont-Rebeix et al., 2006; Gutzwiller et al., 2010; Qeska et al., 2013), mientras que las células maduras, luego de estimuladas con GM-CSF e IL-4 expresan altos niveles de CD40, MCH II y CD80 (Ibisch et al., 2005; Gutzwiller et al., 2010).

Durante la etapa de selección de monocitos, observamos sorprendentemente que la selección por CD14 empleando la tecnología MACS, indujo la expresión de CD86 en las células positivas al día 0. Esta observación sugiere que el uso del anticuerpo primario anti-CD14 para marcar a los monocitos sanguíneos indujo una activación basal de los monocitos aislados evidenciado por la expresión de las moléculas co-estimuladoras CD80 los cuales son marcadores de activación.

La activación de las células dendríticas responde a la interacción de sus receptores de superficie (TLRs) con sus ligandos y se caracteriza por la expresión de las moléculas co-estimuladoras CD80, CD86, CD40 y del complejo mayor de histocompatibilidad de tipo II (MHC-II) (Tizard, 2009). Nuestros resultados se explican desde que CD14 es un co-receptor para LPS junto a TLR4. Durante el proceso de diferenciación, esta expresión decrece hasta alcanzar un nivel basal al día 6, momento en el cual se estimulan las cMoDCs por medio de LPS o NPs.

Durante mucho tiempo se ha reportado que caracterizar específicamente la activación las células dendríticas caninas ha sido difícil. Varios autores reportaron que CD86 se expresa durante la diferenciación y que es un marcador confiable de la activación de las cMoDCs (Bonnetfont-Rebeix *et al.*, 2006; Gutzwiller *et al.*, 2010; Qeska *et al.*, 2013).

Nuestros resultados indican que luego de las 24 h de incubación con el ligando del receptor TLR-4, LPS, se observa la expresión de CD86 en las cMoDCs y un aumento en la expresión de CD80, MCH II y CD40, de acuerdo con los resultados previos descritos en CDs humanas, de ratón y caninas (Qeska *et al.*, 2013). De esta manera decidimos usar en nuestros experimentos LPS como control positivo de activación y CD86 como marcador de activación de CDs.

Para estudiar el efecto del MPLA en la internalización del de las células cMoDCs, marcamos las NPs con óxido de hierro. Los resultados obtenidos mostraron que las NPs son eficientemente internalizadas por las células caninas. El hierro se detectó en las células luego de las 2 h de contacto como pequeños gránulos 0,2 μ m en la superficie de las células; la internalización se hizo evidente y masiva después de las 24

h de contacto y continuó hasta las 48 h. Luego de 24 h de contacto se observan acúmulos azules de hierro, grandes y pequeños, siendo mayor el número de células con acúmulos grandes cuando son incubadas con NPs-blanco y mayor el número de células con acúmulos pequeños en las incubadas con NP-MPLA. Estas diferencias sugieren que el MPLA induce una vía diferente de degradación. Por otro lado, la presencia de gránulos de mayor tamaño que aquellos observados a las 2 horas sugiere que las NPs probablemente fueron degradadas quedando el hierro secuestrado en las vesículas fagolisosómicas en dónde deberían degradarse las NPs.

Las partículas exógenas, moléculas o patógenos son adquiridos por las células por diferentes vías de endocitosis ya sea pinocitosis o fagocitosis. Las vías pinocíticas incluyen endocitosis mediada por caveolina (partículas entre 50-80 nm), mediada por clatrina (partículas menores a 150 nm), y macropinocitosis (0,5 a 5 micras). Las partículas mayores a 500 nm son también internalizadas por fagocitosis (Khalil et al.2006). Las células presentadoras de antígenos internalizan partículas de alrededor de 200 nanómetros vía pinocitosis, mientras que aquellas de 1 μ m son capturadas vía macropinocitosis o fagocitosis (Zhao et al., 2014; Derman et al., 2015).

Las NPs desarrolladas en este trabajo tienen un tamaño de alrededor de 300 nm por lo que esperaríamos que el mecanismo de internalización sería de pinocitosis. Las NPs con un tamaño entre 20 y 200 nm son preferentemente internalizadas por las DCs mediante mecanismos de pinocitosis, mientras que los macrófagos emplean mecanismos de macropinocitosis y fagocitosis para la captura de partículas más grandes, entre 05 y 5 micras (Xiang et al., 2006).

En el modelo celular A549, NPs-PLA son internalizadas por la vía de pinocitosis mediada por clatrina (Macedo da Luz, 2017). Por otro lado Blander y Medzhitov (2004) demostraron que la activación y regulación de la fagocitosis es dependiente de múltiples pasos que incluyen internalización y maduración del fagolisosoma. Los mismos autores observaron dos modos de maduración del fagosolisosoma, constitutivo e inducible. Su principal diferencia dependía de la capacidad de la carga para activar la señalización via TLR. Nuestros resultados indican que el MPLA estaría activando los mecanismos de pinocitosis evidenciado por la acumulación de hierro en partículas pequeñas. Las nanopartículas desarrolladas presentan un tamaño adecuado para la internalización por las cMoDCs. Foged y col. (2005) mostraron en DC humanas, empleando partículas fluorescentes, que el tamaño óptimo de partículas para una rápida y eficiente adquisición era menor a 500nm y que la internalización ocurría en una forma concentración-tiempo dependiente. Estos resultados fueron confirmados por Elamanchili y col. (2004) en macrófagos de ratón se internalizaban a las 2 h de contacto y a las 24 h se acumulaban en los lisosomas. Resultados similares se obtuvieron con macrófagos caninos y nanopartículas de PLGA (Derman et al., 2005). Estos autores demostraron que péptidos cargados en NP-PLGA eran fagocitados por macrófagos caninos duplicando la producción de óxido nítrico (NO) en contraste con el péptido libre, sugiriendo que el sistema NPs producía una activación de los mismos. Guldner y col. (2016) observaron que PLGA/OVA-FITC se localizaba dentro del citoplasma de la mayoría de los macrófagos caninos 2 h después del contacto *in vitro*, y que la internalización continuaba hasta las 24hs. Estudios *in vivo*, mostraron que en ratones NPs-PLGA de alrededor 300 nm generaban una mejor maduración de las DC y una respuesta antigénica más

eficiente que las NPs-PLGA de un tamaño de alrededor de 1µm (Joshi *et al.*, 2013; Xiang *et al.*, 2016).

El tamaño de las NPs que hemos desarrollado, de alrededor de 300nm, permitió una eficiente internalización por las células dendríticas de perros, lo cual ha sido demostrado por primera vez en el mundo.

El adjuvante es un factor que afecta la internalización y activación de las células presentadoras de antígenos (Oh *et al.*, 2014; Gutjahr *et al.*, 2016). Las NPs desarrolladas con el agregado de MPLA, produjeron una buena activación de las células dendríticas comparadas con las NPs sin MPLA. Estos resultados están de acuerdo con lo encontrado por otros autores (Elamanchili *et al.*, 2004). Estos autores observaron en un modelo murino que los marcadores de activación tenían mayor expresión cuando las NPs contenían MPLA. En el mismo modelo, Margaroni y col. confirmaron el efecto adjuvante del MPLA en la co-encapsulación de NPs-PLGA con MPLA (Margaroni *et al.*, 2016). La formulación completa empleada por ellos indujo una expresión más significativa de CD40, CD80, CD86 y MHC clase II en DCs de ratones, y una más eficiente producción de IL-12 y IL-10 que las NPs-PLGA sin MPLA. Además, esas DC promovieron la activación de células T y el desarrollo de una respuesta efectora (Margaroni *et al.*, 2016). Weilhammer y colaboradores observaron que la conjugación de MPLA a nanoliproteína (NPL) aumentaba significativamente la expresión de moléculas co-estimuladoras, en células dendríticas y la producción de citoquinas (IL-6, TNF- α , MIP-1 α y RANTES) comparada con la inyección de NLP sola (Weilhammer *et al.*, 2013). Sarti *et al.*, mostraron que la formulación completa PLGA-MPLA-OVA inducía una respuesta IgG mayor que la OVA en PBS o PLGA-OVA sin MPLA. Más aún títulos significativamente altos de IgA se

generaban con la formulación completa, proporcionando la capacidad de inducir inmunidad de mucosas (Sarti *et al.*, 2011).

Para optimizar la cantidad de MPLA a emplear en nuestros estudios y evitar el efecto tóxico del mismo, ensayamos 4 concentraciones (0.2%, 0.1%, 0.05% y 0.025%). Cuando se incubaron durante 48 horas las cMoDCs con concentraciones de MPLA de 0.1% y 0.2%, se observó que las células estaban completamente llenas de óxido de hierro, a veces con gran exocitosis de hierro extra citoplasmático, sugiriendo sufrimiento o alteración celular. Las NPs que contenían 0.025% fueron bien internalizadas y no tuvieron impacto en la viabilidad de las células. Luego de 48 horas de incubación, las células tenían un aspecto morfológico compatible con células dendríticas saludables, sin alteraciones citoplasmáticas observables al microscopio que nos indicaran sufrimiento o daño celular, por lo cual seleccionamos esta concentración de 0.025% para seguir nuestros estudios. La ausencia de efectos tóxicos en las células con concentraciones de MPLA empleadas (250 ng/ml para NPs y entre 62 ng/ml y 500 ng/ml en el medio de cultivo coincide con la literatura (Nkabinde *et al.*, 2014; Macedo Da Luz *et al.*, 2017). Más aún, Ismaili y col. (2002) no encontraron efectos tóxicos en células dendríticas derivadas de monocitos humanos así como de células T de sangre periférica aún a 100 µg/ml de MPLA. Por otro lado, estudios realizados con células A549 mostraron que las concentraciones de NPs-PLA entre 2 y 200 µg/mL o concentraciones de NPs-PLGA entre 0.01 y 4 mg/mL no tenían efecto sobre la viabilidad (Grabowski *et al.*, 2013; Macedo Da Luz *et al.*, 2017). Esta ausencia de toxicidad de NPs-PLGA fue confirmada por Nkabinde *et al* usando células Caco-2 y Hela

aún con concentraciones altas (5.8 mg/ml) (Nkabinde *et al.*, 2014).

La formulación de NPs desarrolladas es la más adecuada para la internalización y activación de las CDs. Es así que estudiamos también el efecto de las distintas formulaciones en la activación de las cMoDCs obtenidas por el sistema MACS evaluando la expresión de los marcadores CD40, CD80, CD86 y el complejo MHCII. Analizamos por citometría de flujo la expresión de estas moléculas luego de 24 horas de incubación con las formulaciones NPs-blanco, NPs-MPLA, NPs-EgTrp, la formulación completa NPs-EgTrp-MPLA, el antígeno recombinante EgTrp y LPS como control positivo de activación celular. Nuestros resultados mostraron que la expresión de todos los marcadores excepto CD86, estaba aumentada en las células inmaduras antes del contacto. En el caso de CD86, se detectó una expresión alta después de la incubación con el control positivo LPS y con las formulaciones analizadas. En particular, el porcentaje de células positivas frente a NP-MLA y NPs-EgTrp-MPLA fue levemente superior al control positivo. Asimismo, el incremento de fluorescencia de las células positivas fue notorio en presencia de la formulación completa sugiriendo una buena activación de las células. Por otro lado, el antígeno recombinante cuando fue aplicado solo no indujo la activación de CD86, sugiriendo que el antígeno recombinante EgTrp no es un buen activador de cMoDCs lo que hace evidente la necesidad del uso del sistema de "delivery" desarrollado, para ser suministrado como vacuna oral.

También en nuestros ensayos quedó demostrado que las NPs-blanco tienen un efecto adyuvante, lo que reafirma nuestra convicción de usar el polímero PLA para la formulación de las NPs.

En nuestro modelo de DC "in vitro" determinamos que las NPs desarrolladas tenían capacidad para activar células dendríticas y que potencialmente podrían ser usadas en el desarrollo de vacunas en general y de vacunas contra el cestode *Echinococcus granulosus* en particular. A pesar de que la vacunación oral tiene numerosas ventajas, la degradación de los antígenos vacunales, su baja captura por el tejido linfoide del tracto gastrointestinal y el desarrollo de tolerancia vía células dendríticas pueden ser una problema importante a resolver en esta nueva generación de vacunas (Mata-Haro *et al.*, 2007; Sarti *et al.*, 2011; Fichter *et al.* 2015). Hemos desarrollado nanopátulas que protegen a los antígenos y que tienen la capacidad de llegar al sistema inmune de la mucosa intestinal y activar el sistema inmune. Por eso en los próximos experimentos realizaremos estudios de inmungenicidad y de protección in vivo, en ensayos clínicos en perros.

3) ESTUDIOS CLÍNICOS DE INMUNOGENICIDAD Y PROTECCIÓN

Los primeros estudios clínicos realizados en el marco de este trabajo, fueron estudios de inmunogenicidad de las diferentes formulaciones. Se vacunaron perros Beagle con una dosis de NPs vía oral sin desafiarlos con *E. granulosus*. Pretendimos, de esta forma, obtener información acerca de la capacidad de las NPs desarrolladas para activar el sistema inmune sistémico y de mucosas. Antes de realizar las vacunaciones se realizaron estudios parasitológicos a los animales. De acuerdo a los mismos se observó la presencia de parásitos antes y al final del experimento, (ver resultados). Considerando que en el día 0 observamos anticuerpos anti-tropomiosina al igual que en el día 21, creemos que los resultados positivos encontrados, incluso en algunos controles

negativos, son debidos a la estimulación del sistema inmune por estos parásitos, teniendo en cuenta que todos los helmintos tienen en su soma parasitario proteínas musculares. Estas proteínas están asociadas al desarrollo de alergias, y por lo tanto son capaces de activar el sistema inmune adaptativo y desarrollar memoria inmunológica, (Sereda et al., 2008; Tyagi et al., 2015; Navarrete-Perea et. al., 2017; Carballo y Coronado, 2018; Vogt et. al., 2018). Probablemente esto explique porqué los animales del grupo control presentaron niveles de anticuerpos anti-tropomiosina detectables. La tropomiosina es una proteína muy conservada y está presente en helmintos parásitos como por ejemplo en *M. corti*, en *Ascaris sp.*, *O. volvulus*, *S. mansoni*, *T. canis* *T. colubriformis*, *H. contortus* y *O. Ostertagi*, y *T. spiralis* (Sereda et al., 2008; Koziol et al., 2011; Zhu et al., 2014).

Según nuestra experiencia profesional, en estudios epidemiológicos y experimentales con perros, sabemos que es difícil mantener a los animales libres de parásitos sobre todo libre de *T. canis*. La alta resistencia a los parasiticidas y algunos químicos que se utilizan para la limpieza de los boxes donde se encuentran los animales, es determinante (Moreno et al 2004). Como consecuencia los huevos permanecen viables y los perros se pueden re-infectar. Datos epidemiológicos avalan esta afirmación (Cabrera et. al; 1995-1996; Felsmann M.2017). Esto nos creó un importante problema experimental a la hora de evaluar la respuesta porque la ingestión de huevos larvados *T. canis*, permanecen en los animales como larvas hipobióticas (estado de resistencia) (Nijse et. al; 2016) y desarrollan altos niveles de anticuerpos específicos (Zwickl et al; 2018). Estos autores encontraron altos niveles de IgE e IgG específica contra antígeno somático de larvas III de *T. canis*

dentro de las cuales las proteínas musculares paramiosina y tropomiosina son las predominantes. En nuestros experimentos observamos una respuesta de IgG así como IgE en sangre. Como se observó IgE en los animales que fueron vacunados con las NPs sin antígeno, no podemos afirmar que la respuesta sea debida a la vacuna. Estos datos nos indican que los antígenos musculares activan células B para producir IgE y linfocitos T y por lo tanto inducen memoria en el sistema inmune, lo cual es el objetivo de las vacunaciones (Guo et al., 2016). Estos resultados indican que las proteínas que empleamos para nuestros experimentos son apropiadas para ser utilizadas en vacunas desde el momento que activan el sistema inmune adaptativo (linfocitos B y T) y por lo tanto desarrollan memoria inmunológica, con inmunidad de larga duración. En general, las fuertes respuestas de Th2/IgE durante las infecciones por helmintos están asociadas con síntomas alérgicos, que probablemente (pero no exclusivamente) dependan de la inmunomodulación inducida por parásitos (Carballo y Coronado, 2018), como *Ascaris sp*, *Estrongilus sp*, *Anisakis y echinococcus sp*. Además, hay evidencia de que las helmintiasis (por ejemplo, ascariasis) pueden aumentar los síntomas en pacientes alérgicos. La tropomiosina de *A. lumbricoides* (Asc 1 3) tiene una fuerte actividad alérgica asociado al asma en humanos con reactividad cruzada con las tropomiosinas de los ácaros del polvo doméstico (HDM) (Carballo y Coronado, 2018). Esto sugiere que en nuestros experimentos la presencia de otros parásitos pudiera también desarrollar una reactividad cruzada de anticuerpos con las proteínas musculares de *E. granulosus* encapsuladas en las NPs.

Son pocos los trabajos publicados en dónde se utiliza vacunación vía oral con diferentes sistemas de “delivery” de

antígenos, contra el cestode *E. grannulosus*. El grupo de P. Desplazes, inmunizó perros por vía oral con esporas de *Bacillus subtilis* formadoras de biofilms expresando en su superficie rEgTrp y rEgA31 (Vogt *et al.*, 2018). Los animales vacunados desarrollaron una respuesta específica de anticuerpos del isotipo IgG pero no IgA, sugiriendo que no hubo estimulación del sistema inmune de mucosas. En nuestros experimentos usando los mismos antígenos recombinantes obtuvimos una buena respuesta de IgA en saliva y en heces sugiriendo que hubo activación del sistema inmune de mucosas. Creemos que esta diferencia entre los experimentos de Vogt y col. y nuestros experimentos se debe quizás, a que al encapsular los antígenos en las NPs, estos quedan protegidos del ambiente enzimático intestinal y además tiene la capacidad de activar el sistema inmune de mucosas. Nosotros observamos un incremento de IgA en las heces pero no en los sueros sugiriendo una estimulación de la inmunidad de mucosa pero sin aparente activación de la inmunidad sistémica por las NPs-EgTrp.

La respuesta inmune Th2 se ha descrito como el principal mecanismo de expulsión de parásitos de la luz intestinal, mediante el desarrollo de una reacción de hipersensibilidad de tipo I mediada por IgE (reacción alérgica) (Harrison *et al.*, 1998; Clife *et al.*, 2005; Artis, 2006; Anthony *et al.*, 2007; Webb *et al.*, 2007; Hübner *et al.*, 2010). Al igual que Kouguchi y colaboradores, no encontramos un incremento de IgE asociado a la vacunación con nanopartículas. Este hecho reafirma la ausencia esperada de una respuesta inmune sistémica.

En el análisis de la respuesta de los isotipos de IgG (IgG1/IgG2) a nivel sistémico se observó un claro predominio del isotipo IgG2 típico de las respuestas Th1 a diferencia de la respuesta de IgA a nivel de mucosas que es claramente Th2.

Nuestro experimento de inmunización, y de acuerdo al isotipo de inmunoglobulina detectada por ELISA contra el antígeno rEgTrp, sugiere que tenemos una respuesta sistémica del tipo Th1 y una respuesta de mucosas del tipo Th2, básicamente podríamos decir que tenemos una respuesta mixta Th1/Th2.

Son necesarios más experimentos para poder asegurar categóricamente que nuestro sistema de NPs biodegradables inducen una respuesta mixta Th1/Th2. Deberíamos realizar estudios de citoquinas expresadas por linfocitos obtenidos de animales vacunados y no vacunados para determinar el tipo de respuesta T generada como fue estudiado por Rossi y col. (2012). Estos autores demostraron que una infestación con protoescolices de *E. granulosus* desarrolla una clara polarización de tipo Th2 a nivel de las mucosas. Esta polarización probablemente activa mecanismos que desarrollan una primera expulsión de parásitos que evitarían el desarrollo de una infección crónica. Posteriormente los mismos autores demostraron que frente a varias infecciones y reinfecciones el animal se hace resistente a la reinfección por *E. granulosus* y en ese momento la polarización Th2 cambia y se transforma en mixta Th1/Th2.

En otros experimentos de inmunización oral Petavy y col. (2008) vacunaron perros con una cepa mutante de *Salmonella* atenuada como vector para que produjera las mismas proteínas empleadas en esta tesis y en los ensayos con biofilms ya mencionados. La diferencia entre estos tres experimentos es el sistema de "delivery". El sistema utilizado por Petavy y col. desarrolla un granuloma rico en células mononucleares desde donde las salmonellas producen los antígenos, en un microambiente de citoquinas del tipo Th1; una respuesta no asociada a los mecanismos de expulsión de parásitos

intestinales. Los autores observaron un aumento de plasmocitos con presencia de IgA en el tejido linfoide intestinal, pero no describen la presencia de anticuerpos IgA específicos en las heces o saliva. A su vez no encontraron niveles aumentados de IgG, IgA e IgE en el suero, comparados con los controles negativos lo que sugiere que no hubo respuesta sistémica. Nosotros observamos un aumento de IgA en saliva y en heces, sugiriendo una respuesta específica de mucosas y sistémica de anticuerpos específicos a predominio de IgG2. Aunque Petavy y col. observaron un aumento de células T y B a nivel del tejido linfoide intestinal indicativo de activación de respuesta inmune adaptativa a nivel de las mucosas, no necesariamente tiene que ser específica para EgTrp o EgA31. Si bien se observó inflamación a nivel intestinal en los perros vacunados, ésta pudo ser una respuesta hacia la Salmonella. Estos resultados demuestran claramente que la eficacia o capacidad protectora de las vacunas de mucosas tampoco depende únicamente de los niveles de anticuerpos.

El grupo de Kouguchi y col. (2013) realizó experimentos de inmunización con antígenos de *E. multilocularis* vía nasal (4 dosis) con un total de 500 µg total del antígeno SRf1 por animal, y 3 dosis vía oral por animal, usando una capsula entérica con 15 mg de antígeno mezclado 100 mg de la subunidad B de la toxina del cólera por animal. Estos autores evaluaron la respuesta sistémica de anticuerpos y no observaron aumento de anticuerpos durante el proceso de inmunización, pero sí observaron un aumento de IgG e IgA en suero luego del desafío de los animales con las tenias. A pesar de la vacunación con grandes dosis de antígenos empleados por éstos investigadores por vía oral no pudieron observar aumento de IgA en saliva o en heces y tampoco de IgE en suero, a diferencia de nuestros

experimentos en donde pudimos detectar IgA en saliva y heces, e IgE en suero. Estos autores no demostraron que su vacuna estimulara la inmunidad de mucosas, pero obtuvieron un buen porcentaje de protección (87,6%). El antígeno por ellos empleado, es también una proteína localizada nivel de las ventosas, el rostello de las tenias *Echinococcus multilocularis*, al igual que las proteínas musculares EgTrp y EgA31 de *Echinococcus granulosus*. Esto sugiere que los antígenos ubicados en esos lugares del parásito son buenos para inducir inmunidad protectora y potencial desarrollo de vacunas contra éstos y otros cestodes.

Por otro lado ensayos de vacunación usando tropomiosina de la filaria *Acanthocheilonea viteae*, helminto que produce infección tesidual, asociados a adyuvantes que desarrollan respuesta Th1, e inducen protección (Hartman et al., 2006), mientras que el uso de adyuvante de aluminio que desarrolla respuestas tipo Th2 y anticuerpos protectores no desarrollaron protección. Estos estudios demuestran que la tropomiosina en condiciones especiales puede desarrollar una respuesta no alergénica e inducir protección contra parásitos tesiduales. Esta proteína muscular muestra una gran versatilidad en el desarrollo de inmunidad protectora lo que la hace un buen candidato para el desarrollo de vacunas contra parásitos tanto tesiduales como lumbinales.

En nuestro estudio piloto de vacunación y desafío, observamos una reducción del número de parásitos comparados con el control. Consideramos éste, un resultado muy prometedor, aunque es necesario utilizar un mayor número de animales para asegurar su efecto protector. Otros estudios de vacunación usando antígenos musculares y tegumentarios mostraron niveles de protección entre un 70 y 80% para *E. granulosus* y de 86.7%

para *E. multilocularis*, respectivamente (Petavy et. al., 2008 Kouguchi et al 2013).

La observación macroscópica de los intestinos de los animales vacunados muestran un proceso inflamatorio intenso, coincidiendo con lo observado en los ensayos de vacunación oral, empleando *Salmonella* como sistema de "delivery", Petavy et al (2008). En los experimentos mostrados en éste trabajo usando nanopartículas se observó una estimulación de la inmunidad de mucosa debido a la detección de IgA específica, no comprobándose en los trabajos mencionados de Petavy et al (2008) y Kouguchi et al (2013. Si no tenemos IgA en realidad no podemos asegurar que la respuesta es una respuesta de mucosas y mediada por células T, podemos estar frente a una estimulación inespecífica de la respuesta inmune y no una respuesta específica mediada por epitopes B y T como son las respuestas que debieran generar las vacunas.

Los antígenos musculares tropomiosina y paramiosina son compartidos por varias especies de helmintos parásitos. Estos parecerían buenos inmunógenos y eventualmente podrán desarrollar una buena respuesta inmune contra helmintos del perro e incluso aquello de potencial zoonótico. En éste sentido el desarrollo de una vacuna utilizando antígenos compartidos y conservados nos permitiría desarrollar una vacuna universal contra varios helmintos intestinales del perro de interés médico y veterinario. Eso nos indica la importancia de seguir trabajando en ésta dirección.

Finalmente creo firmemente que nuestros resultados indican que las NPs desarrolladas son capaces de inducir una respuesta de anticuerpos a nivel de mucosas y sistémica, y reducir el establecimiento de las tenias en el intestino del hospedero definitivo. Será necesario pasar al siguiente nivel

de experimentación empleando un mayor número de animales, para comprobar estos resultados primarios sumamente alentadores.

CONCLUSIONES

- 1) Desarrollamos un sistema de transporte de antígenos usando nanopartículas para el desarrollo de una vacuna oral contra el cestode *Echinococcus granulosus* para ser aplicada en perros.
- 2) Encapsulamos la tropomiosina (EgTrp) y la paramiosina (EgA31) recombinantes de *E. granulosus* en nanopartículas biodegradables con una alta eficiencia de encapsulación, y conservación de la capacidad inmunogénica e integridad de los antígenos.
- 3) Las nanopartículas desarrolladas protegen a los antígenos recombinantes rEgTrp y rEgA31 de las condiciones gástricas e intestinales.
- 4) Desarrollamos un método de conservación con NPs liofilizada e incluida en capsulas de protección gástrica e intestinal para resistir las condiciones adversas del aparato gastrointestinal. Esta formulación de conservación permite guardar la vacuna a temperatura ambiente sin alterar los antígenos durante mucho tiempo.
- 5) Bifuncionalizamos las NPs agregándole CS y MPLA sin alterar la integridad y la capacidad inmunogénica de los antígenos rEgTrp y rEgA31.
- 6) El agregado de las moléculas CS y MPLA a la formulación de las nanopartículas permitirá a las NPs adherirse a toda la superficie intestinal y aumentar la capacidad de las mismas para llegar al tejido linfoide de la mucosa.

- 7) Por primera vez se demostró como las NPs usando el polímero biodegradable Acido Poli-Lactico (PLA) con el agregado del adyuvante MPLA en su formulación pueden activar células dendríticas de perros y aumentar moléculas co-estimuladoras imprescindibles para activar linfocitos T.
- 8) Los ensayos clínicos de inmunogenicidad de la nanovacuna oral indicaron que la nanovacuna era capaz de estimular la inmunidad de mucosa debido al aumento de IgA observado en saliva y heces y una respuesta mixta Th1/Th2 sistémica de acuerdo a la relación de isotipos de IgG2 e IgG1.
- 9) Un estudio piloto de eficacia mostró un 94.5 % de de expulsión de tenias y esa expulsión está asociada a un fuerte proceso inflamatorio observado a nivel intestinal.
- 10) En ésta Tesis por primera vez se desarrolló una nanovacuna contra parásitos para ser administrada por vía oral en perros.

BIBLIOGRAFAÍA

Alvarez Rojas CA, Gauci CG, Lightowlers MW. Antigenic differences between the EG95-related proteins from *Echinococcus granulosus* G1 and G6 genotypes: implications for vaccination. *Parasite Immunol.* 2013;35:99-102.

Alvarez Rojas CA, Romig T, Lightowlers MW. *Echinococcus granulosus* sensu lato genotypes infecting humans--review of current knowledge. *Int J Parasitol.* 2014;44(1):9-18.

Anthony RM, Rutitzky LI, Urban JF Jr, Stadecker MJ, Gause WC. Protective immune mechanisms in helminth infection. *Nat Rev Immunol.* 2007;7(12):975-87

Al-Khalidi NW, Barriga OO. Cell-mediated immunity in the prepatent primary infection of dogs with *Echinococcus granulosus*. *Vet Immunol Immunopathol.* 1986;1 1(1):73-82.

Anderson, James M. Shive, Matthew S. Most cited papers in the history of advanced drug delivery reviews: a tribute to the 25th anniversary of the journal, *Advanced Drug Delivery Reviews.* 2012;64 Supplement: 72-82.

Andronicos NM, McNally J, Kotze AC, Hunt PW, Ingham A. *Trichostrongylus colubriformis* larvae induce necrosis and release of IL33 from intestinal epithelial cells in vitro: implications for gastrointestinal nematode vaccine design. *Int J Parasitol.* 2012;42(3):295-304.

Ansari MA, Zubair S, Mahmood A, Gupta P, Khan AA, Gupta UD, Arora A, Owais M. RD antigen based nanovaccine imparts long term protection by inducing memory response against experimental murine tuberculosis. *PLoS One.* 2011;6(8).

Anthony RM, Rutitzky LI, Urban JF Jr, Stadecker MJ, Gause WC. Protective immune mechanisms in helminth infection. *Nat Rev Immunol*. 2007;7(12):975-87.

Artis D. New weapons in the war on worms: identification of putative mechanisms of immune-mediated expulsion of gastrointestinal nematodes. *Int J Parasitol*. 2006;36(6):723-33.

Athanasίου E, Agallou M, Tastsoglou S, Kammona O, Hatzigeorgiou A, Kiparissides C, Karagouni E. A Poly (Lactic-co-Glycolic) Acid Nanovaccine Based on Chimeric Peptides from Different *Leishmania infantum* Proteins Induces Dendritic Cells Maturation and Promotes Peptide-Specific IFN γ -Producing CD8 (+) T Cells essential for the protection against Experimental Visceral Leishmaniasis. *Front Immunol*. 2017;8:684.

Balic A, Bowles VM, Meeusen EN. Mechanisms of immunity to *Haemonchus contortus* infection in sheep. *Parasite Immunol*. 2002;24(1):39-46.

Bancroft AJ, Artis D, Donaldson DD, Sypek JP, Grencis RK. Gastrointestinal nematode expulsion in IL-4 knockout mice is IL-13 dependent. *Eur J Immunol*. 2000;30(7):2083-91.

Barhate G, Gautam M, Gairola S, Jadhav S, Pokharkar V. Quillaja saponaria extract as mucosal adjuvant with chitosan functionalized gold nanoparticles for mucosal vaccine delivery: stability and immunoefficiency studies. *Int J Pharm*. 2013;30;441(1-2):636-42.

Barriga OO, Al-Khalidi NW. Humoral immunity in the prepatent primary infection of dogs with *Echinococcus granulosus*. *Vet Immunol Immunopathol*. 1986;11(4):375-89.

Battelli G, Mantovani A, Seimenis A. Cystic echinococcosis and the Mediterranean Region: a long-lasting association. *Parassitologia*. 2002;44(1-2):43-57.

Bendixsen T, Emery DL, Jones WO. The sensitization of mucosal mast cells during infections with *Trichostrongylus colubriformis* or *Haemonchus contortus* in sheep. *Int J Parasitol*. 1995;25(6):741-8.

Bernasconi V, Norling K, Bally M, Höök F, Lycke NY. Mucosal Vaccine Development Based on Liposome Technology. *J Immunol Res*. 2016;5482087.

Bilati U, Allémann E, Doelker E. Poly (D, L-lactide-co-glycolide) protein-loaded nanoparticles prepared by the double emulsion method-processing and formulation issues for enhanced entrapment efficiency. *J Microencapsul*. 2005;22(2):205-14

Blander JM, Medzhitov R, Regulation of phagosome maturation by signals from toll-like receptors, 2004;*Science* 304 (5673):1014-1018.

Bonnefont-Rebeix C, de Carvalho CM, Bernaud J, Chabanne L, Marchal T, Rigal D. CD86 molecule is a specific marker for canine monocyte-derived dendritic cells. *Vet Immunol Immunopathol*. 2006;109(1-2):167-76.

Boufana B, Lett W, Lahmar S, Griffiths A, Jenkins DJ, Buishi I, Engliez SA, Alrefadi MA, Eljaki AA, Elmestiri FM, Reyes MM, Pointing S, Al-Hindi A, Torgerson PR, Okamoto M, Craig PS. Canine echinococcosis: genetic diversity of *Echinococcus granulosus sensu stricto* (s.s.) from definitive hosts. *J Helminthol*. 2015;89(6):689-98.

Bramhall M, Zaph C. Mastering gut permeability: New roles for old friends. *Eur J Immunol.* 2017;47(2):236-239.

Breloer M, Abraham D. Strongyloides infection in rodents: immune response and immune regulation. *Parasitology.* 2017;144(3):295-315.

Breyer I, Georgieva D, Kurdova R, Gottstein B. *Echinococcus granulosus* strain typing in Bulgaria: the G1 genotype is predominant in intermediate and definitive wild hosts. *Parasitol Res.* 2004;93(2):127-30.

Budke CM, Jiamin Q, Qian W, Torgerson PR. Economic effects of echinococcosis in a disease-endemic region of the Tibetan Plateau. *Am J Trop Med Hyg.* 2005;73(1):2-10.

Bund D, Buhmann R, Gökmen F, Kremser A, Dreyssig J, Kolb HJ, Schmetzer HM. Canine-DCs using different serum-free methods as an approach to provide an animal-model for immuno therapeutic strategies. *Cell Immunol.* 2010;263(1):88-98.

Cabrera PA, Haran G, Benavidez U, Valledor S, Perera G, Lloyd S, Gemmell MA, Baraibar M, Morana A, Maissonave J, et al. Transmission dynamics of *Echinococcus granulosus*, *Taenia hydatigena* and *Taenia ovis* in sheep in Uruguay. *Int J Parasitol.* 1995;25(7):807-13.

Cabrera PA, Parietti S, Haran G, Benavidez U, Lloyd S, Perera G, Valledor S, Gemmell MA, Botto T. Rates of reinfection with *Echinococcus granulosus*, *Taenia hydatigena*, *taenia ovis* and other cestodes in a rural dog population in Uruguay. *Int J Parasitol.* 1996;26(1):79-83.

Cabrera PA, Lloyd S, Haran G, Pineyro L, Parietti S, Gemmell MA, Correa O, Moraña A, Valledor S. Control of *Echinococcus granulosus* in Uruguay: evaluation of different treatment intervals for dogs. Vet Parasitol. 2002;103(4):333-40.

Cabrera PA, Irabedra P, Orlando D, Rista L, Harán G, Viñals G, Blanco MT, Alvarez M, Elola S, Morosoli D, Moraña A, Bondad M, Sambrán Y, Heinzen T, Chans L, Piñeyro L, Pérez D, Pereyra I. National prevalence of larval echinococcosis in sheep in slaughtering plants *Ovis aries* as an indicator in control programmes in Uruguay. Acta Trop. 2003;85(2):281-5.

Calderon-Gonzalez R, Marradi M, Garcia I, Petrovsky N, Alvarez-Dominguez C. Novel nanoparticle vaccines for Listeriosis. Hum Vaccin Immunother. 2015;11(10):2501-3.

Carol H, Nieto A, Villacres-Eriksson M, Morein B. Intranasal immunization of mice with *Echinococcus granulosus* surface antigens iscoms evokes a strong immune response, biased towards glucidic epitopes. Parasite Immunol. 1997;19(5):197-205.

Carol H, Nieto A. A mucosal IgA response, but no systemic antibody response, is evoked by intranasal immunisation of dogs with *Echinococcus granulosus* surface antigens iscoms. Vet Immunol Immunopathol. 1998;65(1):29-41.

Cancela M, Carmona C, Rossi S, Frangione B, Goñi F, Berasain P. Purification, characterization, and immunolocalization of paramyosin from the adult stage of *Fasciola hepatica*. Parasitol Res. 2004;92(6):441-8.

Carrillo-Conde B, Song EH, Chavez-Santoscoy A, Phanse Y, Ramer-Tait AE, Pohl NL, Wannemuehler MJ, Bellaire BH, Narasimhan B. Mannose-functionalized "pathogen-like" polyanhydride nanoparticles target C-type lectin receptors on dendritic cells. *Mol Pharm*. 2011;8(5):1877-86.

Chabalgoity JA, Harrison JA, Esteves A, Demarco de Hormaeche R, Ehrlich R, Khan CM, Hormaeche CE. Expression and immunogenicity of an *Echinococcus granulosus* fatty acid-binding protein in live attenuated *Salmonella* vaccine strains. *Infect Immun*. 1997;65(6):2402-12.

Chavez-Santoscoy AV, Roychoudhury R, Pohl NL, Wannemuehler, Narasimhan B, Ramer-Tait AE. Tailoring the immune response by targeting C-type lectin receptors on alveolar macrophages using "pathogen-like" amphiphilic polyanhydride nanoparticles. *Biomaterials* 2012;33(18):4762-72.

Chen JX, Liu SX, Cao JP, Song GC, Xu YX. [Anti-schistosomiasis effect induced by full length DNA vaccine coding paramyosin of *Schistosoma japonicum* in C57BL/6 mice]. *Zhongguo Ji Sheng Chong Xue Yu Ji Sheng Chong Bing Za Zhi*. 2006;24(2):81-5

Chow C, Gauci CG, Vural G, Jenkins DJ, Heath DD, Rosenzvit MC, Harandi MF, Lightowers MW. *Echinococcus granulosus*: variability of the host-protective EG95 vaccine antigen in G6 and G7 genotypic variants. *Exp Parasitol*. 2008;119(4):499-505.

Cliffe LJ, Humphreys NE, Lane TE, Potten CS, Booth C, Grencis RK. Accelerated intestinal epithelial cell turnover: a new mechanism of parasite expulsion. *Science*. 2005;308(5727):1463-5.

Cortés A, Muñoz-Antoli C, Esteban JG, Toledo R. Th2 and Th1 Responses: Clear and hidden Sides of immunity against intestinal helminths. *Trends Parasitol.* 2017;33(9):678-693.

Cu Y, Booth CJ, Saltzman WM. *In vivo* distribution of surface-modified PLGA nanoparticles following intravaginal delivery. *J Control Release.* 2011; 156(2):258-64.

Craig PS, Larrieu E. Control of cystic echinococcosis/hydatidosis: 1863-2002. *Adv Parasitol.* 2006;61:443-508.

Cucher MA, Macchiaroli N, Baldi G, Camicia F, Prada L, Maldonado L, Avila HG, Fox A, Gutiérrez A, Negro P, López R, Jensen O, Rosenzvit M, Kamenetzky L. Cystic echinococcosis in South America: systematic review of species and genotypes of *Echinococcus granulosus* sensu lato in humans and natural domestic hosts. *Trop Med Int Health.* 2016;21(2):166-75

Danesh-Bahreini MA, Shokri J, Samiei A, Kamali-Sarvestani E, Barzegar-Jalali M, Mohammadi-Samani S. Nanovaccine for leishmaniasis: preparation of chitosan nanoparticles containing Leishmania superoxide dismutase and evaluation of its immunogenicity in BALB/c mice. *Int J Nanomedicine.* 2011;6:835-42.

Derman S, Mustafaeva ZA, Abamor ES, Bagirova M, Allahverdiyev A. Preparation, characterization and immunological evaluation: canine parvovirus synthetic peptide loaded PLGA nanoparticles. *J Biomed Sci.* 2015;22:89.

Devriendt B, De Geest BG, Goddeeris BM, Cox E. Crossing the barrier: Targeting epithelial receptors for enhanced oral vaccine delivery. *J Control Release.* 2012;160(3):431-439.

Deplazes P, Rinaldi L, Alvarez Rojas CA, Torgerson PR, Harandi MF, Romig T, Antolova D, Schurer JM, Lahmar S, Cringoli G, Magambo J, Thompson RC, Jenkins EJ. Global Distribution of Alveolar and Cystic Echinococcosis. *Adv Parasitol.* 2017;95:315-493.

des Rieux A, Fievez V, Garinot M, Schneider Y-J, Pr  at V. Nanoparticles as potential oral delivery systems of proteins and vaccines: A mechanistic approach. *J Controlled Release* 2006;116:1-27.

Desai MP, Labhasetwar V, Amidon GL, Levy RJ. Gastrointestinal uptake of biodegradable microparticles: effect of particle size. *Pharm Res.* 1996;13(12):1838-45.

Desai MP, Labhasetwar V, Walter E, Levy RJ, Amidon GL. The mechanism of uptake of biodegradable microparticles in Caco-2 cells is size dependent. *Pharm Res.* 1997;14(11):1568-73.

Dhakal S, Goodman J, Bondra K, Lakshmanappa YS, Hiremath J, Shyu DL, Ouyang K, Kang KI, Krakowka S, Wannemuehler MJ, Won Lee C, Narasimhan B, Renukaradhya GJ. Polyanhydride nanovaccine against swine influenza virus in pigs. *Vaccine.* 2017;35(8):1124-1131.

Douch PG, Morum PE, Rabel B. Secretion of anti-parasite substances and leukotrienes from ovine gastrointestinal tissues and isolated mucosal mast cells. *Int J Parasitol.* 1996;26(2):205-11.

Duncan R. Polymer therapeutics: Top 10 selling pharmaceuticals - what next? *J Control Release.* 2014 Sep 28;190: 371-80.

Eckert J, Thompson RC. Intraspecific variation of *Echinococcus granulosus* and related species with emphasis on their infectivity to humans. *Acta Trop.* 1997; 64(1-2):19-34.

Economides P, Christofi G, Gemmell MA. Control of *Echinococcus granulosus* in Cyprus and comparison with other island models. *Vet Parasitol.* 1998; 79(2):151-63.

Else KJ, Grencis RK. Antibody-independent effector mechanisms in resistance to the intestinal nematode parasite *Trichuris muris*. *Infect Immun.* 1996;64(8):2950-4.

Emery DL, McClure SJ, Davey RJ, Bendixsen T. Induction of protective immunity to *Trichostrongylus colubriformis* in neonatal merino lambs. *Int J Parasitol.* 1999;29(7):1037-46.

Erttmann KD, Büttner DW. Immunohistological studies on *Onchocerca volvulus* paramyosin. *Parasitol Res.* 2009;105(5):1371-4.

Elamanchili P, Lutsiak CME, Hamdy S, Diwan M, Samuel J. "Pathogen-mimicking" nanoparticles for vaccine delivery to dendritic cells. *J Immunother.* 2007;30:378-95.

Esmaelizad M, Ahmadian G, Aghaiypour K, Shamsara M, Paykari H, Tebianian M. Induction of prominent Th1 response in C57Bl/6 mice immunized with an *E. coli*-expressed multi T-cell epitope EgA31 antigen against *Echinococcus granulosus*. *Folia Parasitol (Praha).* 2013a;60(1):28-34.

Esmaelizad M, Ahmadian G, Aghaiypour K, Shamsara M, Paykari H, Tebianian M. Induction of protective T-helper 1 immune responses against *Echinococcus granulosus* in mice by a

multi-T-cell epitope antigen based on five proteins. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2013b;108(4):408-13.

Esteves A, Señorale M, Ehrlich R. A tropomyosin gene is differentially expressed in the larval stage of *Echinococcus granulosus*. Parasitol Res 2003;89:501-2.

Fairley SJ, Singh SR, Yilma AN, Waffo AB, Subbarayan P, Dixit S, Taha MA, Cambridge CD, Dennis VA. *Chlamydia trachomatis* recombinant MOMP encapsulated in PLGA nanoparticles triggers primarily T helper 1 cellular and antibody immune responses in mice: a desirable candidate nanovaccine. Int J Nanomedicine. 2013;8:2085-99.

Feller L, Altini M, Khammissa RA, Chandran R, Bouckaert M, Lemmer J. Oral mucosal immunity. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol. 2013; 116(5):576-83

Fievez V, Plapied L, des Rieux A, Pourcelle V, Freichels H, Wascotte V, Vanderhaeghen ML, Jérôme C, Vanderplasschen A, Marchand-Brynaert J, Schneider YJ, Préat V. Targeting nanoparticles to M cells with non-peptidic ligands for oral vaccination. Eur J Pharm Biopharm. 2009; 73(1):16-24

Fichter M, Dedters M, Pietrzak-Nguyen A, Pretsch L, Meyer CU, Strand S, Zepp F, Baier G, Landfester K, Gehring S. Monophosphoryl lipid A coating of hydroxyethyl starch nanocapsules drastically increases uptake and maturation by dendritic cells while minimizing the adjuvant dosage. Vaccine. 2015; 33(7):838-46.

Foged C, Brodin B, Frokjaer S, Sundblad A. Particle size and surface charge affect particle uptake by human dendritic cells in an in vitro model. Int J Pharm. 2005;298(2):315-22.

Flisser A, Gauci CG, Zoli A, Martinez-Ocaña J, Garza-Rodriguez A, Flisser A, Gauci CG, Zoli A, Martínez-Ocaña J, Garza-Rodríguez A, Dominguez-Alpizar JL, Maravilla P, Rodriguez-Canul R, Avila G, Aguilar-Vega L, Kyngdon C, Geerts S, Lightowlers MW. Induction of protection against porcine cysticercosis by vaccination with recombinant oncosphere antigens. *Infect Immun*. 2004;72(9):5292-7.

Florindo HF, Pandit S, Gonçalves LM, Videira M, Alpar O, Almeida AJ. Antibody and cytokine-associated immune responses to *S. equi* antigens entrapped in PLA nanospheres. *Biomaterials*. 2009;30(28):5161-9.

Fraize M, Sarciron ME, Azzouz S, Issaadi N, Bosquet G, Petavy AF. Immunogenicity of two *Echinococcus granulosus* antigens EgA31 and EgTrp in mice. *Parasitol Res*. 2005; 96(2):113-20.

Fu Y, Martinez C, Chalar C, Craig PS, Ehrlich R, Petavy A-F, et al. A new potent antigen from *Echinococcus granulosus* associated with muscles and tegument. *Mol Biochem Parasitol* 1999; 102: 43-52.

Garg NK, Mangal S, Khambete H, Tyagi RK. Mucosal delivery of vaccines: role of mucoadhesive/biodegradable polymers. *Recent Drug Deliv Formul*. 2010; 4(2):114-28.

Grencis RK. Th2-mediated host protective immunity to intestinal nematode infections. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 1997;352(1359):1377-84.

Gemmell MA. Natural and acquired immunity factors interfering with development during the rapid growth phase of *Echinococcus granulosus* in dogs. *Immunology*. 1962; 5:496-503.

Gemmell MA, Soulsby EJ. The development of acquired immunity to tapeworms and progress towards active immunization,

with special reference to *Echinococcus spp.* Bull World Health Organ. 1968;39(1):45-55.

Gemmell MA. Hydatidosis and cysticercosis. I. Acquired resistance to the larval phase. Aust Vet J. 1969;45(11):521-4.

Grabowski N¹, Hillaireau H, Vergnaud J, Santiago LA, Kerdine-Romer S, Pallardy M, Tsapis N, Fattal E. Toxicity of surface-modified PLGA nanoparticles toward lung alveolar epithelial cells. Int J Pharm. 2013;454(2):686-94.

Grayzel DM, Miller EG. The pH of the contents of the gastrointestinal tract in dogs, in relation to diet and rickets. J Biol Chem 1928;76:423-36.

Gregory AE, Titball R, Williamson D. Vaccine delivery using nanoparticles. Front Cell Infect Microbiol. 2013;3:13.

Grencis RK. Immunity to helminths: resistance, regulation, and susceptibility to gastrointestinal nematodes. Annu Rev Immunol. 2015;33:201-25.

Guldner D, Hwang JK, Cardieri MC, Eren M, Ziaei P, Norton MG, Souza CD. In Vitro Evaluation of the Biological Responses of Canine Macrophages Challenged with PLGA Nanoparticles Containing Monophosphoryl Lipid A. PLoS One. 2016;11(11):e0165477.

Gupta NK, Tomar P, Sharma V, Dixit VK. Development and characterization of chitosan coated poly-(ϵ -caprolactone) nanoparticulate system for effective immunization against influenza. Vaccine. 2011;29(48):9026-37.

Gutjahr A, Phelip C, Coolen AL, Monge C, Boisgard AS, Paul S, Verrier B. Biodegradable Polymeric Nanoparticles-Based Vaccine Adjuvants for Lymph Nodes Targeting. *Vaccines* (Basel). 2016;12:4(4)

Hamdy S, Haddadi A, Shayeganpour A, Samuel J, Lavasanifar A. Activation of antigen-specific T cell-responses by mannan-decorated PLGA nanoparticles. *Pharm Res*. 2011;28(9):2288-301.

Hatano R, Yamada K, Iwamoto T, Maeda N, Emoto T, Shimizu M, Totsuka M. Antigen presentation by small intestinal epithelial cells uniquely enhances IFN- γ secretion from CD4+ intestinal intraepithelial lymphocytes. *Biochem Biophys Res Commun*. 2013;435(4):592-6.

Heath DD, Jensen O, Lightowlers MW. Progress in control of hydatidosis using vaccination--a review of formulation and delivery of the vaccine and recommendations for practical use in control programmes. *Acta Trop*. 2003;85(2):133-43.

Heath DD, Robinson C, Shakes T, Huang Y, Gulnur T, Shi B, Zhang Z, Anderson GA, Lightowlers MW. Vaccination of bovines against *Echinococcus granulosus* (cystic echinococcosis). *Vaccine*. 2012 26;30(20):3076-81.

Heath DD, Robinson C, Lightowlers MW. Maternal antibody parameters of cattle and calves receiving EG95 vaccine to protect against *Echinococcus granulosus*. *Vaccine*. 2012;30(50):7321-6.

Hershberg RM, Mayer LF. Antigen processing and presentation by intestinal epithelial cells - polarity and complexity. *Immunol Today*. 2000;21(3):123-8.

HogenEsch H, Felsburg PJ. Immunohistology of Peyer's patches in the dog. *Vet Immunol Immunopathol* 1992;30:147-60.

Hübner MP, Torrero MN, Mitre E. Type 2 immune-inducing helminth vaccination maintains protective efficacy in the setting of repeated parasite exposures. *Vaccine*. 2010;28(7):1746-57.

Huntley JF, Machell J, Nisbet AJ, Van den Broek A, Chua KY, Cheong N, Hales BJ, Thomas WR. Identification of tropomyosin, paramyosin and apolipophorin/vitellogenin as three major allergens of the sheep scab mite, *Psoroptes ovis*. *Parasite Immunol*. 2004;26(8-9):335-42.

Hüttner M, Nakao M, Wassermann T, Siefert L, Boomker JD, Dinkel A, Sako Y, Mackenstedt U, Romig T, Ito A. Genetic characterization and phylogenetic position of *Echinococcus felidis* (Cestoda: Taeniidae) from the African lion. *Int J Parasitol*. 2008;38(7):861-8.

Ibisch C, Pradal G, Bach JM, Lieubeau B. Functional canine dendritic cells can be generated in vitro from peripheral blood mononuclear cells and contain a cytoplasmic ultrastructural marker. *J Immunol Methods*. 2005;298(1-2):175-82.

Irabedra P, Salvatella R. The Southern Cone Sub-Regional Project on Cystic Echinococcosis Control and Surveillance. *Rev Perú Med Exp Salud Pública*. 2010;27(4):598-603.

Ito A, Budke CM. The echinococcoses in Asia: The present situation. *Acta Trop*. 2017;176:11-21.

Jain RA. The manufacturing techniques of various drug loaded biodegradable poly (lactide-co-glycolide) (PLGA) devices. *Biomaterials*. 2000;21(23):2475-90.

Jain AK, Goyal AK, Mishra N, Vaidya B, Mangal S, Vyas SP. PEG-PLA-PEG block copolymeric nanoparticles for oral immunization against hepatitis B. *Int J Pharm.* 2010;387(1-2):253-62.

Jain S, Rathi VV, Jain AK, Das M, Godugu C. Folate-decorated PLGA nanoparticles as a rationally designed vehicle for the oral delivery of insulin. *Nanomed* 2012;7:1311-37.

Jasmer DP, Lahmers KK, Brown WC. *Haemonchus contortus* intestine: a prominent source of mucosal antigens. *Parasite Immunol.* 2007;29(3):139-51.

Jenkins DJ. *Echinococcus granulosus* in Australia, widespread and doing well! *Parasitol Int.* 2006;55 Suppl: S203-6.

Jenkins DJ, Macpherson CN. Transmission ecology of *Echinococcus* in wild-life in Australia and Africa. *Parasitology.* 2003;127 Suppl: S63-72.

Jiménez-Ruiz E, Alvarez-García G, Aguado-Martínez A, Salman H, Irache JM, Marugán-Hernández V, Ortega-Mora LM. Low efficacy of NcGRA7, NcSAG4, NcBSR4 andm NcSRS9 formulated in poly- ϵ -caprolactone against *Neospora caninum* infection in mice. *Vaccine.* 2012;30(33):4983-92

Jiménez S, Pérez A, Gil H, Schantz P, Ramalle E, Juste R. Progress in control of cystic echinococcosis in La Rioja, Spain: decline in infection prevalences in human and animal hosts and economic costs and benefits. *Acta Trop.* 2002;83(3):213-21.

Jiz M, Wu HW, Meng R, Pond-Tor S, Reynolds M, Friedman JF, Olveda R, Acosta L, Kurtis JD. Pilot-scale production and characterization of paramyosin, a vaccine candidate for schistosomiasis japonica. *Infect Immun.* 2008;76(7):3164-9.

Jiz M, Friedman JF, Leenstra T, Jarilla B, Pablo A, Langdon G, Pond-Tor S, Wu HW, Manalo D, Olveda R, Acosta L, Kurtis JD. Immunoglobulin E (IgE) responses to paramyosin predict resistance to reinfection with *Schistosoma japonicum* and are attenuated by IgG4. *Infect Immun*. 2009;77(5):2051-8.

Johnson KS, Harrison GB, Lightowlers MW, O'Hoy KL, Cogle WG, Dempster RP, Lawrence SB, Vinton JG, Heath DD, Rickard MD. Vaccination against ovine cysticercosis using a defined recombinant antigen. *Nature*. 1989;338(6216):585-7.

Joshi VB, Geary SM, Salem AK. Biodegradable particles as vaccine delivery systems: size matters. *AAPS J*. 2013;15(1):85-94.

Kachani M, Macpherson CN, Lyagoubi M, Berrada M, Bouslikhane M, Kachani F, El Hasnaoui M. Public health education/importance and experience from the field. Educational impact of community-based ultrasound screening surveys. *Acta Trop*. 2003;85(2):263-9.

Kachani M, Ouhelli H, Kadiri A, El Hasnaoui M. Prevalence of hydatid cysts in livestock in Morocco and potential role of these intermediate hosts in transmission of cystic echinococcosis. In: *Compendium on Cystic Echinococcosis in Africa and Middle Eastern Countries, with special reference to Morocco*. Andersen F, Ouhelli H, Kachani M (Eds). BYU Print Services, Provo, UT (1997), pag. 156-168.

Kaur L, Sharma A, Yadav AK, Mishra N. Recent advances on biodegradable polymeric carrier-based mucosal immunization: an overview. *Artif Cells Nanomed Biotechnol*. 2017;7:1-13.

Khan MZ, Prebeg Z, Kurjaković N. A pH-dependent colon

targeted oral drug delivery system using methacrylic acid copolymers. I. Manipulation Of drug release using Eudragit L100-55 and Eudragit S100 combinations. J Control Release. 1999;58(2):215-22.

Klementowicz JE, Travis MA, Grencis RK. *Trichuris muris*: a model of gastrointestinal parasite infection. Semin Immunopathol. 2012;34(6):815-28.

Laclette JP, Shoemaker CB, Richter D, Arcos L, Pante N, Cohen C, Bing D, Nicholson-Weller A. Paramyosin inhibes el complemento C1. J Immunol. 1992;148 (1): 124-8.

Langy S, Plichart C, Luquiaud P, Williams SA, Nicolas L. The immunodominant *Brugia malayi* paramyosin as a marker of current infection with *Wuchereria bancrofti* adult worms. Infect Immun. 1998; 66(6):2854-8Lahmar S, Kilani M, Torgerson PR. Frequency distributions of *Echinococcus granulosus* and other helminths in stray dogs in Tunisia. Ann Trop Med Parasitol. 2001;95(1):69-76.

Lahmar S, Debbek H, Zhang LH, McManus DP, Souissi A, Chelly S, Torgerson PR. Transmission dynamics of the *Echinococcus granulosus* sheep-dog strain (G1 genotype) in camels in Tunisia. Vet Parasitol. 2004;121(1-2):151-6.

Larrieu E, Herrero E, Mujica G, Labanchi JL, Araya D, Grismado C, Calabro A, Talmon G, Ruesta G, Perez A, Gatti A, Santillán G, Cabrera M, Arezzo M, Seleiman M, Cavagión L, Cachau MG, Alvarez Rojas CA, Gino L, Gauci CG, Heath DD, Lamberti R, Lightowlers MW. Pilot field trial of the EG95 vaccine against ovine cystic echinococcosis in Rio Negro, Argentina: early impact and preliminary data. Acta Trop. 2013;127(2):143-51.

Larrieu E, Mujica G, Gauci CG, Vizcaychipi K, Seleiman M, Herrero E, Labanchi JL, Araya D, Sepúlveda L, Grizmado C, Calabro A, Talmon G, Poggio TV, Crowley P, Cespedes G, Santillán G, García Cachau M, Lamberti R, Gino L, Donadeu M, Lightowlers MW. Pilot field trial of the EG95 vaccine against ovine cystic Echinococcosis in Rio Negro, Argentina: Second Study of Impact. *PLoS Negl Trop Dis*. 2015;9(10).

Larrieu E, Zanini F. Critical analysis of cystic echinococcosis control programs and praziquantel use in South America, 1974-2010. *Rev Panam Salud Publica*. 2012;31(1):81-7.

Lebre F, Bento D, Ribeiro J, Colaço M, Borchard G, de Lima MCP, Borges O. Association of chitosan and aluminium as a new adjuvant strategy for improved vaccination. *Int J Pharm*. 2017;527(1-2):103-114

Li J, Kong M, Cheng XJ, Dang QF, Zhou X, Wei YN, Chen XG. Preparation of biocompatible chitosan grafted poly(lactic acid) nanoparticles. *Int J Biol Macromol*. 2012;51(3):221-7.

Liang R, Xie J, Li J, Wang K, Liu L, Gao Y, Hussain M, Shen G, Zhu J, Tao J. Liposomes-coated gold nanocages with antigens and adjuvants targeted delivery to dendritic cells for enhancing antitumor immune response. *Biomaterials*. 2017;149:41-50.

Lightowlers MW, Lawrence SB, Gauci CG, Young J, Ralston MJ, Maas D, Heath DD. Vaccination against hydatidosis using a defined recombinant antigen. *Parasite Immunol*. 1996;18(9):457-62.

Ma J, Wang H, Lin G, Zhao F, Li C, Zhang T, Ma X, Zhang Y, Hou Z, Cai H, Liu P, Wang Y. Surveillance of *Echinococcus* isolates from Qinghai, China. *Vet Parasitol*. 2015;207(1-2):44-8

Macedo da Luz CM, Boyles MS, Falagan-Lotsch P, Pereira MR,

Tutumi HR, de Oliveira Santos E, Martins NB, Himly M, Sommer A, Foissner I, Duschl A, Granjeiro JM, Leite PE. Poly-lactic acid nanoparticles (PLA-NP) promote physiological modifications in lung epithelial cells and are internalized by clathrin-coated pits and lipid rafts. *J Nanobiotechnology*. 2017;15(1):11.

Macpherson CN, Kachani M, Lyagoubi M, Berrada M, Shepherd M, Fields PF, El Hasnaoui M. Cystic echinococcosis in the Berber of the Mid Atlas mountains, Morocco: new insights into the natural history of the disease in humans. *Ann Trop Med Parasitol*. 2004;98(5):481-90.

Maizels RM, Hewitson JP, Smith KA. Susceptibility and immunity to helminth parasites. *Curr Opin Immunol*. 2012;24(4):459-66.

Mann JF, Shakir E, Carter KC, Mullen AB, Alexander J, Ferro VA. Lipid vesicle size of an oral influenza vaccine delivery vehicle influences the Th1/Th2 bias in the immune response and protection against infection. *Vaccine*. 2009;27(27):3643-9.

Marciello M, Rossi S, Caramella C, Remuñán-López C. Freeze-dried cylinders carrying chitosan nanoparticles for vaginal peptide delivery. *Carbohydr Polym*. 2017;170:43-51.

Margaroni M, Agallou M, Kontonikola K, Karidi K, Kammona O, Kiparissides C, Gaitanaki C, Karagouni E. PLGA nanoparticles modified with a TNF α mimicking peptide, soluble *Leishmania* antigens and MPLA induce T cell priming in vitro via dendritic cell functional differentiation. *Eur J Pharm Biopharm*. 2016;105:18-31

Margaroni M, Agallou M, Athanasiou E, Kammona O, Kiparissides C, Gaitanaki C, Karagouni E. Vaccination with

poly(D,L-lactide-co-glycolide) nanoparticles loaded with soluble Leishmania antigens and modified with a TNF α -mimicking peptide or monophosphoryl lipid A confers protection against experimental visceral leishmaniasis. Int J Nanomedicine. 2017;12:6169-6184.

Mata-Haro V, Cekic C, Martin M, Chilton PM, Casella CR, Mitchell TC. The vaccine adjuvant monophosphoryl lipid A as a TRIF-biased agonist of TLR4. Science. 2007;316(5831):1628-32.

Matsuo K, Koizumi H, Akashi M, Nakagawa S, Fujita T, Yamamoto A, Okada N. Intranasal immunization with poly(γ -glutamic acid) nanoparticles entrapping antigenic proteins can induce potent tumor immunity. J Control Release. 2011;152(2):310-6

McCarthy DP, Hunter ZN, Chackerian B, Shea LD, Miller SD. Targeted immunomodulation using antigen-conjugated nanoparticles. Wiley Interdiscip Rev Nanomed Nanobiotechnol. 2014;6(3):298-315.

McManus DP. Molecular genetic variation in Echinococcus and Taenia: an update. Southeast Asian J Trop Med Public Health. 1997;28 Suppl 1:110-6.

McManus DP. The molecular epidemiology of *Echinococcus granulosus* and cystic hydatid disease. Trans R Soc Trop Med Hyg. 2002;96 Suppl 1:S151-7.

McManus DP, Thompson RC. Molecular epidemiology of cystic echinococcosis. Parasitology. 2003;127 Suppl: S37-51.

McNeela EA, Lavelle EC. Recent advances in microparticle and nanoparticle delivery vehicles for mucosal vaccination. Curr

Top Microbiol Immunol. 2012;354:75-99.

McSorley HJ, Maizels RM. Helminth infections and host immune regulation. Clin Microbiol Rev. 2012; 25(4):585-608.

Mora-Huertas CE, Fessi H, Elaissari A. Polymer-based nanocapsules for drug delivery. Int J Pharm 2010;385: 113-42.

Mora-Huertas CE, Fessi H, Elaissari A. Polymer-based nanocapsules for drug delivery. Int J Pharm. 2010; 385(1-2):113-42.

Moreno M, Benavidez U, Carol H, Rosenkranz C, Welle M, Carmona C, Nieto A, Chabalgoity JA. Local and systemic immune responses to *Echinococcus granulosus* in experimentally infected dogs. Vet Parasitol. 2004;119(1):37-50.

Moro P, Verastegui M, Gilman RH, Falcon N, Bernal T, Gavidia C, Gonzalez A, Malqui V, Moro MH, Dueger E. Enzyme-linked immunoelectrotransfer blot assay for diagnosis of hydatidosis (*Echinococcus granulosus*) in sheep. Vet Rec. 1997;140(23):605-6.

Moro PL, Lopera L, Cabrera M, Cabrera G, Silva B, Gilman RH, Moro MH. Short report: endemic focus of cystic echinococcosis in a coastal city of Peru. Am J Trop Med Hyg. 2004;71(3):327-9.

Moro PL, Lopera L, Bonifacio N, Gonzales A, Gilman RH, Moro MH. Risk factor for canine echinococcosis in an endemic area of Peru. Vet Parasitol. 2005;130(1-2):99-104.

Moro P, Schantz PM. Cystic echinococcosis in the Americas. Parasitol Int 2006;55 Suppl: S181-6.

Mottram PL, Leong D, Crimeen-Irwin B, Gloster S, Xiang SD, Meanger J, Ghildyal R, Vardaxis N, Plebanski M. Type 1 and 2

immunity following vaccination is influenced by nanoparticle size: formulation of a model vaccine for respiratory syncytial virus. Mol Pharm. 2007;4(1):73-84.

Movsesijan M, Sokolić A, Mladenović Z. Studies on the immunological potentiality of irradiated *Echinococcus granulosus* forms: immunization experiments in dogs. Br Vet J. 1968;124(10):425-32.

Mühlschlegel F, Sygulla L, Frosch P, Massetti P, Frosch M. Paramyosin of *Echinococcus granulosus*: cDNA sequence and characterization of a tegumental antigen. Parasitol Res. 1993;79(8):660-6.

Nkabinde LA, Shoba-Zikhali LN., Semete-Makokotlela B, Kalombo L, Swai H, Grobler A, Hamman JH. Poly (D,L-lactide-co-glycolide) nanoparticles: Uptake by epithelial cells and cytotoxicity. EXPRESS Polymer Letters. 2014;8(3): 197-206.

Neutra MR, Frey A, Kraehenbuhl JP. Epithelial M cells: gateways for mucosal infection and immunization. Cell. 1996;86(3):345-8.

Oh N, Park JH. Endocytosis and exocytosis of nanoparticles in mammalian cells. Int J Nanomedicine. 2014;9 Suppl 1:51-63.

Oleszycka E, McCluskey S, Sharp FA, Muñoz-Wolf N, Hams E, Gorman AL, Fallon PG, Lavelle EC. The vaccine adjuvant alum promotes IL10 production that suppresses Th1 responses. Eur J Immunol. 2018;48(4):705-715.

Oliveira CR, Rezende CM, Silva MR, Borges OM, Pêgo AP, Goes AM. Oral vaccination based on DNA-chitosan nanoparticles against *Schistosoma mansoni* infection. Scientific World Journal. 2012;2012:938457.

Pan W, Chen DS, Lu YJ, Xu HW, Hao WT, Zhang YW, Qin SP, Zheng KY, Tang RX. Genetic diversity and phylogenetic analysis of EG95 sequences of *Echinococcus granulosus*: Implications for EG95 vaccine application. Asian Pac J Trop Med. 2017;10(5):524-527.

Parizi LF, Pohl PC, Masuda A, Vaz Ida S Jr. New approaches toward anti-*Rhipicephalus (Boophilus) microplus* tick vaccine. Rev Bras Parasitol Vet. 2009; 18(1):1-7.

Park TJ, Kang JM, Na BK, Sohn WM. Molecular cloning and characterization of a paramyosin from *Clonorchis sinensis*. Korean J Parasitol. 2009;47(4):359-67.

Pavletic CF, Larrieu E, Guarnera EA, Casas N, Irabedra P, Ferreira C, Sayes J, Gavidia CM, Caldas E, Lise MLZ, Maxwell M, Arezo M, Navarro AM, Vigilato MAN, Cosivi O, Espinal M, Vilas VJDR. Cystic echinococcosis in South America: a call for action. Rev Panam Salud Publica. 2017;21;41:e42.

Pawar D, Mangal S, Goswami R, Jaganathan KS. Development and characterization of surface modified PLGA nanoparticles for nasal vaccine delivery: Effect of mucoadhesive coating on antigen uptake and immune adjuvant activity. Eur J Pharm Biopharm 2013;85:550-9.

Petavy A-F, Hormaeche C, Lahmar S, Ouhelli H, Chabalgoity A, Marchal T, et al. An Oral Recombinant Vaccine in Dogs against *Echinococcus granulosus*, the Causative Agent of Human Hydatid Disease: A Pilot Study. PLoS Negl Trop Dis 2008;2.

Primard C, Rochereau N, Luciani E, Genin C, Delair T, Paul S, Verrier B. Traffic of poly(lactic acid) nanoparticulate vaccine vehicle from intestinal mucus to sub-epithelial immune competent cells. Biomaterials. 2010;31(23):6060-8.

Poggio TV, Jensen O, Mossello M, Iriarte J, Avila HG, Gertiser ML, Serafino JJ, Romero S, Echenique MA, Dominguez DE, Barrios JR, Heath D. Serology and longevity of immunity against *Echinococcus granulosus* in sheep and llama induced by an oil-based EG95 vaccine. *Parasite Immunol.* 2016;38(8):496-502.

Pourseif MM, Moghaddam G, Naghili B, Saeedi N, Parvizpour S, Nematollahi A, Omid Y. A novel in silico minigene vaccine based on CD4(+) T-helper and B-cell epitopes of EG95 isolates for vaccination against cystic echinococcosis. *Comput Biol Chem.* 2018;72:150-163.

Powles L, Xiang SD, Selomulya C, Plebanski M. The Use of Synthetic Carriers in Malaria Vaccine Design. *Vaccines (Basel).* 2015,3(4):894-929.

Pridgen EM, Alexis F, Farokhzad OC. Polymeric nanoparticle drug delivery technologies for oral delivery applications. *Expert Opin Drug Deliv.* 2015;12(9):1459-73.

Pusic KM, Hashimoto CN, Lehrer A, Aniya C, Clements DE, Hui GS. T cell epitope regions of the *P. falciparum* MSP1-33 critically influence immune responses and in vitro efficacy of MSP1-42 vaccines. *PLoS One.* 2011;6(9):e24782.

Qeska V, Baumgärtner W, Beineke A. Species-specific properties and translational aspects of canine dendritic cells. *Vet Immunol Immunopathol.* 2013;151(3-4):181-92.

Reddy S., Swartz M., Hubbell J. Targeting dendritic cells with biomaterials: developing the next generation of vaccines. *Trends in immunology* 2006;27(12):573-579.

Report of Ministry of Public Health 1993, Túnez

Ricklin Gutzwiller ME, Moulin HR, Zurbriggen A, Roosje P, Summerfield A. Comparative analysis of canine monocyte- and bone-marrow-derived dendritic cells. Vet Res. 2010;41(4):40.

Rodríguez-Prado U, Jimenez-Gonzalez DE, Avila G, Gonzalez AE, Martinez-Flores WA, Mondragon de la Peña C, Hernandez-Castro R, Romero-Valdovinos M, Flisser A, Martinez-Hernandez F, Maravilla P, Martinez-Maya JJ. Short report: Genetic variation of *Echinococcus canadensis* (G7) in Mexico. Am J Trop Med Hyg. 2014;91(6):1149-53.

Rossi A, Marqués JM, Gavidia CM, Gonzalez AE, Carmona C, García HH, Chabalgoity JA. *Echinococcus granulosus*: different cytokine profiles are induced by single versus multiple experimental infections in dogs. Exp Parasitol. 2012;130(2):110-5

Saboulard D, Lahmar S, Petavy A-F, Bosquet G. The *Echinococcus granulosus* antigen EgA31: localization during development and immunogenic properties. Parasite Immunol 2003;25:489-501.

Sadjjadi SM. Present situation of echinococcosis in the Middle East and Arabic North Africa. Parasitol Int. 2006; 55 Suppl:S197-202.

Sarti F, Perera G, Hintzen F, Kotti K, Karageorgiou V, Kammona O, et al. In vivo evidence of oral vaccination with PLGA nanoparticles containing the immunostimulant monophosphoryl lipid A. Biomaterials 2011;32:4052-7.

Shive MS, Anderson JM. Biodegradation and biocompatibility of PLA and PLGA microspheres. Adv Drug Deliv Rev. 1997;28(1):5-24.

Singh B, Maharjan S, Cho KH, Cui L, Park IK, Choi YJ, Cho CS. Chitosan-based particulate systems for the delivery of mucosal vaccines against infectious diseases. *Int J Biol Macromol*. 2018;110:54-64.

Sorobetea D, Holm JB, Henningsson H, Kristiansen K, Svensson-Frej M. Acute infection with the intestinal parasite *Trichuris muris* has long-term consequences on mucosal mast cell homeostasis and epithelial integrity. *Eur J Immunol*. 2017;47(2):257-268.

Shakya KP, Miller JE, Horohov DW. A Th2 type of immune response is associated with increased resistance to *Haemonchus contortus* in naturally infected Gulf Coast Native lambs. *Vet Parasitol*. 2009;163(1-2):57-66.

Solís CF, Vázquez-Talavera J, Laclette JP. [Toward development of a *Taenia solium* paramyosin-based vaccine against porcine cysticercosis]. *Gac Med Mex*. 2004;140(2):129-38.

Sonaje K, Chuang E-Y, Lin K-J, Yen T-C, Su F-Y, Tseng MT, et al. Opening of epithelial tight junctions and enhancement of paracellular permeation by chitosan: microscopic, ultrastructural, and computed-tomographic observations. *Mol Pharm* 2012;9:1271-9.

Stankiewicz M, Jonas WE, Douch PC, Rabel B, Bisset S, Cabaj W. Globule leukocytes in the lumen of the small intestine and the resistance status of sheep infected with parasitic nematodes. *J Parasitol*. 1993;79(6):940-5.

Stankiewicz M, Shaw RJ, Jonas WE, Cabaj W, Grimmett DJ, Douch PG. A technique for the isolation and purification of viable mucosal mast cells/globule leukocytes from the small

intestine of parasitised sheep. *Int J Parasitol.* 1994;24(2):307-9.

Steinhagen F, Kinjo T, Bode C, Klinman DM. TLR-based immune adjuvants. *Vaccine.* 2011;29(17):3341-55.

Stano A, van der Vlies AJ, Martino MM, Swartz MA, Hubbell JA, Simeoni E. PPS nanoparticles as versatile delivery system to induce systemic and broad mucosal immunity after intranasal administration. *Vaccine.* 2011;29(4):804-12.

Stano A, Nembrini C, Swartz MA, Hubbell JA, Simeoni E. Nanoparticle size influences the magnitude and quality of mucosal immune responses after intranasal immunization. *Vaccine.* 2012;30(52):7541-6.

Swerdlow MP, Kennedy DR, Kennedy JS, Washabau RJ, Henthorn PS, Moore PF, Carding SR, Felsburg PJ. Expression and function of TLR2, TLR4, and Nod2 in primary canine colonic epithelial cells. *Vet Immunol Immunopathol.* 2006;114(3-4):313-9.

Taha MA, Singh SR, Dennis VA. Biodegradable PLGA85/15 nanoparticles as delivery vehicle for *Chlamydia trachomatis* recombinant MOMP-187 peptide. *Nanotechnology.* 2012;23(32):325101.

Tan Z, Liu W, Liu H, Li C, Zhang Y, Meng X, et al. Oral *Helicobacter pylori* vaccine-encapsulated acid-resistant HP55/PLGA nanoparticles promote immune protection. *Eur J Pharm Biopharm* 2017;111:33-43.

Thauvin C, Schwarz B, Delie F, Allémann E. Functionalized PLA polymers to control loading and/or release properties of drug-loaded nanoparticles. *Int J Pharm.* 2017 pii: S0378-5173(17)31045-1

Thomas WR, Smith WA, Hales BJ. The allergenic specificities of the house dust mite. *Chang Gung Med J*. 2004;27(8):563-9.

Thompson RC, Dunsmore JD, Hayton AR. *Echinococcus granulosus*: secretory activity of the rostellum of the adult cestode in situ in the dog. *Exp Parasitol*. 1979;48(1):144-63.

Thompson RC, McManus DP. Towards a taxonomic revision of the genus *Echinococcus*. *Trends Parasitol*. 2002;18(10):452-7.

Thompson RC, Jenkins DJ. *Echinococcus* as a model system: biology and epidemiology. *Int J Parasitol*. 2014;44(12):865-77.

Tyler B, Gullotti D, Mangraviti A, Utsuki T, Brem H. Polylactic acid (PLA) controlled delivery carriers for biomedical applications. *Adv Drug Deliv Rev* 2016;107:163-75.

Todorov T, Boeva V. Human echinococcosis in Bulgaria: a comparative epidemiological analysis. *Bull World Health Organ*. 1999;77(2):110-8.

Torgerson PR, Heath DD. Transmission dynamics and control options for *Echinococcus granulosus*. *Parasitology* 2003;127 Suppl: S143-158

Torgerson PR. Canid immunity to *Echinococcus* spp.: impact on transmission. *Parasite Immunol*. 2006;28(7):295-303.

Treuel L, Jiang X, Nienhaus GU. New views on cellular uptake and trafficking of manufactured nanoparticles. *J R Soc Interface*. 2013;10:82.

Tritama E, Riani C, Rudiansyah I, Hidayat A, Kharisnaeni SA, Retnoningrum DS. Evaluation of alum-based adjuvant on the immunogenicity of salmonella enterica serovar typhi conjugates vaccines. *Hum Vaccin Immunother*. 2018;23:1-6.

Tritto E, Mosca F, De Gregorio E. Mechanism of action of licensed vaccine adjuvants. *Vaccine* 2009;27:3331-4.

Tyagi RK, Garg NK, Sahu T. Vaccination Strategies against Malaria: novel carrier(s) more than a tour de force. *J Control Release*. 2012;162(1):242-54.

Umair S, Pernthaner A, Deng Q, Gibson B, Hook S, Heath D. Preliminary evaluation of a thermosensitive chitosan hydrogel for *Echinococcus granulosus* vaccine delivery. *Vet Parasitol*. 2017;236:117-120.

Uto T, Wang X, Sato K, Haraguchi M, Akagi T, Akashi M, Baba M. Targeting of Antigen to Dendritic Cells with Poly-Glutamic Acid Nanoparticles Induces Antigen-Specific Humoral and Cellular Immunity *J Immunol* 2007;178:2979-2986.

Valizadeh M, Haghpanah B, Badirzadeh A, Roointan E, Fallahi S, Raeghi S. Immunization of sheep against *Echinococcus granulosus* with protoscolex tegumental surface antigens. *Vet World*. 2017;10(8):854-858.

Valmonte GR, Cauyan GA, Ramos JD. IgE cross-reactivity between house dust mite allergens and *Ascaris lumbricoides* antigens. *Asia Pac Allergy*. 2012;2(1):35-44.

Vázquez-Talavera J, Solís CF, Terrazas LI, Laclette JP. Characterization and protective potential of the immune response to *Taenia solium* paramyosin in a murine model of cysticercosis. *Infect Immun*. 2001;69(9):5412-6.

Vila A, Sánchez A, Tobió M, Calvo P, Alonso MJ. Design of biodegradable particles for protein delivery. *J Controlled Release* 2002;78:15-24.

Visser A, Geldhof P, de Maere V, Knox DP, Vercruysse J, Claerebout E. Efficacy and specificity of RNA interference in larval life-stages of *Ostertagia ostertagi*. *Parasitology*. 2006;133(Pt 6):777-83.

Wang YS, Chi KH, Liao KW, Liu CC, Cheng CL, Lin YC, Cheng CH, Chu RM. Characterization of canine monocyte-derived dendritic cells with phenotypic and functional differentiation. *Can J Vet Res*. 2007;71(3):165-74.

Wang YS, Chi KH, Chu RM. Cytokine profiles of canine monocyte-derived dendritic cells as a function of lipopolysaccharide- or tumor necrosis factor-alpha-induced maturation. *Vet Immunol Immunopathol*. 2007; 118(3-4):186-98. Wang M, Gao Z, Zhang Z, Pan L, Zhang Y. Roles of M cells in infection and mucosal vaccines. *Hum Vaccin Immunother*. 2014;10(12):3544-51.

Wassef A, Janardhan K, Pearce JW, Singh B. Toll-like receptor 4 in normal and inflamed lungs and other organs of pig, dog and cattle. *Histol Histopathol*. 2004;19(4):1201-8.

Webb RA, Hoque T, Dimas S. Expulsion of the gastrointestinal cestode, *Hymenolepis diminuta* by tolerant rats: evidence for mediation by a Th2 type immune enhanced goblet cell hyperplasia, increased mucin production and secretion. *Parasite Immunol*. 2007;29(1):11-21.

Wen ZS, Xu YL, Zou XT, Xu ZR. Chitosan nanoparticles act as an adjuvant to promote both Th1 and Th2 immune responses induced by ovalbumin in mice. *Mar Drugs*. 2011;9(6):1038-55.

Weilhammer DR, Blanchette CD, Fischer NO, Alam S, Loots GG, Corzett M, Thomas C, Lychak C, Dunkle AD, Ruitenberg JJ, Ghanekar SA, Sant AJ, Rasley A. The use of nanolipoprotein particles to

enhance the immunostimulatory properties of innate immune agonists against lethal influenza challenge. *Biomaterials*. 2013;34(38):10305-18.

Woollard DJ, Gauci CG, Heath DD, Lightowlers MW. Protection against hydatid disease induced with the EG95 vaccine is associated with conformational epitopes. *Vaccine*. 2000;19(4-5):498-507.

Worthington JJ, Samuelson LC, Grencis RK, McLaughlin JT. Adaptive immunity alters distinct host feeding pathways during nematode induced inflammation, a novel mechanism in parasite expulsion. *PLoS Pathog*. 2013;9(1):e1003122.

Wu HY, Weiner HL. Oral tolerance. *Immunol Res*. 2003;28(3):265-84.

Xia Y, Fan Q, Hao D, Wu J, Ma G, Su Z. Chitosan-based mucosal adjuvants: Sunrise on the ocean. *Vaccine* 2015;33:5997-6010. doi:10.1016/j.vaccine.2015.07.101

Xiang SD, Scholzen A, Minigo G, David C, Apostolopoulos V, Mottram PL, Plebanski M. Pathogen recognition and development of particulate vaccines: does size matter? *Methods*. 2006;40(1):1-9.

Xiao N, Qiu J, Nakao M, Li T, Yang W, Chen X, Schantz PM, Craig PS, Ito A. *Echinococcus shiquicus*, a new species from the Qinghai Tibet plateau region of China: discovery and epidemiological implications. *Parasitol Int*. 2006;55 Suppl: S233-6.

Xu B, Zhang W, Chen Y, Xu Y, Wang B, Zong L. Eudragit L100-coated mannosylated chitosan nanoparticles for oral protein vaccine delivery. *Int J Biol Macromol*. 2018;113:534-542.

Zhang W, Zhang Z, Shi B, Li J, You H, Tulson G, Dang X, Song Y, Yimiti T, Wang J, Jones MK, McManus DP. Vaccination of dogs against *Echinococcus granulosus*, the cause of cystic hydatid disease in humans. J Infect Dis. 2006;194(7):966-74.

Zhao QP, Moon SU, Na BK, Kim SH, Cho SH, Lee HW, Kong Y, Sohn WM, Jiang MS, Kim TS. *Paragonimus westermani*: biochemical and immunological characterizations of paramyosin. Exp Parasitol. 2007;115(1):9-18.

Zhao L, Seth A, Wibowo N, Zhao CX, Mitter N, Yu C, Middelberg AP. Nanoparticle vaccines. Vaccine. 2014;32(3):327-37.

Zhao K, Zhang Y, Zhang X, Shi C, Wang X, Wang X, Jin Z, Cui S. Chitosan-coated poly(lactic-co-glycolic) acid nanoparticles as an efficient delivery system for Newcastle disease virus DNA vaccine. Int J Nanomedicine. 2014;30; 9:4609-19.

Zhao K, Li S, Li W, Yu L, Duan X, Han J, Wang X, Jin Z. Quaternized chitosan nanoparticles loaded with the combined attenuated live vaccine against Newcastle disease and infectious bronchitis elicit immune response in chicken after intranasal administration. Drug Deliv. 2017;24(1):1574-1586.